

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



СЕРЕБРЕННИКОВА Ксения Вячеславовна

**Высококчувствительные экспресс-методы латерального
проточного иммуноанализа биомаркеров для целей
медицинской диагностики**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

Доцент, к.х.н. Осипов А.П.

Москва - 2018

Список сокращений	5
Введение.....	6
Глава I. Обзор литературы	9
1.1. Латеральный проточный иммуноанализ	9
1.1.1. Строение тест-полоски для проведения ЛПИА.....	10
1.1.2. Стандартные компоненты ЛПИА.....	12
1.1.2.1. Антитела	12
1.1.2.2. Аналитическая мембрана	13
1.1.2.3. Мембрана для конъюгата.....	16
1.1.2.4. Мембрана для образца.....	18
1.1.2.5. Впитывающая мембрана	19
1.1.3. Метки.....	19
1.1.3.1. Латексные частицы.....	20
1.1.3.2. Наночастицы золота	21
1.1.3.2.1. Модификация наночастиц золота	25
1.1.3.2.2. Методы усиления сигнала, генерируемого НЧЗ.....	27
1.1.3.3. Углеродные наночастицы	31
1.1.3.4. Другие наночастицы и материалы.....	32
1.1.3.5. Люминесцентные наночастицы	33
1.1.3.5.1. Флуоресцентные красители	33
1.1.3.5.2. Квантовые точки.....	35
1.1.3.5.3. Лантаниды.....	39
1.1.3.5.4. Преобразующие флуорофоры	40
1.1.3.6. Магнитные наночастицы	40
1.1.3.7. Липосомы.....	41
1.2. Системы преобразования сигнала ЛПИА для проведения количественного определения исследуемого аналита	43

1.3.	Баркод-формат ЛПИА.....	46
1.4.	ПКт - маркер сепсиса и бактериальной инфекции	47
1.4.1.	Структура и функции ПКт	48
1.4.2.	Методы определения ПКт	52
Глава II Экспериментальная часть		60
2.1.	Материалы и методы исследования	60
2.1.1.	Реагенты и материалы	60
2.1.2.	Оборудование.....	61
2.1.3.	Методы исследования	62
Глава III Результаты и обсуждение		69
3.1.	Разработка ЛПИА тест-системы для определения ПКт	69
3.1.1.	Получение сферических НЧЗ	69
3.1.2.	Получение конъюгатов специфических антител с НЧЗ	72
3.1.3.	Оптимизация условий проведения стандартного ЛПИА с использованием НЧЗ для определения ПКт	73
3.1.3.1.	Выбор пары антител.....	73
3.1.3.2.	Выбор оптимального размера метки	76
3.1.3.3.	Выбор концентрации компонентов ЛПИА тест-системы.....	78
3.1.3.4.	Выбор мембранных материалов для проведения ЛПИА ПКт	78
3.2.	ЛПИА с использованием сферических наночастиц в качестве метки для определения ПКт..	81
3.3.	Подходы, направленные на повышение чувствительности ЛПИА для определения ПКт	82
3.3.1.	Модификация метки с целью повышения чувствительности анализа ПКт.....	82
3.3.1.1.	ЛПИА с использованием в качестве метки НЧЗ и фермента	82
3.3.1.2.	ЛПИА на основе системы биотин-стрептавидин	87
3.3.1.3.	ЛПИА с использованием несферических НЧЗ большого размера в качестве метки ..	90
3.3.1.4.	Метод усиления серебром	95
3.3.1.4.1.	Апробация ЛПИА с использованием НЧЗ, усиленного серебром, на реальных образцах сыворотки крови человека	96

3.3.2. ЛПИА с использованием квантовых точек для определения ПКТ	99
3.3.3. Оптимизация анализа и системы регистрации сигнала для определения ПКТ.....	102
3.3.3.1. ЛПИА на основе гигантского комбинационного рассеяния	102
3.4. Градиентный ЛПИА для полуколичественного определения диагностически важных соединений	107
3.4.1. Математическая модель градиентного формата ЛПИА	108
3.4.2. Разработка градиентного ЛПИА на примере модельной системы для определения маркера беременности – ХГЧ	112
3.4.2.1. Подбор оптимальных условий и компонентов для проведения градиентного ЛПИА ХГЧ.....	112
3.4.2.2. Градиентный ЛПИА для полуколичественного определения ХГЧ	115
3.4.3. Разработка градиентного ЛПИА для определения ПКТ	117
3.4.3.1. Подбор оптимальных условий и компонентов для проведения градиентного ЛПИА ПКТ.....	118
3.4.3.2. Градиентный ЛПИА для полуколичественного определения ПКТ в сыворотке крови	119
3.4.3.3. Сравнение градиентного ЛПИА ПКТ с методом ИФА	123
Выводы	128
Список литературы	130

Список сокращений

ЛПИА	Латеральный проточный иммуноанализ
ИФА	иммуноферментный анализ
РИА	радиоиммуноанализ
НЧЗ	наночастицы золота
Ат	антитела
Аг	антиген
ПЭМ	просвечивающая электронная микроскопия
ЗХВК	золотохлористоводородная кислота
КТ	квантовые точки
ПХ	пероксидаза хрена
БСА	бычий сывороточный альбумин
ТМБ	3,3',5,5'-тетраметилбензидин
ФБС	фосфатный буфер солевой
ФБСТ	фосфатный буфер солевой, содержащий 0,05% твин-20
ПКт	прокальцитонин
ХГЧ	хорионический гонадотропин человека

Введение

Одной из наиболее важных и актуальных задач в области аналитической биотехнологии является разработка новых простых методов и устройств, позволяющих осуществлять экспресс-анализ различных соединений в объектах окружающей среды или в биологических жидкостях. Основными требованиями к ним являются простота выполнения анализа, высокая чувствительность, воспроизводимость результатов, стабильность, относительно низкая стоимость и экспрессность, позволяющая в режиме реального времени, т.е. в течение нескольких минут получить результаты анализа. Экспресс-тесты такого типа в литературе получили общее название "быстрых тестов" ("rapid tests"). Эту группу аналитических методов также часто объединяют с равнозначными терминами: "анализы непосредственно у постели больного" ("point-of-care tests или POC"), "анализы на приеме у доктора" ("doctor's office tests"), "мембранные тесты" ("membrane tests") и т.д. В основе функционирования таких биоаналитических устройств лежат следующие общие процессы: первоначальное "узнавание" анализируемого вещества в растворе, осуществляемое, как правило, за счет эффективных биоспецифических взаимодействий (например, типа антиген-антитело), и последующие преобразования в системе, приводящие к "визуализации" таких специфических взаимодействий. Наличие образующихся комплексов с анализируемым веществом может быть определено либо визуально, например, по окрашиванию раствора или твердой фазы при введении в иммунокомплекс специальной цветной метки, либо с использованием соответствующего инструментального оборудования, например, отражательных фотометров. В настоящее время в качестве таких меток большое распространение получили наночастицы металлов, в том числе золота, обладающие интенсивной окраской вследствие эффекта плазмонного резонанса. Количественная оценка таких меченых комплексов позволяет вычислять точную концентрацию анализируемого соединения в пробе с использованием калибровочных кривых. В последние годы быстрые методы анализа находят широкое применение в различных областях, например, в медицинской диагностике, фармацевтической и пищевой промышленности, экологии и ветеринарии.

Одним из наиболее распространенных быстрых методов определения целевых аналитов является латеральный проточный иммуноанализ (ЛПИА), также известный в литературе как иммунохроматографический анализ. Принцип действия ЛПИА объединяет иммунологический и хроматографический методы и основан на специфических взаимодействиях между аналитом и распознающим его элементом, протекающих в

различных частях мембранной тест-полоски с предварительно иммобилизованными специфическими реагентами и иницируемых добавлением жидкого образца. Результатом ЛПИА является появление окрашенных линий в тестовой зоне устройства, интенсивность окраски которых соответствует содержанию исследуемого аналита. К преимуществам данного метода следует отнести быстроту (как правило, 10-15 минут) и простоту проведения анализа, а также возможность визуальной регистрации результатов.

Наибольшее распространение метод ЛПИА получил в медицинской диагностике благодаря возможности применения тест-систем для раннего выявления заболеваний и контроля эффективности терапии. Как правило, метод используется для полуколичественного определения содержания определенных веществ в крови или сыворотке, называемых биомаркерами. Тесты на основе принципа иммунохроматографии предельно просты в использовании и могут применяться на любом этапе оказания медицинской помощи населению, как для самодиагностики или диагностики непосредственно в кабинете врача при проведении профилактических осмотров, так и в клиничко-диагностических лабораториях с высоким уровнем оснащенности. Самым распространенным и хорошо известным тестом такого типа является тест на беременность, основанный на определении в моче специфического гормона, хорионического гонадотропина человека (ХГЧ).

В области медицинской диагностики одной из актуальных проблем является своевременное выявление сепсиса и бактериальных инфекций. Системный воспалительный синдром (тяжелый сепсис) часто встречается у критически больных пациентов независимо от инфекции. Вследствие поздней диагностики и лечения уровень смертности от сепсиса остается высоким. В связи с этим важна дифференциальная диагностика инфекции и сепсиса. По результатам исследований последних лет, наиболее перспективным маркером сепсиса является белок прокальцитонин (ПКт). При микробных инфекциях и различных формах тяжелого системного воспаления, уровень ПКт в крови повышается в десятки и сотни раз и часто коррелирует с тяжестью состояния. Таким образом, ПКт может быть важным маркером для диагностики и мониторинга течения заболевания, а также позволяет дифференцировать воспалительные процессы бактериальной и вирусной этиологии. На сегодняшний день для определения уровня ПКт в сыворотке предложен ряд качественных и количественных анализов. Обычно количественное определение ПКт проводится с помощью специализированных аналитических платформ, обеспечивающих наименьшие затраты труда. Однако, недостатками данных видов анализа являются высокая стоимость и достаточно

длительное время проведения тестирования, что во многих случаях оказывается критичным параметром.

В этой связи, основным направлением данного исследования является разработка простой, быстрой и надежной тест-системы для полуколичественного или количественного определения ПКТ в сыворотке крови человека, которую можно использовать для ранней диагностики тяжелой бактериальной инфекции (сепсиса) и контроля за эффективностью антибиотикотерапии.

Глава I. Обзор литературы

1.1. Латеральный проточный иммуноанализ

Современная концепция лабораторной экспресс-диагностики, основанная на понятии "point-of-care testing", то есть проведение анализа у постели больного, стала одним из самых распространенных направлений клинической диагностики, контроля безопасности пищевой продукции и окружающей среды. По сравнению с централизованными лабораториями, данная концепция позволяет незамедлительно получать необходимые результаты анализов в короткий срок. Одной из наиболее развивающихся стратегий анализа «вне лабораторных условий» или «рядом с пациентом» является ЛПИА, также известный в литературе как иммунохроматографический анализ.

Технической основой ЛПИА является метод латексной агглютинации, на основе которого в 1956 г. был разработан тест с использованием полистирольных латексных микросфер, на поверхности которых адсорбировали гамма-глобулин человека, для определения ревматоидного фактора [1]. В 1960 г. группой ученых под руководством Берсона и Ялоу впервые был описан радиоиммунологический метод для определения инсулина и тироксина [2]. В 1970-х годах на смену радиоиммуноанализу (РИА) пришел иммуноферментный анализ (ИФА). Развитие ИФА метода и его более широкое распространение связано с заменой радиоактивной метки на безопасную ферментную, простотой регистрации аналитического сигнала, высокой специфичностью и длительным сроком хранения компонентов набора по сравнению с РИА. Основные принципы технологии ЛПИА определялись в начале 1980-х годов и окончательно утвердились в последних годах этого десятилетия, с подачи патентов на технологию от таких компаний, как Becton Dickinson & Co. и Unilever и Carter Wallace. Первый иммунохроматографический тест был разработан и проведен в 1976 году для определения хорошо изученного маркера беременности, ХГЧ в моче [3]. Однако, для полной разработки платформы ЛПИА тестов необходимо было создание и изучение основных ее компонентов: мембранных материалов, биологических материалов, полимеров и т.д. В результате проведенных исследований в начале 1980-х годов на рынке здравоохранения конкурировали между собой два быстрых иммунодиагностических метода, а именно ЛПИА и иммунофльтрационный анализ. Принцип иммунофльтрационного метода заключается в нанесении образца на аналитическую пористую мембрану, который затем проходит через нее в поперечном направлении к впитывающей мембране. Исследуемый

аналит захватывается адсорбированными на пористой мембране специфическими биораспознающими молекулами. Для дальнейшей визуализации результатов добавляют меченые иммунореагенты. Такой относительно простой и быстрый иммунофльтрационный анализ стал одним из методов «point-of-care» диагностики [4]. Однако, несмотря на простоту процедуры проведения тестирования, главными недостатками данного метода были этапы промывки и добавления реагентов. Эти недостатки устранены в ЛПИИА, который стал удобной для пользователей, одностадийной диагностической платформой. Кроме того, по сравнению с другими аналитическими методами, ЛПИИА обладает рядом преимуществ, связанных с низкой стоимостью, быстрой и простой процедурой проведения анализа с визуально детектируемыми результатами [5,6]. Однако, традиционный ЛПИИА имеет ряд недостатков, прежде всего связанных с чувствительностью и воспроизводимостью метода. В последние годы тенденции со стороны рынка привели к разработке новых материалов, реагентов, методов обнаружения и считывающих систем, совокупность которых позволяет значительно улучшить аналитические характеристики ЛПИИА. ЛПИИА проводится с помощью специальных полосок, собранных из мембранных материалов и содержащих сухие реагенты, которые активируются при добавлении жидкого образца. Принцип теста основан на специфическом взаимодействии между антигеном (Аг) и антителом (Ат). Иммунохроматографические тест-системы используют в диагностических целях: установление беременности [7], диагностика заболеваний внутренних органов (ишемическая болезнь сердца, почечная недостаточность и сахарный диабет), выявление возбудителей инфекционных заболеваний, а также токсичных соединений в пищевых продуктах [8], кормах или в окружающей среде [9] и т.д.

1.1.1. Строение тест-полоски для проведения ЛПИИА

На рисунке 1 приведена типичная схема строения тест-полоски для проведения ЛПИИА. Тест-полоска состоит из различных материалов, каждый из которых выполняет свою определенную функцию. Мембранные компоненты тест-полоски перекрываются друг с другом и наклеены на специальную подложку.



Рис. 1. Схема строения ЛПИИ тест-полоски: 1) аналитическая мембрана; 2) мембрана для образца; 3) мембрана для конъюгата; 4) тестовая линия; 5) контрольная линия; 6) впитывающая мембрана; 7) пластиковая подложка.

При проведении анализа образец наносят на мембрану для образца, расположенную на конце тест-полоски. Далее, образец движется в сторону мембраны для конъюгата, на которой иммобилизован меченый конъюгат. Меткой в ЛПИИ называют различные структуры, обеспечивающие формирование визуального или регистрируемого с помощью приборов сигнала, а меченый реагент – конъюгат биомолекул с меткой. В качестве метки обычно используют коллоидное золото, флуоресцентные или латексные частицы и т.д. (п. 1.1.3.). Содержащийся в образце аналит взаимодействует с конъюгатом, далее оба компонента движутся в аналитическую зону полоски, на которой иммобилизованы специфические биологические компоненты анализа. Как правило, это белки, либо Ат, либо Аг, которые наносят в виде полосок в определенных областях мембраны, для захвата аналита и конъюгата из раствора. Избыток реагентов и несвязавшихся компонентов системы впитывается адсорбирующей мембраной. Результаты анализа интерпретируются визуально или с помощью прибора по наличию или отсутствию окрашенных линий в аналитической зоне полоски. В зависимости от аналита, формат ЛПИИ может быть прямой (сэндвич) или конкурентный (ингибирование). Прямой формат анализа обычно используют для определения более крупных аналитов с несколькими антигенными участками, например, ХГЧ, антиген Денге или вирус иммунодефицита человека. В данном случае, положительный результат регистрируется по наличию окрашенной тестовой линии (рис. 2а). Контрольная линия свидетельствует о работоспособности теста и содержит антивидовые Ат по отношению к Ат конъюгата. Конкурентный формат проведения анализа обычно используют для определения маленьких молекул с единичными антигенными детерминантами, которые не

могут одновременно связываться с двумя Ат (рис. 2б). О положительном результате свидетельствует отсутствие окрашенных тестовых линий в аналитической зоне полоски.

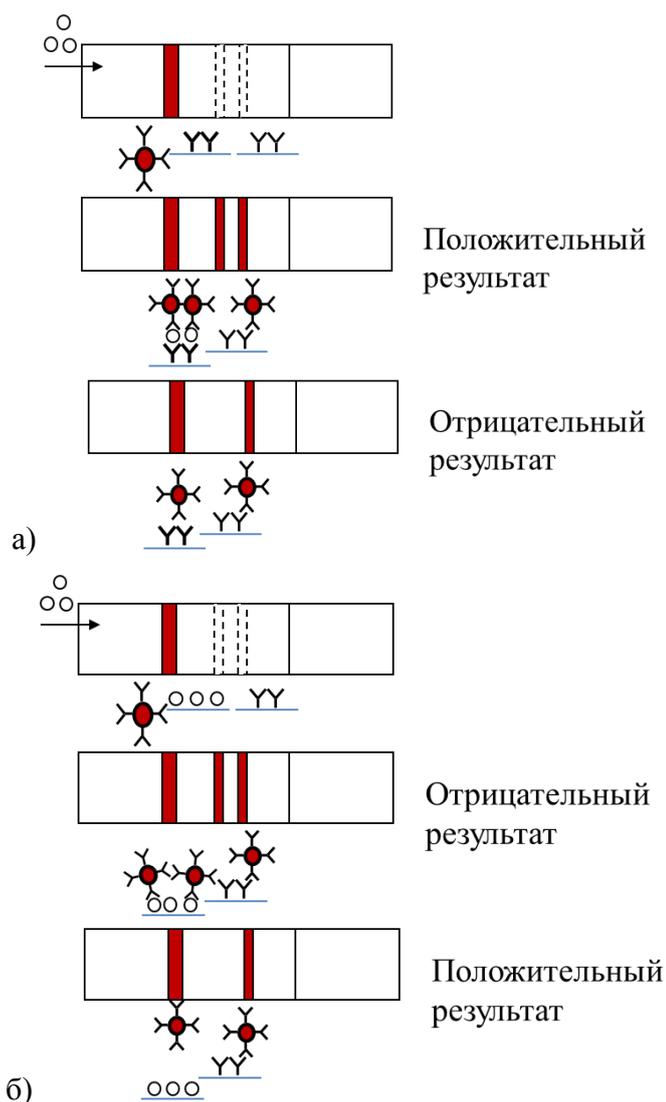


Рис. 2. Прямой (сэндвич) (а) и конкурентный (ингибирование) (б) форматы проведения ЛПИИ.

1.1.2. Стандартные компоненты ЛПИИ

1.1.2.1. Антитела

Чувствительность ЛПИИ в значительной степени зависит от аффинности специфических Ат. Для формирования детектируемого сигнала используют конъюгат специфических Ат с меткой. Ат, которые специфически связываются с определенным Аг, называют первичными; Ат, которые связывают класс-специфические участки первичных антител, называют вторичными. В ЛПИИ обычно используют первичные и вторичные Ат, которые иммобилизуют в тестовой и контрольной зонах, соответственно. Ат выделяют из

сыворотки иммунизированного животного, а затем применяют для определения целевых аналитов в биологических образцах человека. Концентрация целевого аналита является ключевым фактором применимости Ат в качестве биораспознающих молекул. Предел обнаружения от наномолярного до пикомолярного диапазона достигается при использовании современных теоретических методов и изменения физических параметров (количество реагентов в различных зонах полоски, усиление сигнала путем модификации метки, предварительная инкубация образца с мечеными антителами) для анализа различных целевых аналитов [10].

1.1.2.2. Аналитическая мембрана

Задачами аналитической области ЛПИИА тест-полоски является связывание белков в тестовой и контрольной зонах, а также сохранение их стабильности и активности в течение всего срока хранения продукта. Материалом для разработки систем ЛПИИА чаще всего выбирают нитроцеллюлозу [11,12]. Было предпринято несколько попыток ввести на рынок другие типы материалов, включая мембраны из нейлона и поливинилиденфторида. Однако, эти попытки имели ограниченный успех из-за таких факторов, как высокая стоимость, ограничения в применении, необходимость в изучении новых химических реагентов для обработки мембран, а также конкуренция на рынке нитроцеллюлозных материалов [13]. Нитроцеллюлоза, будучи чрезвычайно функциональной, тем не менее не является идеальной матрицей для аналитической мембраны в ЛПИИА. Она имеет определенные характеристики, которые способствуют ее широкому применению на сегодняшний день. К таким характеристикам можно отнести низкую стоимость, высокую способность к связыванию белков, относительную простоту в применении, а также доступность продуктов с различными впитывающими скоростями и содержанием поверхностно-активных веществ. Однако, у нитроцеллюлозного материала есть и недостатки: несовершенная воспроизводимость результатов внутри и между партий, проблемы с хранением, воспламеняемость, переменные характеристики из-за условий окружающей среды, к примеру, относительной влажности. В связи с такими проблемами материала, разработчики и производители тратят много времени и усилий на оптимизацию условий обработки химическими реагентами и производственных процессов, чтобы гарантировать хорошую производительность на весь срок годности продукта. Тщательный контроль ключевых процессов дозирования, внесения мембраны в раствор и сушки, а также внимание к химическим и биологическим обработкам мембраны для предотвращения введения дополнительных изменений в готовый продукт, имеют

решающее значение для успеха. Для функционирования в качестве реакционной матрицы в системе ЛПИА, материалы должны быть гидрофильными с постоянными характеристиками потока. Нитроцеллюлоза в качестве основного материала является гидрофобной и приобретает гидрофильные свойства путем добавления смачивающих реагентов во время процесса мембранного производства. Смачивающими реагентами являются поверхностно-активные вещества, состав которых, количество и методики их добавления отличаются для разных производителей, причем точный состав и конечные характеристики мембран ими, как правило, не указывается. Однако, эти факторы могут оказывать влияние на анализ изначально или с течением времени. Не каждый белок совместим с поверхностно-активным веществом. Это одна из причин необходимости подбора оптимальной мембраны для разработки конкретного анализа. Одним из основных параметров, характеризующих аналитическую мембрану, является скорость капиллярного потока. Скорость капиллярного потока нитроцеллюлозных мембран со временем меняется, главным образом, из-за высыхания мембран при хранении. Нитроцеллюлозные мембраны можно рассматривать как губку, при этом поры губки удерживаются открытыми с помощью воды. Если воду удалить, поры разрушатся, нарушится способность мембраны к пропусканию жидкости через нее. Это приводит к изменениям и непостоянству скорости потока. Поскольку скорость непосредственно влияет на чувствительность анализа, увеличение времени проведения анализа может привести к ложноположительным результатам. Критически важным для правильной работы ЛПИА системы является способность к связыванию реагентов в строго определенных местах: тестовой и контрольной линий. Способность мембраны к связыванию белков, взаимодействие с белками и кинетика процесса связывания с белками – это параметры, определяющие возможность применения заданного набора белков для мембраны и чувствительность диагностических тестов. Белки связываются с нитроцеллюлозным материалом посредством комбинации электростатических, водородных и гидрофобных сил.

Одним из ключевых элементов для производства чувствительных и воспроизводимых диагностических систем является последовательная иммобилизация специфических реагентов в тестовой и контрольной областях. Известно, что большинство белков теряют большую часть своей иммунологической активности после пассивного связывания с поверхностью мембраны из-за своей неспособности к ковалентному или направленному связыванию с нитроцеллюлозой. Общепринятой моделью связывания белка с нитроцеллюлозой является то, что белки первоначально притягиваются к

поверхности мембраны электростатически, а окончательно связываются с поверхностью мембраны путем образования гидрофобных и водородных связей. Многие факторы влияют на процесс связывания, и их необходимо учитывать при разработке тест систем и обработке нитроцеллюлозных мембран. Некоторые из этих факторов перечислены ниже:

Выбор реагентов.

- Неспецифические белки: объемные белки (например, бычий сывороточный альбумин (БСА), казеин) конкурируют за центры связывания
- Материалы, препятствующие образованию водородных связей: формамид и мочевины мешают образованию водородной связи
- Материалы, которые мешают гидрофобным взаимодействиям: Твин и Тритон препятствуют гидрофобному связыванию
- Полимеры, такие как поливинилацетат, поливинилпирролидон и полиэтиленгликоль мешают связыванию белка.

Окружающая среда:

- Влажность должна быть оптимизирована для эффективности связывания (относительная влажность 25-50% при комнатной температуре)

Методы обработки:

- Способы дозирования: контактный против бесконтактного воздействия будет оказывать влияние на то, как белок связывается или распространяется через мембрану
- Методы сушки: сушильный шкаф при высокой температуре против сушки в окружающей среде. Время высыхания и методы могут оказывать влияние на конформацию и активность белков на мембране

Аналитическая мембрана не должна дестабилизировать связанные белки на тестовой и контрольной линиях в течение всего срока годности продукта или изменять характеристики потока в этот период. До интеграции в конечное устройство нитроцеллюлозная мембрана должна пройти несколько этапов. К ним относятся нанесение белков на тестовую и контрольную линии с помощью количественных диспенсеров, сушка с помощью сушильных шкафов и обработка блокирующим раствором. Для нанесения белков в виде полосок используют контактные или бесконтактные диспенсерные системы, затем тест-полоски блокируют с целью контроля и стабилизации скорости потока, гидратационных характеристик, а также для предотвращения неспецифических взаимодействий. Диспенсерный способ для

формирования тестовой и контрольной линий должен быть количественным и не меняться в зависимости от гидратационных или абсорбционных характеристик материала. Бесконтактный диспенсерный метод обеспечивает наилучшее количественное нанесение белков на нитроцеллюлозу. Целью обработки мембраны блокировочным раствором является предотвращение связывания белков и меченого конъюгата с мембраной в областях, отличных от тестовой и контрольной линий. Блокировка также выполняет другие функции, включающие поддержание гидратации мембраны, модификацию скорости впитывания и стабилизацию белков в тестовой и контрольной линиях. Блокировка обычно проводится путем помещения мембран в раствор, содержащий белки, поверхностно-активные вещества или полимеры. Процесс блокировки мембран должен тщательно контролироваться для обеспечения оптимальной производительности конечного продукта в течение всего срока хранения. Перед сушкой при высоких температурах, с поверхности мембран удаляют жидкость.

Правильная комбинация мембран и конкретных белков является важным фактором успешной разработки теста. При работе с различными белками характеристики нитроцеллюлозных мембран могут значительно варьироваться. На сегодняшний день доступны разные производители и бренды, выпускающие нитроцеллюлозные мембраны. Характеристики мембран обычно определяются такими параметрами, как тип полимера, используемый в мембране; размер пор; тип, количество и способ применения поверхностно-активного вещества. Размер пор мембран, используемых в ЛПИА, варьируется в диапазоне 0,05-15 микрон. «Скорость впитывания» или «скорость капиллярного потока» являются более распространенными характеристиками мембран, чем размер пор. Скорость капиллярного потока определяется как время, за которое фронт жидкости проходит на мембране расстояние 40 мм, и является спецификацией мембран, определенной производителем. Выбор скорости впитывания важен для кинетики и скорости в разработке анализа и, тем самым, влияет на эффективность и чувствительность конечного продукта.

1.1.2.3. Мембрана для конъюгата

Основные задачи мембраны для конъюгата заключаются в удержании конъюгата, поддержании стабильности в течение всего срока хранения и эффективном высвобождении при проведении анализа. На практике, вариации в нанесении конъюгата, высушивании и высвобождении из мембраны вносят значительный вклад в коэффициент вариации анализа. На чувствительность анализа также может отрицательно влиять плохое

смешивание конъюгата и высвобождение из мембраны. В зависимости от системы, предпочтительным может быть медленное или быстрое высвобождение конъюгата из мембраны. Однако, высвобождение всегда должно быть последовательным. Из-за природы используемых материалов, часто необходима предварительная обработка мембраны для конъюгата с целью обеспечения оптимального высвобождения реагента и стабильности. Предобработка проводится путем внесения мембраны в водный раствор белков, поверхностно-активных веществ и полимеров с последующей сушкой. Нанесение конъюгата на мембрану является важным этапом в разработке теста. Обычно используются два метода. Первым методом является внесение предобработанной мембраны в раствор конъюгата. Вторым методом заключается в нанесении конъюгата с помощью количественного бесконтактного диспенсера. Что касается самого конъюгата, выбор метки и метода приготовления конъюгата являются важными задачами. Наиболее часто в качестве метки используют коллоидное золото и латексные частицы. Метки могут быть связаны ковалентно или пассивно и количественно считываться. Ковалентная связь имеет решающее значение для проведения количественного анализа благодаря образованию более устойчивых связей между лигандом и частицей в отличие от адсорбционных методов.

Предпочтительными материалами изготовления мембраны для конъюгата являются стекловолокно, полиэфир или район (материал из целлюлозы). Для достижения наилучших результатов материалы должны быть гидрофильными и иметь высокую скорость потока. Большинство материалов, используемых в ЛПИА системах, являются гидрофобными по природе и, таким образом, требуют обработки. Процесс обработки аналогичен описанному ранее, включает внесение мембран в раствор с белками, полимерами и поверхностно-активными веществами с последующим высушиванием при высоких температурах. Мембрана для конъюгата должна эффективно и воспроизводимо высвобождать конъюгат в течение всего срока годности продукта. Как правило, некоторые изменения в высвобождении могут происходить из-за характера связывания конъюгата частиц с волокнами материала. Во время оптимизации анализа важно выбрать химические стабилизаторы, которые минимизируют этот эффект и обеспечат максимально эффективное высвобождение конъюгата из мембраны. Кроме того, мембрана для конъюгата не должна дестабилизировать конъюгат на протяжении всего срока годности [14]. Как правило, некоторая дестабилизация происходит из-за связующих, присутствующих в большинстве этих материалов. Поэтому оптимизация анализа включает подбор материалов, совместимых с используемым конъюгатом белка с меткой.

Производители и вопросы производства: наиболее часто используются продукты фирм Whatman (Кент, Великобритания), Ahlstrom (Хельсинки, Финляндия), Pall Gelman (Нью-Йорк, США), и Millipore (Бедфорд, США). Изменение материала может привести к непоследовательному поглощению жидкостей и конъюгатов, дестабилизации конъюгатов, плохому высвобождению и связыванию конъюгатов с гидрофобными волокнами. Для минимизации этих эффектов необходимо тщательно оптимизировать получение конъюгата, процесс предобработки мембран и нанесение конъюгата на мембрану.

1.1.2.4. Мембрана для образца

Одним из основных преимуществ концепции ЛПИА является то, что анализ проводится в один этап, при этом исследуются различные типы образцов (цельная кровь, мокрота, мясной фарш и т.д.) для различных областей применения. Роль мембраны для образца заключается в равномерном распределении образца, последующем распространении его по аналитической мембране и высвобождении аналита с высокой эффективностью. Обработка образца включает фильтрацию от частиц или эритроцитов, изменение pH образца, активное связывание компонентов образца, которые могут мешать анализу, а также разрушение компонентов матрицы, таких как муцины, для высвобождения аналита для анализа. Материал для выполнения анализа из-за неоднородности и типа связующих, которые он содержит, может оказывать большое влияние на характеристики анализа. Способ предварительной обработки мембран для образца аналогичен описанному выше и, в случае необходимости, метод должен быть тщательно отработан во избежание источников изменений, таких как градиент концентраций буфера и краевые эффекты при сушке.

Состав материала мембраны для образца зависит от требований к разрабатываемой системе. Примерами таких материалов являются целлюлоза, стекловолокно, район и другие фильтрующие материалы. Перед применением материал мембраны для образца должен быть обработан буфером для анализа и другими компонентами, а также высушен [14]. Материал мембраны должен контролироваться образом впитывать образец, а затем легко и полностью высвободить его, тем самым направляя жидкость с анализируемыми компонентами на аналитическую часть системы. Кроме того, материал мембраны для образца должен быть достаточно прочным. Важным параметром является прочность на растяжение во влажном состоянии. Мембраны для образца предобрабатывают путем внесения материала в раствор, содержащий буфер с определенным pH, поверхностно-активные вещества, блокирующие реагенты (если необходимо), добавки и другие

реагенты для повышения чувствительности анализа. В некоторых случаях, мембраны для образца и конъюгата совмещают.

1.1.2.5. Впитывающая мембрана

Основная задача впитывающей мембраны заключается в обеспечении движения реагентов по полоске. Она вытягивает всю жидкость, добавленную на мембрану для образца, и удерживает ее на время анализа.

Материал впитывающей мембраны обычно представляет собой целлюлозу высокой плотности. Выбор впитывающей мембраны обусловлен абсорбирующей способностью и стоимостью материала. Доступны разные поставщики впитывающих мембран, например, Millipore, Whatman, Ahlstrom и Pall Gelman.

1.1.3. Метки

Уникальное свойство наночастиц некоторых металлов (например, коллоидное золото) генерировать регистрируемый сигнал делает их перспективными в качестве детектирующих меток для разработки высокочувствительного ЛПИИ.

Выбор метки для конкретной ЛПИИ тест системы обусловлен множеством факторов:

1. Тип реагентов, используемых для связывания с меткой, и метод приготовления конъюгата, обеспечивающий сохранение конформации и отсутствие стерических затруднений.

2. Качественный или количественный анализ с необходимостью приборной оценки. Разработка количественного ЛПИИ требует больших усилий в выборе основных материалов и используемых технологий. Более подробно переход качественного ЛПИИ по принципу да/нет в количественный анализ будет рассмотрен ниже. Выбор метки и технологии считывания результатов обусловлен стоимостью приборов для регистрации результатов анализа, стоимостью и доступностью метки, стоимостью разработки анализа, а также производительностью комбинации метки и прибора для ее регистрации.

3. Необходимая чувствительность анализа. В визуальном ЛПИИ наибольшая чувствительность достигается с использованием коллоидного золота в качестве метки. В случае использования НЧЗ размером 20-40 нм обеспечивается высокая плотность метки и, соответственно, высокая интенсивность окраски. В тест-системах с приборной регистрацией результатов

высокая чувствительность анализа достигается путем применения в качестве метки флуоресцентных или парамагнитных частиц [15,16].

4. Если планируется разработка мультиплексного ЛПИА с различной окраской тестовых линий, то выбор метки сводится к использованию цветных латексных частиц или квантовых точек (КТ) различного размера.

Список материалов, используемых в качестве метки в ЛПИА, весьма обширен и включает наночастицы золота, цветные латексные частицы, магнитные частицы, углеродные наночастицы, наночастицы селена, наночастицы серебра, квантовые точки, люминофоры, органические флуорофоры, текстильные красители, ферменты, липосомы и другие. Любой материал, используемый в качестве метки, должен детектироваться при очень низких концентрациях и сохранять свои свойства при конъюгации с биомолекулами. Также необходимо, чтобы процесс конъюгации не приводил к изменениям свойств распознающих биомолекул. Хорошая метка должна обладать такими свойствами, как легкость получения конъюгата с биомолекулами и стабильность в течение длительного периода времени.

После проведения анализа некоторые метки генерируют прямой сигнал (например, появление красной окраски коллоидного золота), в то время как другие требуют дополнительных стадий для получения аналитического сигнала (например, ферменты производят детектируемый продукт после реакции с подходящим субстратом). Следовательно, метки, которые обеспечивают прямой сигнал, предпочтительнее для применения в ЛПИА, т.к. позволяют проводить анализ быстро, без дополнительных стадий. Более подробно свойства используемых в ЛПИА меток рассмотрены ниже.

1.1.3.1. Латексные частицы

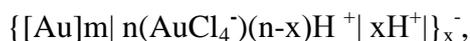
Первой меткой, которую использовали в иммунохроматографии, были латексные частицы, представляющие собой частицы из полистирола, полиметакрилата и других полимерных материалов. Основными требованиями, предъявляемыми к латексным меткам для использования их в иммуноанализе являются: размер метки в диапазоне 50-500 нм; узкое распределение по размерам; наличие функциональных групп для химического связывания Ат и Аг; устойчивость к агрегации, в том числе в средах с высокой ионной силой, например, в физиологических растворах.

Часто в ЛПИА используют латексные частицы в комбинации с метками разных типов, например, красителями, флуорофорами, магнитными наночастицами и т.д. В этом случае метку иммобилизуют на поверхности частицы, либо включают в объем частицы

при синтезе и диспергировании. В настоящее время коммерчески доступны латексные частицы, меченные флуорофорами [17]. Одним из преимуществ латексных частиц является возможность концентрировать большое количество метки, что приводит к усилению аналитического сигнала. Также к преимуществам латексных частиц следует отнести возможность объединения в их составе меток разных цветов, что может использоваться в мультиплексном анализе различных аналитов, а также сочетать метки разного типа (например, флуорофоров и магнитных наночастиц) [18].

1.1.3.2. Наночастицы золота

Наночастицы золота (НЧЗ) являются самой популярной меткой в быстрых тестах [19]. Первое применение конъюгата НЧЗ с Ат в иммуноанализе было описано в 1981 г. [20]. Коллоидная частица золота представляет собой кристаллическое ядро $[Au]_m$ с адсорбированными на поверхности ионами $AuCl_4^-$, определяющими отрицательный заряд частицы. $AuCl_4^-$ ионы образуют внутренний слой двойного ионного (электрического) слоя и определяют величину потенциала адсорбции. Часть ионов H^+ находится в адсорбционной области, а другая часть – в диффузной области двойного электрического слоя. Условно мицеллу золота можно изобразить следующим образом [21]:



где $[Au]_m$ – ядро мицеллы, m – число атомов золота, которое может варьироваться от нескольких сотен до миллионов, n – количество адсорбированных ионов $AuCl_4^-$ ($n \ll m$).

Методы синтеза коллоидного золота можно подразделить на две группы – дисперсионные и конденсационные методы. В основе дисперсионных методов лежит разрушение кристаллической решетки металлического золота под действием электрического тока высокого напряжения [22]. Однако, большее распространение получили конденсационные методы. Они основаны на восстановлении галогенидов золота (например, $HAuCl_4$) с использованием химических восстановителей и/или ультразвукового или ультрафиолетового облучения. В качестве химических восстановителей выступают различные органические и неорганические соединения. На сегодняшний день, наиболее популярным протоколом получения коллоидного золота является цитратное восстановление $HAuCl_4$, предложенное в работах Боровской [23], Туркевича [24] и Френса [25], которое позволяет получать относительно монодисперсные частицы с контролируемым диаметром от 10 до 100 нм.

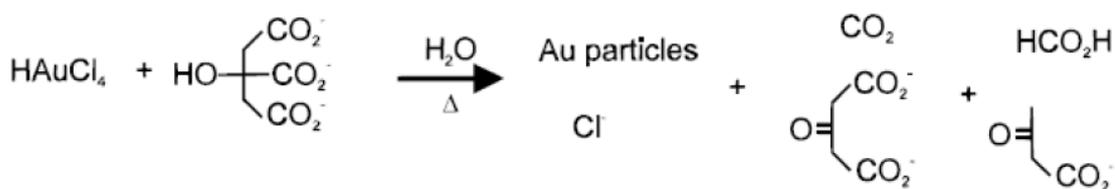
Классическая модель Сведберга описывает синтез коллоидного золота как трехступенчатый процесс:

- 1) Восстановление около 30% ЗХВК с образованием высокопересыщенного раствора восстановленного золота;
- 2) Резкое замедление процесса восстановления, сопровождающееся конденсацией новой фазы с образованием «зародышей» размером менее 2 нм. Раствор при этом приобретает синюю окраску, что можно объяснить флокуляцией части образовавшихся частиц. Восстановление золота и рост этих частиц происходит медленно до достижения ими критического размера, примерно 2 нм. После этого, сформировавшиеся частицы становятся центрами конденсации для дальнейшего восстановления золота;
- 3) Процесс восстановления ускоряется, после завершения которого раствор приобретает ярко-красную окраску.

Согласно схеме цитратного восстановления золотохлористоводородной кислоты (ЗХВК), процесс окисления цитрата идет до ацетондикарбоксилата и углекислоты. В этом случае, суммарную реакцию восстановления ЗХВК цитратом можно записать [26]:



Миркин с соавторами [27] предложили другую схему процесса окисления цитрата, при этом, все продукты реакции, кроме углекислого газа, служат восстановителями хлорауратов:



Для получения частиц меньшего размера используют другие восстановители, например смесь боргидрида и этилендиаминтетрауксусной кислоты (5 нм) [28] или калий/натрий тиоцианата (1-2 нм) [29]. Наночастицы размером больше 100 нм могут быть получены методом, описанным в работе [30]. Золь НЧЗ с узким распределением по размеру может быть получен путем добавления в раствор HAuCl_4 золотых зародышей, на поверхности которых происходит конденсация. В этом методе в качестве восстановительных агентов используется цитрат натрия или гидроксилламин. Изодисперсные и изоморфные золи могут быть получены только тогда, когда отсутствует

вероятность образования новых ядер. Как правило, это достигается путем проведения синтеза в два этапа. Первоначально, зарождается новая фаза, а затем в золе создается слабое пересыщение, благодаря которому больше не образуются новые ядра, а растут уже сформировавшиеся. НЧЗ обладают уникальными физическими свойствами, которые зависят от их размера, формы и расстояния между частицами. Одним из главных преимуществ золота как метки является отсутствие токсичности, что тем самым упрощает его биологическое применение.

Функционализация НЧЗ различными биофункциональными группами (например, амфифильные полимеры, силанолы, сахара, нуклеиновые кислоты и белки) достигается благодаря афинности между поверхностью золота и тиольными группами [19]. АТ также прочно связываются с поверхностью наночастиц за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий (рис. 3). На качество связывания и, соответственно, интенсивность окраски влияют размер и качество золотых наночастиц [31]. Оптимальное связывание антител с поверхностью НЧЗ достигается путем подбора рН раствора коллоидного золота и концентрации АТ. Стабильность НЧЗ в растворе зависит от электростатического отталкивания между частицами, поэтому наличие ионных веществ может вызывать агрегацию частиц из-за больших сил притяжения. В этом случае цвет раствора меняется с красного на синий [32,33]. Поскольку в основе процесса иммобилизации АТ на поверхности золотых наночастиц лежит вклад электростатического эффекта, рН раствора коллоидного золота обычно регулируют перед добавлением антител, а количество конкретного белка, адсорбированного на поверхности наночастиц, достигает максимума в его изоэлектрической точке (рI) или на 0,5 единицы рН выше, чем рI [33]. Столь широкое применение НЧЗ в ЛПИА связано с его низкой стоимостью и стабильностью в высушенной форме.

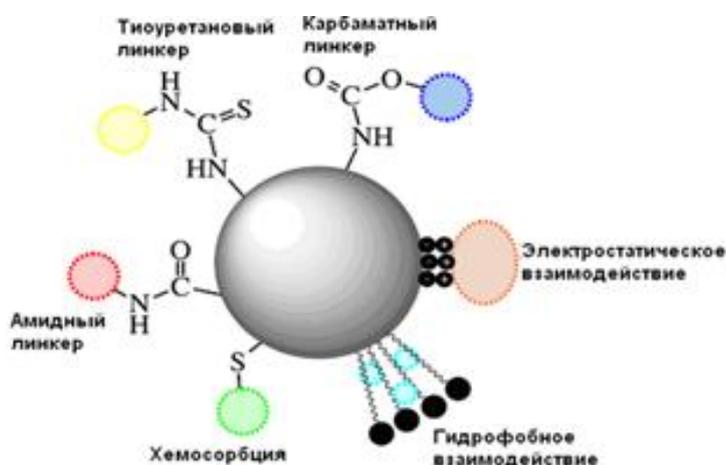


Рис. 3. Способы функционализации НЧЗ для биомедицинского применения [34].

Форма, размер и стабильность НЧЗ являются ключевыми параметрами для разработки высокочувствительной ЛПИА тест-системы. Окраска золотых наночастиц, являющаяся основой их применения в качестве метки, обусловлена поверхностно-плазмонным резонансом, связанным с коллективным возбуждением электронов проводимости [13]. Цвет метки и длина волны, соответствующая максимуму поглощения, зависят от размера и формы наночастиц, которые контролируются в процессе приготовления коллоидного раствора. Согласно литературным данным, экспериментальная работа с частицами размером, превышающим 60-70 нм, затруднена в связи с проблемами стабильности коллоидного раствора [20]. Баланс между электростатическим отталкиванием и силой Лондона-Ван-дер-Ваальса внутри частиц поддерживает образование коллоидных НЧЗ. Отношение объема золотых наночастиц к объему образца напрямую влияет на интенсивность сигнала тестовых линий. Более высокое отношение объема НЧЗ/образца обеспечивает больше иммуноконъюгатов золотых наночастиц для захвата аналита в образце, что, тем самым, приводит к формированию более сильного сигнала в аналитической зоне тест-полоски. Диаметр и распределение НЧЗ определяют с помощью метода просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Однако, из-за препаративной сложности электронной микроскопии, чаще используют спектрофотометрический метод, основанный на известной зависимости максимума поглощения света НЧЗ от размера частиц [35,36]. В таблице 1 приводятся экспериментальные данные для определения размера НЧЗ в диапазоне 5-50 нм, полученных методом Френса [28]. Так, например, характерный пик поглощения НЧЗ размером 20 нм, обычно используемых в качестве метки ЛПИА, наблюдается при 522 нм. После процесса конъюгации с биомолекулами наблюдается смещение характеристического пика поглощения НЧЗ, что доказывает образование комплекса наночастиц с Ат.

Таблица 1. Максимумы поглощения растворов коллоидного золота в зависимости от размера частиц [28].

Средний размер НЧЗ	5	10	15	20	25	30	40
Пик поглощения, нм	513	516	519	522	524	526	536

Приготовление конъюгатов НЧЗ с биомолекулами является стандартной методикой для разработки иммунохроматографических тестов и используется в различных областях (т.е., в «point-of-care» диагностике, контроле за окружающей средой и продуктов питания). Однако, часто возникает проблема, связанная с низкой чувствительностью метки. Оптический сигнал, генерируемый НЧЗ в ЛПИИА, можно усилить с помощью нескольких подходов:

- 1) модификация НЧЗ без дальнейшего усложнения процедуры анализа;
- 2) повышение чувствительности путем введения дополнительных стадий в процедуру анализа. Как правило, стадия усиления сигнала реализуется после стандартной процедуры ЛПИИА на основе НЧЗ. Таким образом, ЛПИИА становится многоступенчатым методом.

1.1.3.2.1. Модификация наночастиц золота

Модификация НЧЗ позволяет повысить чувствительность метода без введения дополнительных стадий анализа. В работе [37] проведены теоретические расчеты и показано, что замена НЧЗ размером 15 нм на конъюгат кремниевых частиц, покрытых золотыми наноболочками, позволяет повысить чувствительность определения IgG кролика до 1000 раз.

Тест-полоски на основе серебряных частиц, покрытых НЧЗ, в качестве метки показали значительное усиление сигнала для определения афлатоксина В1 по сравнению с традиционным ЛПИИА на основе НЧЗ [38]. Данный подход позволяет разработать чувствительный, простой, быстрый (менее 15 минут) ЛПИИА без множественных процедур меченя и дополнительных стадий анализа.

Применение детектирующего реагента, состоящего из магнитных нанозолотых микросфер состава нано-Fe₂O₃ (ядро) и золотых наночастиц (оболочка), для ЛПИИА афлатоксина В2 позволило повысить чувствительность в три раза по сравнению с обычными НЧЗ [39]. Качественный результат (по принципу да/нет) детектируется через 15 минут без необходимости использования дорогого оборудования.

Для разработки высокочувствительного анализа без дополнительной стадии усиления сигнала предложен ЛПИИА на основе двойных золотых наночастиц. В этой системе первый конъюгат состоит из антител против анализируемого соединения, меченных золотыми наночастицами, а второй – конъюгат с НЧЗ, связывающий только первый конъюгат. При этом диаметр НЧЗ в первой иммунопробе – маленький, а во второй

– больше. Показано, что данный подход позволяет повысить чувствительность анализа до 100 раз [40,41].

До недавнего времени в биомедицинских исследованиях использовались коллоидные НЧЗ сферической формы. Однако, за последние несколько десятилетий были разработаны методы синтеза наностержней и оболочек, а также НЧЗ нетривиальной формы, таких как нанозвезды, наноклетки и т.д. [42]. При присоединении к поверхности лигандов, свойства наночастиц позволяют разрабатывать новые биомедицинские технологии для определения и лечения заболевания [43]. Популярными являются направления их использования в качестве контрастных агентов, сенсоров для определения маркеров заболевания и транспортного средства для доставки лекарств. Каждый класс наноматериалов обладает уникальным набором свойств, которые могут быть использованы для разработки в различных областях. Главное преимущество НЧЗ нетривиальной формы состоит в возможности настройки плазмонного резонанса от красной (примерно 600 нм) до ближней инфракрасной (ИК) области.

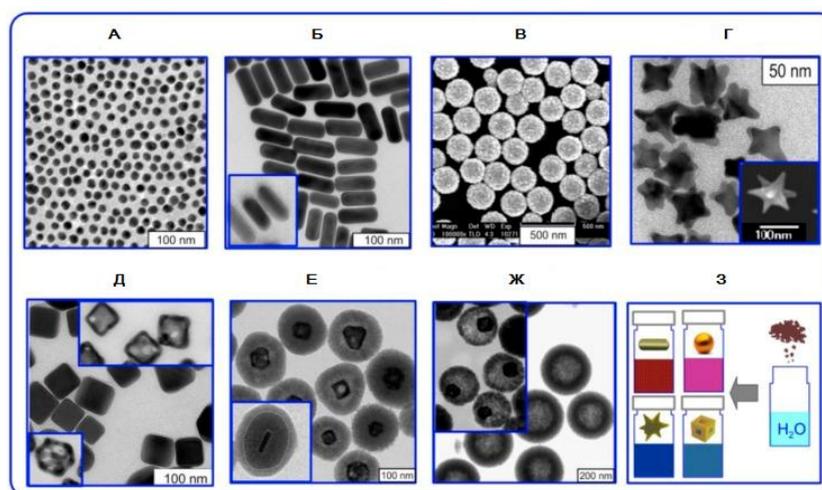


Рис. 4. Примеры плазмонных НЧЗ: золотые наносферы 16 нм (А); золотые наностержни и золотые наностержни с серебряным покрытием (Б); оболочка SiO₂/Au на ядрах двуоксида кремния (В); золотые нанозвезды (Г); серебряные нанокубики и нанокубики состава золото-серебро (Д); наноконпозиты, содержащие ядро из наностержня или наноклетки и мезопористую оболочку из диоксида кремния, связанную с гематопорфирином (Е); полые мезопористые сферы кремния и нанозерна, содержащие золотые наноклетки (Ж); плазмонные нанопорошки из золотых наносфер, наностержней, нанозвезд и наноклеток состава золото-серебро (З) [45].

Наночастицы, у которых плазмонный резонанс сдвинут в ближнюю ИК-область спектра, где ткань относительно прозрачна, особенно ценны для биомедицинских приложений [44]. На рисунке 4 изображены НЧЗ и нанокompозиты, полученные и доступные на сегодняшний день для аналитических, диагностических и терапевтических исследований [45].

В работе [46] получили НЧЗ в форме цветов, а также разработали ЛПИА с использованием таких наночастиц в качестве метки (рис. 5) для определения *E. coli* O157:H7. Иерархическая структура наночастицы золота с шероховатой поверхностью и большим отношением площади поверхности к объему по сравнению со сферической структурой золота является более благоприятной для адсорбции антител на поверхности. Была получена серия образцов НЧЗ с разной морфологией поверхности частиц, в качестве стабилизирующего агента в синтезе использовали полидиаллилдиметиламмоний хлорид. Показано, что применение наночетов в качестве метки позволяет повысить визуальную оценку результатов (качественный анализ) и чувствительность количественного определения аналита. Предел обнаружения составил 10^3 КОЕ/мл, что превосходило результаты традиционного ЛПИА с использованием НЧЗ в качестве метки.

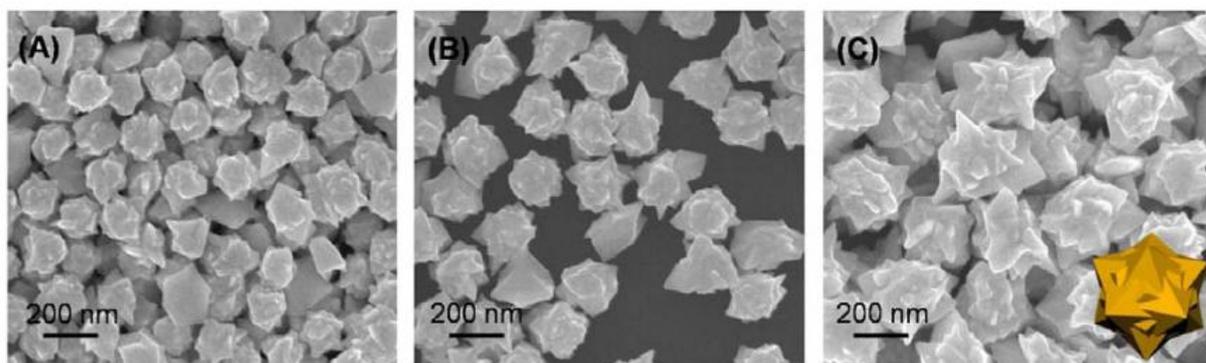


Рис. 5. Изображения НЧЗ в форме цветов с разным количеством зародышевого раствора (20 нм) – 0,13 (А); 0,07 (В) и 0,02 мл (С), полученные методом сканирующей электронной микроскопии [46].

1.1.3.2.2. Методы усиления сигнала, генерируемого НЧЗ

Простым и эффективным путем повышения чувствительности традиционного ЛПИА на основе 20 нм сферических золотых наночастиц является метод усиления серебром [39,47-49]. Усиление сигнала с помощью формирования серебряной оболочки вокруг НЧЗ применяется в качественных и количественных биосенсорных методах в сочетании с различными методами детекции, такими как колориметрический, электрохимический, гравиметрический, хемилюминесцентный и рамановская

спектроскопия [50]. Данный метод основан на восстановлении ионов серебра на поверхности золотых наночастиц с последующим усилением сигнала в тестовой зоне полоски (рис. 6). Принцип усиления сигнала на основе осаждения серебра на поверхности наночастиц редко применялся в иммуноанализе, кроме работы Гупта и др., в которой описана модель сэндвич-анализа, проводимого на стеклянных слайдах. После проведения анализа, сигнал от НЧЗ усиливали серебром, полученные изображения наблюдали на оптическом микроскопе и определяли методом денсиметрии [51]. Несмотря на новизну подхода, процедура иммуноанализа включала несколько утомительных этапов из-за необходимости вымывания непрореагировавших реагентов после каждой инкубации. За последние годы метод усиления серебром был усовершенствован и адаптирован для применения в ЛПИИ. Метод усиления серебром, как правило, позволяет повысить чувствительность до 500 раз [52].



Рис. 6. Схема ЛПИИ, усиленного серебром: 1) добавление анализируемого образца на мембрану; 2) нанесение усиливающего раствора на аналитическую мембрану, содержащую НЧЗ; 3) формирование серебряного слоя на поверхности НЧЗ, изменение красной окраски линий на контрастную, черную.

Впервые ЛПИИ с последующим усилением сигнала, реализованный с помощью двух мембран, пропитанных нитратом серебра и восстановителем, был описан в работе Янга и соавторов [48]. В работе использовалась сэндвич-схема проведения анализа с Ат, мечеными НЧЗ. После появления окрашенных линий, формируемых мечеными компонентами, на тест-полоску помещали две дополнительные мембраны, содержащие нитрат серебра и гидрохинон, соответственно. Мембраны затем увлажняли, в результате чего красные линии на полоске переходили в контрастные, черные, за счет формирования серебряного слоя на поверхности красных коллоидных НЧЗ. Чувствительность иммунохроматографического теста с использованием данной технологии для определения

токсина абрина-а в воде или соевом молоке возросла в 100 раз, предел обнаружения составил 0,1 нг/мл.

Повышение чувствительности за счет реализации подхода усиления серебром после проведения традиционного ЛПИА на основе коллоидного золота в качестве метки было также подтверждено в работе [53], где провели сравнение пределов обнаружения с применением наиболее часто используемых наночастиц для модельной биотин-стрептавидин системы. Показано, что наиболее подходящими сигнальными репортерами для ЛПИА являются черные углеродные наночастицы; затем, НЧЗ, усиленные серебром; сами НЧЗ; и латексные частицы. Согласно этому исследованию, усиление серебром позволяет в 10 раз повысить чувствительность анализа по сравнению с применением обычных НЧЗ. Тем не менее, главным недостатком метода усиления серебром является нестабильность используемых реагентов и их чувствительность к свету, необходимость проведения дополнительных процедур анализа, а также промывка тест-полосок для удаления мешающих ионов (например, хлорид-ионы), что, соответственно, ведет к увеличению времени проведения тестирования.

В исследовании [54] предложили применение нового «сенсibilизатора» в тест-системе для определения ХГЧ. В тестовой зоне полоски иммобилизовали мАт к α -субъединице фолликулостимулирующего гормона, на мембрану для конъюгата наносили конъюгат мАт к ХГЧ с НЧЗ. После стандартной процедуры ЛПИА на аналитическую мембрану наносили «сенсibilизатор». Сенсibilизатор состоял из конъюгата первичных Ат (мАт к α -субъединице фолликулостимулирующего гормона) с НЧЗ и Аг. Усиление сигнала происходило в результате связывания Аг в сенсibilизаторе вторичными Ат иммунокомплекса в тестовой зоне полоски. Показано повышение чувствительности ЛПИА ХГЧ с использованием «сенсibilизатора» в 40 раз по сравнению со стандартным ЛПИА ХГЧ на основе золотых наночастиц.

Применение НЧЗ в качестве метки, усиленных ферментом, пероксидазой хрена (ПХ), позволяет повысить оптический сигнал. Пионерская работа с использованием двойной метки (золотые наночастицы-ПХ) была проведена для определения ДНК генома человека, при этом предел обнаружения составил 50 пМ ДНК [55]. Позднее, система двойной метки была оптимизирована путем введения додецилсульфата натрия, улучшившего иммобилизацию тиолированной ДНК и ПХ на поверхности золотых наночастиц. Предел обнаружения с использованием оптимизированной системы снизился в 1000 раз по сравнению с первой работой [56]. После проведения стандартного ЛПИА и обработки результатов с помощью отражательного фотометра, строили калибровочную

кривую, соответствующую метке коллоидного золота. Затем полоски погружали в раствор субстрата ПХ, промывали и снова обрабатывали результаты. После обработки хромогенным субстратом, на полоске появлялось темное окрашивание с усиленным, по сравнению с немодифицированными НЧЗ, сигналом. Пароло с соавторами сравнили три различных субстрата [20]. Пределы обнаружения иммуноглобулина G (IgG) с использованием субстратов 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), 3-амино-9-этилкарбазол и 3,3'-диаминобензидин тетрагидрохлорида составили 200 пг/мл, 310 пг/мл и 2000 пг/мл, соответственно. Предел обнаружения IgG для стандартного ЛПИИ на основе НЧЗ – 500 пг/мл.

В работах [57,58] предложен ЛПИИ на основе золотых наночастиц с усилением сигнала, реализуемый путем добавления гидросиламина, который восстанавливает Au^{3+} ионы до металла. После проведения стандартного ЛПИИ с использованием золотых наночастиц, нитроцеллюлозную мембрану с проявившимися полосками обрабатывали раствором хлорида золота с гидросиламином в течение 2 минут. Усиление аналитического сигнала в данном случае происходило за счет образования кластеров золота вокруг конъюгата антител, меченных золотыми частицами. Предложенный подход позволил повысить чувствительность определения исследуемого аналита в 10-100 раз.

В исследовании [59] предложена новая схема усиления сигнала с целью повышения чувствительности иммунохроматографического анализа. Метод основан на непрямом введении метки в иммунокомплекс, образованный через модуль биотин-стрептавидин. Регистрируемый сигнал (окраска тестовой зоны) усиливался путем множественного связывания метки. В процессе анализа, биотинилированные Ат взаимодействовали с конъюгатом стрептавидина и золотых наночастиц, а добавление биотинилированного белка, БСА, способствовало агрегации метки. Предел обнаружения стрептомицина в разработанном анализе составил 30 нг/мл. Характеристики предложенного метода превосходили характеристики стандартного конкурентного ЛПИИ с использованием Ат, напрямую связанных с меткой.

В работе [60] описан ЛПИИ на основе двойного связывания Ат для определения аутоантител к тирозинфосфатазоподобному белку, маркеру диабета 1 типа, в образцах сыворотки человека. В данном исследовании аутоантитела к тирозинфосфатазоподобному белку формировали «мост» между биотинилированными Ат к тирозинфосфатазе на одном связывающем участке и полигистидин-мечеными Ат к тирозинфосфатазе на другом участке. В тестовой зоне полоски мАт к полигистидиновой метке связывали полигистидиновую метку, а биотин обеспечивал детекцию комплекса путем связывания

со стрептавидином, меченым НЧЗ. В случае присутствия в сыворотке аутоантител к тирозинфосфатазоподобному белку, они взаимодействовали с биотинилированными и полигистидин-мечеными Ат к тирозинфосфатазе. В свою очередь, биотин, присутствующий в комплексе, связывал конъюгат стрептавидина с НЧЗ в течение предварительной 30-минутной инкубации в лунке. Затем смесь наносили на мембрану для образца, комплекс связывался с иммобилизованными в тестовой линии Ат с образованием более сложного комплекса, обеспечивающего фиолетовое окрашивание на полоске. Описанный ЛПИА проводился в течение 45 минут, так как включал стадию инкубации образца с мечеными компонентами. Показана сравнимая чувствительность предложенного метода с ИФА и РИА для определения аутоантител к тирозинфосфатазоподобному белку.

1.1.3.3. Углеродные наночастицы

Черный цвет углеродных наночастиц детектируется визуально с высокой чувствительностью. Впервые углеродные наночастицы были введены в качестве метки для быстрого иммунохимического тестирования в 1993 г. [7]. Подготовка, функционализация и применение такой метки для создания быстрого иммунотеста описаны в работе [61]. Главные преимущества углеродных наночастиц заключаются в их дешевизне, доступности в больших количествах, а также в простоте проведения количественного анализа путем обработки «серого пикселя», т.к. тест-полоска после проведения анализа представлена в черно-белом цвете. Благодаря высокому молярному коэффициенту поглощения углеродных частиц, детектируемыми концентрациями чистых частиц с использованием сканера являются $0,04 \text{ нг/мм}^2$ ($0,02 \text{ амоль/мм}^2$) и $0,2 \text{ нг/мм}^2$ ($0,1 \text{ амоль/мм}^2$) для визуального контроля [62]. Лоннберг и Карлссон сравнили результаты с полученными данными для ферментных меток: хемилюминесцентный сигнал $0,02 \text{ амоль/лунка}$ получен для щелочной фосфатазы с использованием субстрата (DuoLuX), флуоресцентный сигнал $0,3 \text{ амоль/лунка}$ - для β -галактозидазы и субстрата (4-метилумбеллиферил- β -D-галактозид), цветной сигнал 5 амоль/лунка наблюдался для пероксидазы с субстратом (тетраметилбензидин).

В работе предложен сэндвич-формат ЛПИА для определения ДНК последовательности [63]. Модифицированную аминной группой ДНК пробу ковалентно иммобилизовали на многослойных углеродных нанотрубках через диимид-активированное амидирование между карбоксильными группами углеродных нанотрубок и аминными группами ДНК. Результат анализа выявляли в виде характеристической

окраски углеродных нанотрубок. Предложенный метод ЛПИИА позволил выявлять 0,1 нМ целевой ДНК без приборов. Применение больших углеродных черных нанонитей (размер которых соответствует 200 нм сферическим наночастицам золота) в сочетании с чувствительным сканирующим прибором позволило повысить чувствительность определения эритропоэтина в моче в 50-100 раз по сравнению с ИФА и традиционным ЛПИИА с использованием НЧЗ размером 20 нм [64].

1.1.3.4. Другие наночастицы и материалы

Наночастицы Fe_3O_4 применяют в качестве метки в основном из-за их магнитных свойств. Кроме этого, оптические свойства такой метки позволяют ее использовать в качестве цветной метки в ЛПИИА. К недостаткам Fe_3O_4 наночастиц следует отнести:

1. Спектр поглощения Fe_3O_4 наночастиц – широкий, охватывает почти весь видимый диапазон из-за внутризонного перехода
2. Коричневое окрашивание, формируемое Fe_3O_4 наночастицами на тест-полосках, на белом фоне аналитической мембраны выглядит менее контрастно, чем красное окрашивание, формируемое НЧЗ.

Тем не менее, интегральный молярный коэффициент поглощения нанокристаллов Fe_3O_4 в диапазоне видимого света сопоставим со значением для золотых наночастиц. Более того, процесс агрегации не меняет абсорбционные свойства Fe_3O_4 наночастиц, чего не скажешь о свойствах золотых частиц [65,66]. Fe_3O_4 наночастицы использовались в качестве метки в ЛПИИА для определения пестицида, метилпараоксона, предел обнаружения составил 70 нг/мл. Интересно, что применение агрегатов Fe_3O_4 наночастиц вместо обычных Fe_3O_4 наночастиц позволяет снизить предел обнаружения метилпараоксона более чем в 40 раз, достигая при этом значения 1,7 нг/мл. Формирование агрегатов Fe_3O_4 наночастиц происходило путем ковалентного связывания между карбонильными группами на поверхности индивидуальных наночастиц Fe_3O_4 с аминокетильными группами в повторяющихся звеньях поли-L-лизина [66]. Еще одним преимуществом этой метки является возможность детектирования оптического и/или магнитного сигналов без дополнительных стадий анализа.

Для определения липопротеина А в плазме использовали визуальный ЛПИИА на основе красно-оранжевых наночастиц селена (максимум оптического поглощения при 540 нм) [67]. На аналитическую мембрану сорбировали специфические Ат одинаковой концентрации в виде четырех тестовых линий. Анализ проводился путем соотнесения количества проявившихся тестовых линий с диапазоном концентраций исследуемого

аналита. С помощью предложенной иммунохроматографической системы с использованием наночастиц селена определяли липопротеин А в сыворотке, плазме и цельной крови человека в пяти диапазонах концентраций: менее 40 мг/л; от 40 до 70 мг/л; от 70 до 120 мг/л; от 120 до 180 мг/л и более 180 мг/мл. Воспроизводимость теста сохранялась в течение 5 месяцев. Однако, авторы не проводили сравнения наночастиц селена с другими метками, поэтому сложно делать выводы о перспективности предложенной метки в ЛПИА. С 1993 г. применение наночастиц селена в быстрых тестах не описывалось.

Платиновые наночастицы обладают пероксидазной активностью и благодаря своей высокой термостабильности используются в разработке ЛПИА [68,69]. Активность пероксидазы снижается на 50% через 7 дней и на 80% через 3 недели. При использовании платиновых частиц теряется только 5 % от первоначальной активности. Подход для усиления сигнала в предложенной биосенсорной системе основывался на пероксидазоподобной активности платиновых наночастиц по отношению к раствору ТМБ. Парк с соавторами показали повышение чувствительности в 1000 раз для предложенного ЛПИА ХГЧ на основе хемилюминесцентной реакции платиновых наночастиц по сравнению с ЛПИА с использованием НЧЗ в качестве метки [69].

1.1.3.5. Люминесцентные наночастицы

На сегодняшний день широко используются в исследованиях и клинической диагностике системы с детекцией люминесценции, поскольку они обладают высокой чувствительностью и позволяют использовать несколько меток с разными спектральными характеристиками (мультиплексный анализ). В некоторых случаях, чувствительность, обеспечиваемая использованием люминесцентной метки в ЛПИА, сравнима с чувствительностью ИФА, но процедура анализа существенно проще. Поскольку химическая природа люминесцентных меток с аналогичными оптическими свойствами может отличаться, их классифицируют в соответствии с принципом люминесценции.

1.1.3.5.1. Флуоресцентные красители

Простейшим видом люминесцентных меток являются одномолекулярные флуоресцентные органические красители. Исторически, флуорофоры (например, флуоресцеин, родамины и цианиновые красители) применяли в качестве клеточных и тканевых меток в флуоресцентной микроскопии и клеточной биологии [70]. На сегодняшний день доступны несколько серий красителей с улучшенными

флуоресцентными характеристиками (высокий квантовый выход, относительно большое значение стоксова сдвига, химическая и фото-стабильность). Такие красители потенциально могут быть использованы в качестве флуоресцентной метки для быстрых тестов, однако для обработки результатов тестирования необходимо наличие специальных приборов. Важно отметить, что применение флуоресцентных меток в мембранных тестах осложняется высоким светорассеянием, вызванным мембранным носителем. Свой вклад также вносит внутренняя флуоресценция белков (антител), компонентов пробы и аналитов (например, полициклические ароматические углеводороды и некоторые микотоксины). Недостатками флуоресцентных красителей по сравнению с наночастицами являются низкая фотостабильность, влияние окружающей среды и концентрационное гашение (тушение) флуоресценции [70].

Для увеличения яркости метки носитель сначала связывают с несколькими флуоресцентными красителями, а затем с иммунореагентами. Высокое отношение метки к антителу приводит к значительному повышению сигнала по сравнению с конъюгатом Ат, меченных НЧЗ. Другим путем повышения интенсивности флуоресценции является введение органических флуоресцентных красителей в частицы (например, полистирол). На сегодняшний день такие микросферы коммерчески доступны (FluoSpheres, Invitrogen). Похожим образом можно использовать кремниевые частицы с красителем [71]. Такие подходы обеспечивают яркость метки, однако не решают проблемы, связанной с широким спектром излучения и малым стоксовым сдвигом, что приводит к возникновению перекрестных помех между сигналами возбуждающего и флуоресцентного излучений.

В ряде работ описано применение красителя Alexa Fluor 647 в ЛПИА для определения простат-специфического Аг (ПСА) [72], С-реактивного белка [73] и сывороточного альбумина в цельной крови [74], при этом отсутствует влияние ее компонентов на характеристики анализа, что особенно важно для «point-of-care» диагностики. Аналогичный тест на основе конкурентного формата был разработан для определения альбумина в моче, показавший хорошую корреляцию с более сложными и длительными методами [75]. В работе [76] представлен новый флуоресцентный иммуночип для определения тиреотропного гормона в цельной крови. Система сочетает в себе технологию ЛПИА и состоит из полоски в одноразовом чипе, покрытой моноклональными Ат против тиреотропного гормона, буферного раствора, содержащего поликлональные антитела (пАт) против тиреотропного гормона, меченные флуоресцентным красителем, калибровочного чипа и лазерного флуоресцентного сканера. Линейный диапазон определяемых концентраций составил от 1 до 100 мкМЕ/мл.

Для мониторинга окружающей среды был предложен ЛПИА на основе флуоресцентного красителя для количественного определения микроцистинов в поверхностных водах [77]. В работе сравнивали чувствительность и воспроизводимость систем для определения низкомолекулярных аналитов на основе иммобилизованных антител (конкурентный формат) и иммобилизованного Ag (ингибиторный формат). Показано, что ингибиторный формат проведения ЛПИА обладает лучшими характеристиками, чем конкурентная схема ЛПИА. Пределы обнаружения микроцистинов для ингибиторного и конкурентного форматов составили 47,23 пг/мл и 95,38 пг/мл, соответственно. Для получения количественных результатов использовали прибор собственной сборки [77] и коммерческий (i-CHROMA, BioditechMed, Корея) лазерный флуоресцентный сканер. Устройство FLORIDA от Cibitest состоит только из лампы возбуждения флуоресценции, а результат анализа оценивается визуально. Embedded Systems Engineering (Германия) создала миниатюрный конфокальный оптический сенсор, который может быть настроен для количественной оценки результатов от широкого спектра флуоресцентных меток.

В работе [78] был получен новый флуоресцентный краситель для разработки быстрой диагностической системы с целью определения вируса птичьего гриппа. Флуоресцентную метку на основе красителя Red-53 синтезировали путем алкилирования латексных частиц, покрытых аминогруппами, по атому азота аллилбромидом с использованием двух разных «линкеров» - связок, лизина и аргинина. После этого, готовили конъюгат mAb к вирусу гриппа с полученной меткой. Характеристики быстрого иммунохроматографического теста на основе Red-53 для определения вируса птичьего гриппа (A/H5N3) превосходили в 4 и в 16 раз характеристики, полученные с помощью флуоресцентного ЛПИА с использованием хелатов европия в качестве метки и коммерческого быстрого иммунохроматографического теста, соответственно. Фотостабильность красителя Red-53 – выше, чем у флуоресцеин изотиоцианата, сильный флуоресцентный сигнал сохраняется до 8 минут под ультрафиолетовыми лучами. Таким образом, показано, что краситель Red-53 является потенциальной меткой для создания быстрых флуоресцентных диагностических систем.

1.1.3.5.2. Квантовые точки

Квантовые точки (КТ) – полупроводниковые неорганические нанокристаллы размером 2-10 нм. КТ являются идеальной флуоресцентной меткой и широко используются для разработки высокочувствительного ЛПИА благодаря своим свойствам,

таким как: узкий спектр излучения, широкий диапазон возбуждения и высокий флуоресцентный квантовый выход. КТ ярко люминисцируют, энергетический спектр частиц зависит от размера, они стабильны и имеют высокое отношение сигнал/шум. Яркость и стабильность КТ позволяет их количественно детектировать с высокой чувствительностью.

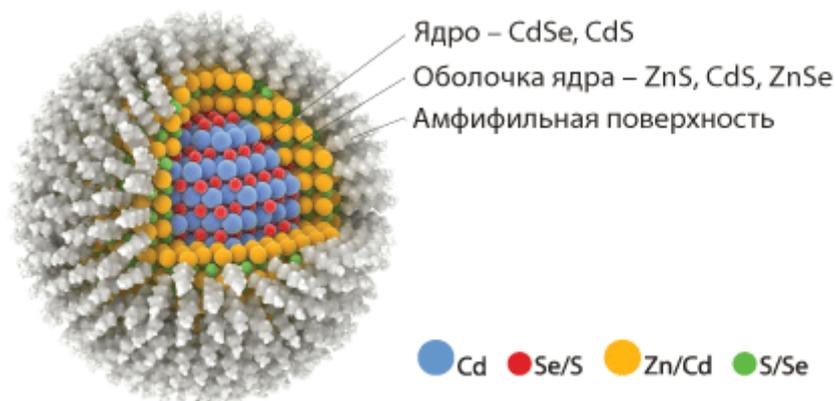


Рис. 7. Схематическое строение КТ состава ядро-оболочка [79].

На сегодняшний день синтезированы и широко используются в диагностических целях различные типы КТ, состоящие из ядра (например, CdSe, CdTe, HgSe или PbSe) и оболочки (например, InP, InAs, GaAs, GaN, ZnS и ZnSe) (рис. 7). Наиболее популярным составом ядра для биоаналитического применения является CdSe, поскольку КТ с разным размером излучают свет в видимом диапазоне спектра. Обычно радиус ядра CdSe варьируется в диапазоне от 1 до 6 нм, который, как известно, меньше радиуса экситона Бора (для CdSe он составляет 6 нм). Путем варьирования диаметра КТ можно изменять цвет испускаемого частицей света. Однако, непокрытые нанокристаллы CdSe имеют недостаточно высокий квантовый выход и нестабильны в водном растворе из-за поверхностных ловушек [80]. Показано, что покрытие нанокристаллического ядра неорганическими материалами с большей шириной запрещенной зоны (оболочка) повышает фотолюминесцентный квантовый выход путем пассивации поверхностных состояний и локализации электрон-дырочной пары внутри ядра. В качестве оболочки обычно используют широкозонные проводники ZnS, CdS или CdSe. Наиболее популярным материалом для оболочки является ZnS, так как имеет более широкую запрещенную зону (энергетическая разность между валентной зоной и зоной проводимости), позволяющую эффективно ограничивать фотогенерированные электроны и дырки в нанокристаллическом ядре. Для снижения внутренней деформации нанокристаллов, вызванной параметрами решетки CdS и ZnSe, можно добавить

дополнительную среднюю оболочку (CdS или ZnSe) между ядром CdSe и внешней оболочкой ZnS. Коэффициент молярного поглощения КТ в зависимости от размера и длины волны возбуждения составляет $\approx 10^5$ - 10^6 М⁻¹/см⁻¹, что примерно на порядок выше значения для органических красителей. Квантовый выход CdSe частиц варьируется до 40%. Нанокристаллы CdSe при комнатной температуре имеют квантовый выход ниже, чем у классических органических красителей (родамин 6G и флуоресцеин), однако это компенсируется их большим сечением поглощения. Авторы статьи [81] оценили, что каждая квантовая точка CdSe / ZnS примерно в 20 раз ярче и в 100-200 раз стабильнее, чем родамин 6G. В противоположность органическим флуоресцентным красителям, КТ имеют узкие и симметричные полосы излучения, а на спектре область поглощения КТ находится в УФ-области независимо от размера частиц. Таким образом, спектральные характеристики КТ позволяют возбуждать нанокристаллы разных размеров одним источником излучения, что, соответственно, приводит к излучению на разных длинах волн. Такие характеристики делают КТ идеальной меткой для определения нескольких анализов в одном образце.

Недостатки КТ (например, токсичность, нерастворимость в воде и отсутствие функциональных групп для образования биоконъюгатов) могут быть устранены путем введения частиц в кремниевые нанооболочки [82]. Другим подходом, позволяющим получать растворимые в воде и биосовместимые КТ, является модификация поверхности частиц бифункциональными молекулами (например, меркаптоуксусной кислотой) [81]. Водорастворимые КТ состава CdSe-ZnS, подходящие для методов получения конъюгатов в водной среде, синтезируют путем многоступенчатой процедуры, включающей рост ядра CdSe-нанокристаллов, покрытие ZnS, стабилизацию органическим слоем и, наконец, размерно-селективное осаждение [83]. Одним из наиболее распространенных методов размерно-селективного разделения КТ является осаждение частиц из органических растворителей с использованием другого растворителя, в котором наночастицы растворяются хуже, чем в исходном [84].

КТ успешно применяют в качестве метки в иммунохроматографических тестах для определения и анализа различных маркеров заболеваний [85,86].

Широкий спектр возбуждения и узкая полоса излучения упрощают применения КТ в мультианализе и минимизируют матричный эффект [87,88]. Последний аспект особенно важен для анализа образцов цельной крови. Кроме того, время затухания излучения КТ находится в диапазоне 30-100 нс, что немного дольше, чем у органических красителей (1-5 нс), но в сравнении с лантаноидными пробами (1мкс-1мс) - намного короче. Однако, это

в разы превышает фоновую флуоресценцию и комбинационное рассеяние, а также позволяет снизить фоновый сигнал в значительной степени.

Применение КТ в качестве метки в мультиплексном иммунохроматографическом анализе для одновременного определения трех антибиотиков в сложном образце было описано в работе [89]. Дизайн системы был выполнен в формате «светофора», который обеспечивался путем использования КТ разного размера. Идентификация анализируемого соединения проводилась качественно на основе проявляющегося окрашивания тестовой линии, а также количественно путем измерения интенсивности флуоресценции (рис. 8). Для разработки мультицветного иммунохроматографического теста были получены конъюгаты Ат против антибиотиков с водорастворимыми КТ, максимум излучения которых наблюдается при 525, 585 или 625 нм. Тест система показала высокую чувствительность с пределами обнаружения офлоксацина, хлорамфеникола и стрептомицина, равными 0,3, 0,12 и 0,2 нг/мл, соответственно. Эти значения – в 80-100 раз ниже значений предела обнаружения, полученных методом ИФА с использованием тех же антител. Применение ЛПИИ в формате «светофор» позволяет определять эти антибиотики в образцах молока за 10 минут без дополнительной предобработки образцов.

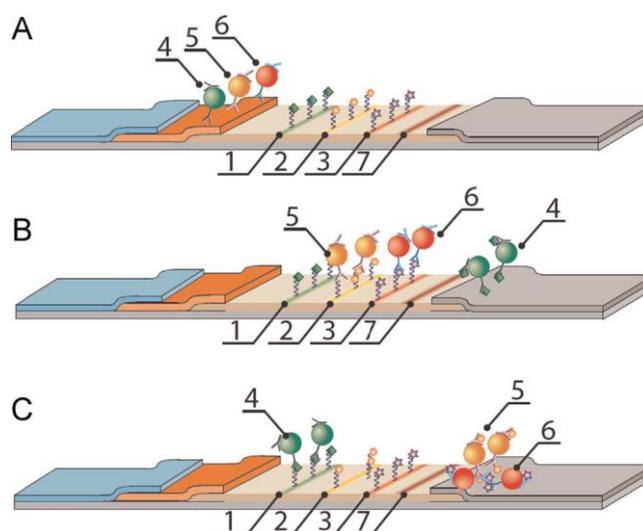


Рис. 8. Конкурентный мультиплексный иммунохроматографический анализ в формате «светофор» для определения трех антибиотиков (тестовые зоны для выявления стрептомицина (1), хлорамфеникола (2) и офлоксацина (3); конъюгаты составов КТ-мАт к стрептомицину (4), КТ-мАт к хлорамфениколу (5), КТ-мАт к офлоксацину (6); контрольная линия (7)). А – тест-полоска до проведения анализа, В – результаты анализа, полученные для образца, содержащего стрептомицин, С – результаты анализа после пропуска образца, содержащего хлорамфеникол и офлоксацин [89].

С целью повышения аналитического сигнала, формируемого КТ, было предложено инкапсулирование КТ в полимерную матрицу [90-92]. Повышение чувствительности анализа на основе такой метки объясняется возможностью введения в полимер большого количества КТ, которые обеспечивают большую интенсивность флуоресценции по сравнению с одной КТ. Так, например, в работе [92] описано применение в качестве метки нанокompозита, полученного на основе субмикронных полимерных частиц и КТ, в конкурентном формате ЛПИА для определения афлатоксина В1 в кукурузе. Чувствительность разработанной тест-системы была сравнима с чувствительностью ИФА и на 2 порядка превышала чувствительность иммунохроматографического теста на основе НЧЗ.

1.1.3.5.3. Лантаниды

Хелаты лантанидов – группа люминесцентных материалов, привлекающая большое внимание благодаря своим уникальным свойствам: длительное время жизни флуоресценции, узкие спектры излучения, большие стоксовы сдвиги и высокая фотостабильность [93]. Перечисленные свойства хелатов лантанидов легли в основу их применения в ЛПИА для определения аналитов в низких концентрациях. Однако, люминесцентные лантаниды, включая европий, тербий, самарий и диспрозий, имеют более слабую люминесценцию и склонны к фотообесцвечиванию. В этой связи, введение хелатов лантанидов в кремниевые наночастицы позволяет повысить интенсивность флуоресценции кремниевых наночастиц и, соответственно, чувствительность определения исследуемых соединений. Кремниевые наночастицы, модифицированные хелатом европия, широко используют в флуоресцентном иммуноанализе с временным разрешением [94,95]. Флуоресцентный иммуноанализ с временным разрешением является высокочувствительным методом с высоким отношением сигнал/шум и позволяет отделить специфический долгоживущий флуоресцентный сигнал метки от короткоживущих фоновых шумов в анализируемых образцах. Несмотря на широкое применение ЛПИА для определения различных аналитов, обусловленное его простотой и быстротой, чувствительность метода ограничена высоким фоновым шумом, связанным с эффектами светорассеяния (рассеяние Тиндалля, Релея и комбинационное рассеяние), матрицей биопробы (кровь, сыворотка) и тестовым устройством. В частности, в ЛПИА наблюдается высокая фоновая флуоресценция, обусловленная рассеянием самой мембраны. Устранение фоновой флуоресценции является важной задачей для объединения высокочувствительной технологии регистрации сигнала с временным разрешением с

методом ЛПИА для создания быстрых тест-систем, которая была решена в ряде работ для определения различных аналитов, включая эозинофильный катионный белок и нейтрофильный желатиназно-ассоциированный липокалин, С-реактивный белок, поверхностный Ag вируса гепатита В, хлорамфеникол, кленбутерол и кукурузный патоген *Pantoea stewartii* [96-101].

1.1.3.5.4. Преобразующие флуорофоры

Преобразующие флуорофоры (up-converting phosphors (UCP)) представляют собой комбинацию иона-донора и иона-акцептора энергии в одной субмикронной кристаллической структуре. При инфракрасном облучении ион-донор высвобождает энергию, квант энергии переходит на акцептор, который в свою очередь испускает фотон в видимой или ближней инфракрасной области в зависимости от состава кристалла. При детекции метки эти испускаемые фотоны регистрируются [102].

В качестве донора для получения преобразующих флуорофоров широко используют кристаллы итрий-фторида натрия (NaYF_4) с гексагональной кристаллической решеткой. Акцептором в большинстве случаев являются комплексы трехвалентных лантанидов – самарий, иттербий и др. Благодаря эмиссии в ближней инфракрасной области тест-системы на основе лантанидных комплексов характеризуются низким фоновым сигналом, что позволяет с их помощью тестировать различные сложные образцы, такие как кровь, сыворотка, слюна и т.д. [103,104].

Впервые применение преобразующих флуорофоров в иммунохроматографии было описано в работе Нидбала и соавторов [105]. После этого, был опубликован ряд работ на основе ЛПИА с использованием преобразующих флуорофоров для определения вирусов [106], бактерий [107], паразитов [108], цитокинов [109] и т.д. Однако, недостатком преобразующих флуорофоров является низкий квантовый выход (0,01–0,1), а при использовании источника возбуждения с низкой оптической плотностью эффективность метки снижается. В этой связи было разработано портативное устройство с миниатюрным инфракрасным лазером для регистрации результатов ЛПИА на основе преобразующих флуорофоров на примере тест-систем для определения наркотических соединений и кишечной палочки (*Escherichia coli* O157:H7) [110].

1.1.3.6. Магнитные наночастицы

Магнитные наночастицы – частицы природных или синтетических материалов, которые обладают магнитными свойствами и имеют размер от 5 до 100 нм. Наиболее

часто в иммуноанализе используют ферриты – соединения с общей формулой MFe_2O_4 , где М – чаще всего двухвалентный ион металла (например, Cu, Zn, Mg, Ni, Fe, Co и Mn). При использовании магнитных наночастиц в ЛПИИА возможны несколько способов регистрации аналитического сигнала: визуальный, так как магнитные наночастицы формируют на аналитической мембране коричневое окрашивание; комбинационное рассеяние света [111]; определения магнитной проницаемости; измерение магнитной восприимчивости и использование др. чувствительных, но сложных аналитических систем [112,113]. Наиболее часто реализуют способы регистрации аналитического сигнала, основанные на использовании уникальных магнитных свойств частиц, таких как стабильность магнитных свойств в течение долгого времени, а также низкий магнитный фон в биологических образцах [114]. Применение магнитных наночастиц в ЛПИИА для определения различных аналитов описано в ряде работ [115-118]. Простейший способ детекции результатов, основанный на определении относительной магнитной проницаемости, характеризуется быстротой (несколько минут) и простотой тестирования, однако, имеет невысокую чувствительность [119]. В то же время, измерение магнитной восприимчивости магнитных наночастиц позволяет снизить предел обнаружения исследуемого аналита, что успешно продемонстрировано на примере тест-систем для определения вируса папилломы человека [120], сердечного тропонина, γ -интерферона [121], кишечной палочки и Ат к вирусу иммунодефицита человека [122].

1.1.3.7. Липосомы

Липосомы – сферические везикулы, образованные гидрофобными «хвостами», направленными друг к другу, и полярными «головами», ориентированными к экстравезикулярному раствору и внутренней полости. Размер липосом находится в диапазоне 50-800 нм. Обычно липосомы получают из эмульсии методом выпаривания в обращенной фазе. Для изменения свойств полученных липосом используют множество фосфолипидов с различными полярными «головами», доступными для получения конъюгата, снижения агрегации липосом, и гидрофобными областями, имеющими различную длину цепи и насыщение. Поверхность липосом может быть модифицирована различными химически-активными группами (включая активные группы для связывания биомолекул). Свойства и количество таких групп можно варьировать в широких пределах, что позволяет контролировать характеристики липосом (например, размер и поверхностная плотность ковалентно связанных биомолекул). В липосомы можно инкапсулировать множество молекул и наночастиц, например, ферменты,

визуальные/цветные и флуоресцентные красители, КТ и электрохимические и хемилюминесцентные маркеры. Липосомы способны инкапсулировать большое количество таких меток, поэтому предел обнаружения анализируемого соединения может быть снижен на 2-3 порядка по сравнению с непосредственной модификацией иммунных комплексов меткой [123-126]. К главным недостаткам липосом следует отнести структурную нестабильность по отношению к детергенту; рН изменения, которые вносят отрицательный эффект на ионные заряды в двойном фосфолипидном слое и осмотическое давление, связанное с набуханием или скручиванием [127].

* * *

Разработки в области быстрых тестов находятся на пересечении нанонауки, иммунохимии и биохимических методов. Будущее развитие быстрых иммунотестов лежит на непрерывных достижениях в области нанотехнологий, особенно в получении новых неорганических наночастиц с улучшенными физико-химическими свойствами и стабильностью. Так как наночастицы и биомолекулы обычно имеют сходный размер в нанометровой шкале, приготовление конъюгатов на их основе будет способствовать созданию новых методов. В этой области можно ожидать быстрого прогресса, поскольку наноматериалы, первоначально полученные для исследования материалов, физики и биологии, уже используются в иммуносенсорах и биоимиджинге, а также могут обеспечить платформу для быстрого развития методов скрининга. Применение наночастиц в ЛПИИА позволяет повысить чувствительность иммуноанализа путем увеличения отношения сигнал-шум, уменьшения времени реакции и одновременного определения нескольких аналитов. При рассмотрении ЛПИИА на основе различных типов меток, большинство исследований включали применение НЧЗ в качестве метки. Это объясняется способностью НЧЗ к формированию окрашивания при обеспечении беспрепятственного потока анализируемого раствора через нитроцеллюлозную мембрану. Будучи инертным, золото обладает оптическими свойствами и легко детектируется визуально или с помощью простых и недорогих лабораторных устройств. Кроме того, НЧЗ стабильны в жидком или высушенном состоянии, легко конъюгируют с биомолекулами, благодаря чему являются наиболее предпочтительной меткой в ЛПИИА. Однако, использование новых типов меток, таких как КТ, преобразующие флуорофоры и др., повышают чувствительность, позволяя детектировать образцы с низким содержанием аналита.

1.2. Системы преобразования сигнала ЛПИА для проведения количественного определения исследуемого аналита

Рост применения быстрых тестов в медицинской диагностике, ветеринарии, контроле пищевой промышленности и других областях требует преобразования визуальной оценки результатов по принципу «да-нет» в количественный анализ. Последние тенденции к переносным электронным устройствам ведут к объединению ЛПИА с инструментальным интерфейсом, что позволит стать частью «интернета вещей» и взаимодействовать с большими данными и экспертными системами. Детализированные биохимические данные о людях в реальном времени внесут феноменальный вклад в медицинскую базу данных и базу данных окружающей среды. Поэтому на сегодняшний день основным направлением в ЛПИА является поиск новых подходов, позволяющих повысить чувствительность анализа и проводить количественный анализ различных соединений для решения конкретных задач. При этом должны сохраняться основные требования к быстрым тестам: отсутствие дополнительных стадий анализа, экспрессность, возможность его проведения вне лаборатории без помощи квалифицированного персонала и невысокая стоимость теста. Среди проведенных исследований в области ЛПИА для определения различных биологически активных соединений можно выделить два направления, влияющих на чувствительность метода - это используемые метки для генерирования сигнала, которые были рассмотрены выше, и методы регистрации результатов анализа.

Так, тепловой контраст от нагрева НЧЗ при лазерной стимуляции позволяет повысить аналитическую чувствительность ЛПИА. Известно, что металлические наночастицы генерируют тепло при оптической стимуляции. Тепловой эффект возникает от поверхностных плазмонов на поверхности металл-диэлектрик при переходе из возбужденного состояния в основное. Количество тепла, генерируемое золотыми наночастицами, может быть описано следующим уравнением:

$$Q = N * Q_{\text{нано}} = N * C_{\text{погл}} * I,$$

где общее количество теплоты, генерируемое частицами (Q , Вт/м³), является комбинацией вклада одной НЧЗ ($Q_{\text{нано}}$, Вт), записанное как произведение концентрации (N , золотые наночастицы м³), поглощения ($C_{\text{погл}}$, м²) и интенсивности лазера (I , Вт/м²). Как теперь хорошо известно, оптические, термические и электрические свойства материалов резко меняются в наномасштабной шкале. В частности, усиленные

фототермические эффекты металлических наночастиц используют для термического разрушения злокачественных опухолей, определения циркулирующих опухолевых клеток, фототермического высвобождения молекул и трансфекции генов, повышения терапевтической эффективности химиотерапии и для отслеживания переноса наночастиц внутри клеток. Результаты применения термического контраста в ЛПИА для определения различных аналитов показали повышение аналитической чувствительности в несколько раз по сравнению с ЛПИА на основе НЧЗ без реализации данного метода регистрации результатов [128,129]. Аналитический сигнал (температуру), формируемый за счет нагрева лазером НЧЗ, измеряют с помощью инфракрасных камер (рис. 9). Таким образом, применение термического контраста является перспективным новым и высокочувствительным методом регистрации аналитического сигнала в «point-of-care» диагностике.

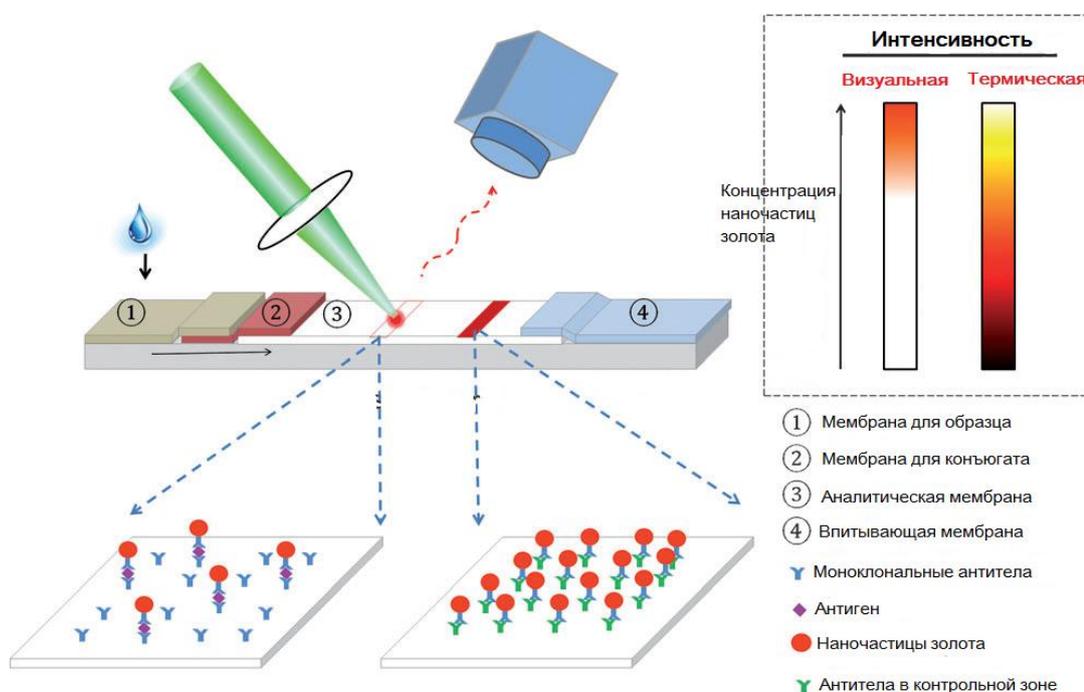


Рис. 9. Схема ЛПИА на основе термического контраста [129].

Гигантское комбинационное рассеяние (ГКР, в англоязычной литературе – SERS (Surface enhanced Raman scattering)) является одним из наиболее чувствительных аналитических методов, доступных сегодня для ученых. Данный метод применяется в таких областях, как химическое зондирование, медицинская диагностика, изучение живых клеток и бактерий. Благодаря высокой чувствительности, метод спектроскопии комбинационного рассеяния используется в иммуноанализе. Много работ посвящено разработкам иммуноанализа на основе ГКР в сэндвич-формате для определения

макромолекул [130,131] и конкурентном формате для определения низкомолекулярных соединений [132,133]. В большинстве таких систем в качестве субстрата для приготовления иммунопробы часто используют коллоидные золотые наночастицы из-за легко контролируемого размера, стабильности в течение долгого периода, биосовместимости с Ат и Аг, а также достаточного усиления интенсивности комбинационного рассеяния. Несмотря на то, что метод детекции на основе ГКР обеспечивает высокую чувствительность в иммуноанализе, существует ряд недостатков, связанных с долгими стадиями инкубации на каждом этапе связывания, неудобными и повторяющимися стадиями промывки, а также сложностями в подготовке поверхностей с воспроизводимыми характеристиками усиления.

НЧЗ, применяемые как в ГКР, так и в иммуноанализе, являются «мостом» для объединения этих двух аналитических методов. Так, в работе [134] предложен ультрачувствительный конкурентный иммунохроматографический анализ на основе ГКР с целью определения 3-амино-5-метилморфолино-2-оксазолидинона в образцах ткани и мочи. В качестве иммунопробы использовали мАт и рамановский репортер, 4-меркаптобензойную кислоту, меченные коллоидными золотыми наночастицами. Для количественного определения исследуемого соединения измеряли интенсивность сигнала специфического рамановского рассеяния от меркаптобензойной кислоты в области тестовой линии. Анализ проводился в течение 15 минут, предел обнаружения 3-амино-5-метилморфолино-2-оксазолидинона составил 0,28 пг/мл.

Замена НЧЗ на наночастицы из золотого ядра и серебряной оболочки (Au|Ag), обладающие более высокой активностью поверхностно-плазмонного рамановского рассеяния в основном за счет электронных эффектов лиганда и усиления локализованного электрического поля в частицах состава ядро-оболочка, позволила снизить предел обнаружения в 125 раз по сравнению с методом ИФА в тест-системе для определения кленбутерола в образцах мочи [135].

Еще одним перспективным в области полуколичественного и количественного анализа является применение смартфонов, которые позволят расширить область применения быстрых тест-систем. Смартфоны – высокочувствительные устройства, которые также могут детектировать низкие интенсивности света. Следовательно, перспективная цифровая платформа для «point-of-care» диагностики опирается на смартфоны благодаря их камерам с высоким разрешением, мощным процессорам, высокой емкости памяти, а также беспроводной связи. Различные компании, такие как Skanplex и Novarum, продают мощные программные платформы для анализа изображений,

совместимые со смартфонами, персональными компьютерами и т.д. Это позволяет использовать смартфон в качестве считывающего устройства. Ли с соавторами сообщили о чувствительном ЛПИИ для определения афлатоксинов в кукурузе. Ат, меченные НЧЗ, позволили достичь предел обнаружения 5 мг/кг со 100% специфичностью [136]. Таким образом, взаимодействие ЛПИИ технологий с беспроводными технологиями потенциально может расширить сферу применения иммунохроматографических систем от простого теста по принципу «да-нет» до количественного в целях медицинской диагностики и генотипирования. Кроме того, наличие специальных программных обеспечений в устройствах позволит осуществлять простой анализ и хранение данных, что особенно важно для персонализации данных в области здравоохранения.

1.3. Баркод-формат ЛПИИ

Обычно, результат стандартного ЛПИИ на основе НЧЗ определяется по принципу да/нет. Для количественной оценки данных ЛПИИ с использованием различных типов меток, включая НЧЗ, используются специальные приборы для регистрации сигнала, формируемого меткой. Визуальный полуколичественный анализ результатов ЛПИИ проводится путем сравнения интенсивности тестовой линии на полоске с цветовой шкалой на контрольной карточке, однако, данный способ сопряжен со сложностями в интерпретации результатов. В этой связи был предложен так называемый «баркод»-формат ЛПИИ, известный в английской литературе как «Barcode lateral flow immunoassay», который позволяет проводить полуколичественный анализ различных аналитов без применения дополнительных устройств для регистрации аналитического сигнала. Принцип «баркод» ЛПИИ основан на формировании нескольких тестовых линий путем иммобилизации специфических реагентов одной концентрации, и зависимости между количеством отображаемых тестовых линий на полоске и концентрацией исследуемого соединения. Благодаря своей простоте, «баркод»-формат ЛПИИ был реализован в нескольких исследованиях для определения содержания различных целевых аналитов, таких как простатическая кислая фосфатаза, глиадин, вирус картофеля и С-реактивный белок [33,137-139]. На рисунке 10 представлено схематическое изображение «баркод»-формата ЛПИИ тест-полоски. После добавления образца, аналит поэтапно захватывается иммобилизованными Ат. Принцип формирования разного количества окрашенных тестовых линий в данной системе состоит в постепенном расходе исследуемого аналита по мере движения вдоль полоски. То есть, при добавлении образца, содержащего низкие концентрации аналита, весь Аг связывается Ат, иммобилизованными

в области первой тестовой линии, с образованием только одной окрашенной линии. Пропускание образца с высоким содержанием исследуемого соединения приводит к формированию максимального количества окрашенных тестовых линий на полоске, т.к. концентрации Ag достаточно для связывания со всеми иммобилизованными на мембране Ат.

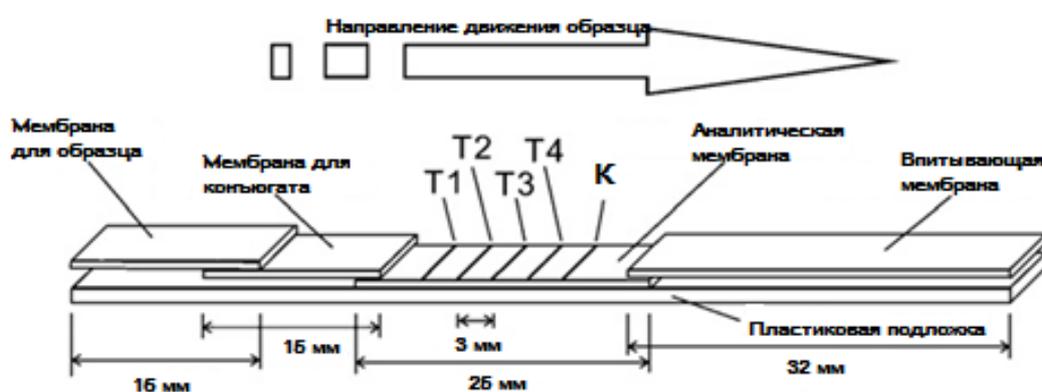


Рис. 10. Схематичное изображение баркод ЛПИА тест-системы для определения простатической кислой фосфатазы [137].

* * *

Большинство стандартных ЛПИА тест-систем разрабатывают в полуколичественном формате, когда окрашенный сигнал оценивается визуально без применения дополнительного инструментального оборудования. Несмотря на простоту и удобство данного формата анализа, часто возникают проблемы правильной интерпретации результатов из-за различий в восприятии цвета, связанных с возрастом, врожденной особенностью зрения и других психологических факторов. В этой связи, применение высокочувствительных методов регистрации сигнала, разработка интегрированных оптических систем и создание новых подходов для перевода цветового сигнала тестов в более точный, количественный результат являются приоритетными направлениями «point-of-care» диагностики.

1.4. ПКт - маркер сепсиса и бактериальной инфекции

В настоящей работе основной целью было создание тест-систем на основе принципа ЛПИА для количественного определения в сыворотке прокальцитонина, являющегося эффективным маркером сепсиса и бактериальных инфекций. В связи с этим остановимся на кратком рассмотрении основных свойств и методов анализа этого белка.

На сегодняшний день инфекции и сепсис остаются одними из наиболее распространенных причин заболеваемости и смертности в мире. Высокая смертность от сепсиса обусловлена его поздней диагностикой и неэффективным контролем над проводимым лечением. В этой связи особый интерес представляет поиск надежных маркеров системной воспалительной реакции. К сожалению, классические клинические и лабораторные признаки системной воспалительной реакции, такие как лихорадка, тахикардия, одышка и лейкоцитоз, часто возникают и при неинфекционном системном воспалении. При этом, определение содержания маркеров воспалительной реакции, например, эндотоксинов и цитокинов, невозможно использовать для рутинной диагностики. Аналогичные сепсису клинические признаки нередко наблюдаются у пациентов с панкреатитом, ожогами, тяжелой травмой, лекарственной реакцией, после обширных хирургических вмешательств и при тяжелой сердечной недостаточности [140]. Поэтому часто трудно дифференцировать пациентов с воспалительными процессами, связанными и не связанными с бактериальными инфекциями. Бактериологическое исследование является доступным и рутинным методом, однако его чувствительность составляет 25-42% [141]. При этом анализ проводится в течение 48 часов. Изучено и предложено большое количество маркеров системной воспалительной реакции, таких как С-реактивный белок, интерлейкины, фактор некроза опухолей-альфа и т.д., однако повышение их концентраций происходит не только при инфекциях, но и в других, не связанных с инфекциями случаях [142]. Идеальный маркер сепсиса должен отвечать следующим требованиям: высокая чувствительность, позволяющая вовремя диагностировать заболевание; специфичность к бактериальной природе заболевания; доступность; корреляция с тяжестью заболевания; высокая воспроизводимость. На сегодняшний день наиболее хорошо изученным и используемым в ежедневной клинической практике маркером для диагностики сепсиса и бактериальных инфекций является белок прокальцитонин (ПКТ).

Метод анализа ПКТ должен отвечать следующим требованиям: невысокая стоимость; простота в выполнении; высокая специфичность и чувствительность; должен способствовать ранней диагностике сепсиса и коррелировать с тяжестью заболевания; помогать оценивать эффективность проводимого лечения.

1.4.1. Структура и функции ПКТ

Впервые ПКТ был описан в 1984 году как предшественник (прогормон) кальцитонина с молекулярной массой 14,5 кДа (рис. 11) [143]. Кальцитонин – пептидный

гормон, синтезируемый преимущественно парафолликулярными С-клетками щитовидной железы, а также в небольшом количестве в других органах, а также в легких (рис. 12). В нормальной физиологии, единственная роль, установленная для ПКТ – это роль предшественника кальцитонина (Кт). Кт участвует в регуляции обмена кальция и метаболизме костной ткани, а также ингибирует резорбцию кости остеокластами. Ранее предполагали, что Кт, названный так за гипокалиемический эффект, имеет исключительно тиреоидное происхождение и играет важную роль в скелетном гомеостазе [144]. Однако было выявлено, что при тиреоидэктомии (оперативное вмешательство с полным удалением щитовидной железы) никаких значительных патологических последствий в отношении гомеостаза кальция у людей не происходит, а плотность костей в большинстве случаев остается прежней. Таким образом, физиологические функции зрелого Кт у человека пока неизвестны, кроме того, до сих пор не определены нарушения, возникающие в организме при избытке или дефиците зрелого кальцитонина [145]. В норме ПКТ синтезируется в С-клетках щитовидной железы. При этом весь ПКТ превращается в Кт и практически не поступает в кровоток. В этой связи, в сыворотке (плазме) крови у здоровых людей наблюдаются следовые концентрации ПКТ, менее 0,05 нг/мл. При тяжелой системной инфекции, ПКТ продуцируется тканями вне щитовидной железы, например, в паренхимальных клетках печени, почек, легкого, а также в адипоцитах, в которых отсутствуют ферменты для расщепления ПКТ, что приводит к повышению его уровня в крови [146]. Концентрация ПКТ резко увеличивается через 6-12 часов при системном воспалении бактериальной этиологии, в частности, при тяжелых бактериальных инфекциях и сепсисе. В этих состояниях ПКТ синтезируется в других клетках вне щитовидной железы, как описано выше. Период полувыведения ПКТ составляет 24 часа вне зависимости от функции почек. Уровень ПКТ в сыворотке (плазме) крови человека растет пропорционально тяжести заболевания.

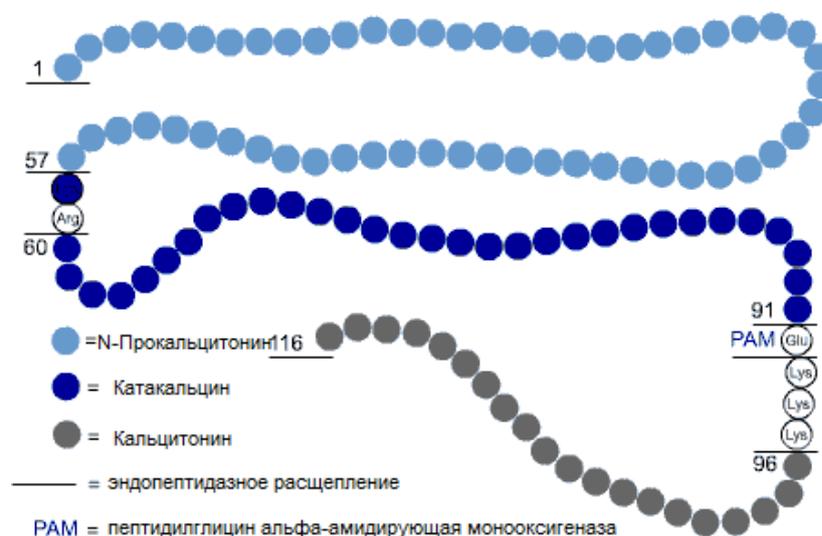


Рис. 11. Схема аминокислотной последовательности прокальцитонина [143].

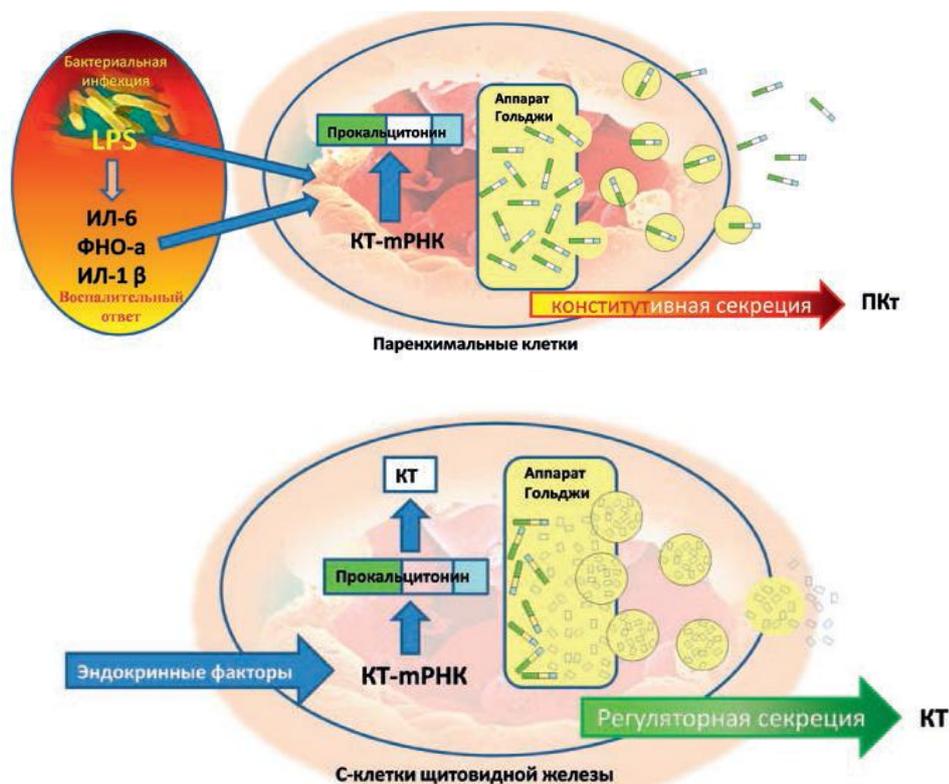


Рис. 12. Синтез и секреция кальцитонина и прокальцитонина.

При локальной бактериальной инфекции уровень ПКт возрастает незначительно (от 0,25 до 0,5 нг/мл). Значения концентраций ПКт от 0,5 до 2 нг/мл указывают на наличие системной инфекции, но не подтверждают диагноз «сепсис». ПКт в диапазоне от 2 до 10 нг/мл с высокой вероятностью свидетельствует об инфекционном процессе с системным воспалением, приводящем к сепсису. Концентрация ПКт более 10 нг/мл (максимально до 1000 нг/мл) наблюдается исключительно у пациентов с тяжелым сепсисом или

септическим шоком (рис. 13). При вирусных и грибковых инфекциях, а также при аллергических и аутоиммунных заболеваниях, уровень ПКТ почти не возрастает, что позволяет проводить дифференциальную диагностику. Мониторинг уровня концентрации ПКТ дает информацию о течении заболевания и позволяет прогнозировать исход сепсиса. Повышенное содержание ПКТ в течение продолжительного времени свидетельствует о неблагоприятном течении заболевания.

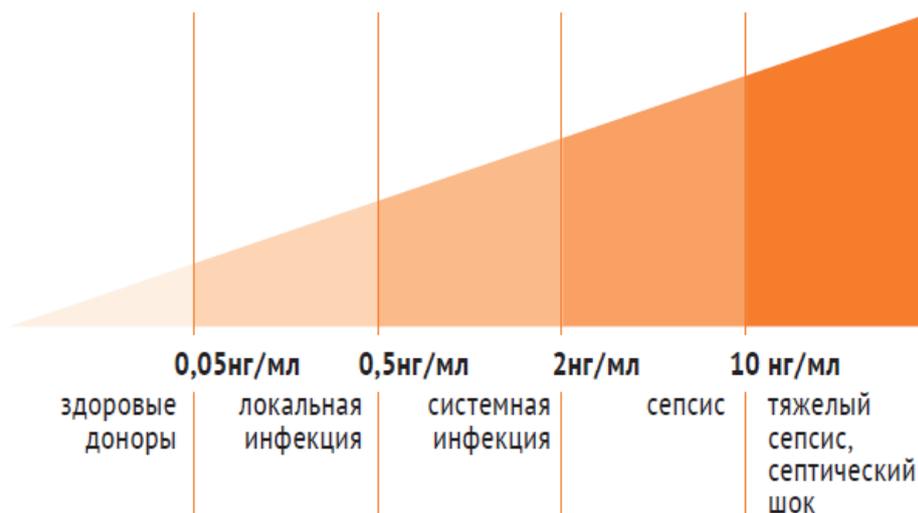


Рис. 13. Увеличение концентрации прокальцитонина при развитии септического шока.

Ранняя диагностика сепсиса и своевременное вмешательство играют решающую роль для положительного исхода заболевания. Однако дифференциальная диагностика сепсиса и других неинфекционных состояний у больных с клиническими признаками острого воспаления и отрицательными микробиологическими результатами анализа затруднена. В этих случаях необходима дополнительная информация, которая позволяет увеличить точность диагноза сепсиса на ранней стадии. Таким образом, ПКТ является маркером, который может помочь в данном случае. Особое значение ПКТ имеет как ранний маркер инфекций в неонатальном скрининге. Бактериальный сепсис новорожденных остается серьезной проблемой, связанной с высокой заболеваемостью и смертностью у новорожденных, особенно среди недоношенных новорожденных. В этом случае особенно важны ранняя диагностика и своевременное лечение системной бактериальной инфекции [147,148]. В исследовании [149] оценивали ПКТ у новорожденных с подтвержденным микробиологически или клинически диагностированным сепсисом, по сравнению с больными новорожденными в других состояниях. Чувствительность и специфичность составили 81% и 79%, соответственно, с площадью под кривой ошибок, равной 0,87. Диагностическая точность ПКТ оказалась

выше у новорожденных с поздним началом сепсиса (> 72 ч жизни), чем у пациентов с ранним началом сепсиса; площадь под кривой ошибок составила 0,95 и 0,78, соответственно. Лечебная практика показывает, что ПКт облегчает принятие клинических решений путем его использования для ранней диагностики, оценки дальнейшего развития заболевания, разработки тактики лечения и назначения схемы приема антибиотиков при тяжелых бактериальных инфекциях у детей.

1.4.2. Методы определения ПКт

Методы определения ПКт включают количественные (иммуоферментная хемилюминисценция, иммунолюциметрия и т.д.) и полуколичественный (иммунохроматографический) анализы. В 1989 был разработан РИА для определения предшественников Кт [150]. Метод основан на использовании двух антител: моноклональных антител КС01, направленных на 1-11 участок катакальцина; моноклональных антител СТ08, направленных на 11-17 часть Кт. КС01 Ат иммобилизовали на твердофазной подложке путем инкубации с полистироловыми шариками. После стадии отмывки, шарика, покрытые Ат, инкубировали с образцом или стандартным раствором. МАт СТ08, меченные ^{125}I с помощью метода иодирования, использовали в качестве метки. После инкубации в течение ночи при комнатной температуре, шарика промывали дистиллированной водой и измеряли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике. Чувствительность предложенного РИА для определения предшественников Кт составила <100 пг/мл. Позже РИА был адаптирован в ультрачувствительный люминесцентный иммуноанализ [151]. В анализе использовали пару моноклональных Ат: одно направлено против остатков ПКт 96-106 (Ат на фазе); другое направлено против остатков ПКт 70-76. Последовательность 96-106, состоящая из 21 аминокислоты, представляет собой часть С-концевой области молекулы катакальцина, а последовательность 70-76 является частью молекулы Кт. В пробирках с иммобилизованными Ат инкубировали сыворотку или стандартный раствор и Ат, меченные акридиновым эфиром. После инкубации и стадии отмывки измеряли люминесценцию на анализаторе. Нижний предел обнаружения ПКт с использованием описанного метода составил 10 пг/мл. Подобная высокая чувствительность наблюдалась с помощью метода ЛПИА с разработанной в работе методикой усиления аналитического сигнала [152]. Усиление аналитического сигнала обеспечивалось применением двухкомпонентного конъюгата НЧЗ со специфическими Ат и молекулами биотина, а

также двух дополнительных конъюгатов ЗНЧ с биотином и стрептавидином, комбинация которых обеспечивала образование агрегатов в тестовой зоне устройства. Предел обнаружения ПКТ в сыворотке крови данным методом составил 3 пг/мл.

В последнее время растет интерес к созданию искусственных материалов, осуществляющих селективное комплементарное связывание определяемых веществ по принципу “ключ-замок”. Одним из таких материалов является молекулярно импринтированный полимер. Молекулярно импринтированные полимеры представляют собой синтетический материал, осуществляющий, как и биореагенты, распознавание и связывание разнообразных молекул-мишеней с высокой аффинностью и специфичностью. К преимуществам молекулярно импринтированных полимеров для практического применения следует отнести высокую стабильность, простоту получения и сопоставимые с природными рецепторами аффинность и селективность. Общая схема приготовления полимеров с молекулярными отпечатками заключается в сополимеризации функционального и сшивающего мономеров в присутствии молекул-шаблонов или импринт-молекул [153]. В работе [154] сообщается о разработке биосенсора, действие которого основано на спектроскопии поверхностно-плазмонного резонанса (ППР), с использованием поверхности с нанесенной пленкой молекулярно импринтированных полимеров для быстрого и надежного определения ПКТ. Поверхность с пленкой молекулярно импринтированных полимеров получали с использованием технологии микроконтактного импринтинга: молекулы ПКТ сначала иммобилизовали на стеклянную подложку и приводили в контакт с раствором 2-гидроксиэтилметакрилата и этиленгликольдиметакрилата на ППР-биосенсоре; затем проводили процесс полимеризации. После удаления молекул ПКТ получали участки специфического молекулярного распознавания, где ПКТ мог выборочно связываться только на поверхности полимерного матрикса. Анализ проводили с использованием растворов ПКТ в фосфатном буфере и модельной плазме крови с различными концентрациями аналита. Предложенный ППР-биосенсор позволяет определять низкие концентрации ПКТ (9,9 нг/мл) и проводить непрерывный мониторинг уровня биомаркера в течение 1 часа. Высокая селективность биосенсора была доказана в присутствии нескольких конкурирующих белков, таких как БСА, миоглобин и цитохром с.

На сегодняшний день на рынке коммерчески доступны тесты фирмы Brahms Diagnostica (Берлин, Германия), к которым относятся иммунолюминесцентные тест-системы Brahms Lumitest-PCT, Brahms LIAISON-PCT, Brahms CRYPTOR-PCT, полуколичественная тест-система Brahms PCT-Q и т.д. [155]. LUMItest® PCT -

иммунолюминесцентный тест, который применяют для количественного определения концентрации ПКт в человеческой сыворотке и плазме. В этом методе используют пару Аг-специфичных моноклональных Ат, которые связывают ПКт (Аг) на двух различных участках (катакальцин- и Кт-сегменты). Ат, меченные люминесцентными частицами, и Ат, иммобилизованные на внутренней поверхности пробирки, инкубируют с анализируемым образцом. В результате, люминесцентно меченые Ат связываются со внутренней поверхностью пробирки с образованием «сэндвич-комплекса». После окончания реакции, избыток меченых антител полностью удаляется из пробирки. Остаточное количество метки на тестовой поверхности пробирки определяется количественно при помощи измерения сигнала люминесценции с использованием люминометра и LUMItest® Basiskit реактивов. Интенсивность сигнала люминесценции прямо пропорциональна концентрации ПКт в образце.

LIAISON® BRAHMS PCT® II GEN система - хемиллюминесцентный анализ на основе парамагнитных микрочастиц. В системе используют пару высоко специфичных Ат: мАт против катакальцина, иммобилизованные на магнитных частицах (твердая фаза); детекторные Ат против Кт, меченные изолуминолом. В течение первой инкубации, ПКт, присутствующий в калибровочных пробах, образцах и контрольных растворах, связывается с конъюгатом меченых Ат. Сэндвич-комплекс формируется только в присутствии молекул ПКт, которые связывают пару Ат. После второй инкубации несвязавшийся материал удаляют с помощью цикла промывания. После этого добавляют реактивы стартера для запуска мгновенной хемиллюминесцентной реакции. Световой сигнал, а, следовательно, количество конъюгата Ат, меченных изолуминолом, измеряют с помощью фотоумножителя в относительных световых единицах, значения которых пропорциональны концентрации ПКт в калибровочных растворах, образцах и контрольных пробах [156].

B·R·A·H·M·S PCT® KRYPTOR основан на технологии TRACE (усиленное излучение криптоата с временным разрешением), заключающейся в безызлучательной передаче энергии от донора к акцептору [157]. В качестве молекулы-донора используют меченые криптоатом европия пАт, которые распознают эпитопы в незрелой кальцитониновой области ПКт. Акцепторная молекула представляет собой мАт против катакальциновой области ПКт, меченные аллофикоцианином. В присутствии ПКт в образце между двумя молекулами образуется сэндвич-иммунокомплекс, позволяющий переносить энергию от донора к акцептору с сопровождающимся усилением. Сигнал, испускаемый иммунокомплексом с временной задержкой, измеряется с помощью

флуоресцентного анализатора. Метод KRYPTOR® - гомогенный, исключает процедуры разделения или промывки. Высокое содержание ПКт в анализируемых образцах регистрируется в течение первых нескольких секунд инкубации. Разведение проб с высокой концентрацией ПКт происходит автоматически в течение пяти минут.

Недавно несколько диагностических компаний, таких как DiaSorin, BioMérieux, Siemens и Roche, объединились с компанией Brahms для разработки автоматизированных анализаторов ПКт на их собственных платформах с использованием различных технологий (иммунолюминесцентный, фермент-связанный флуоресцентный анализ, хемиллюминесцентный и электрохемиллюминесцентный анализ). В таблице 2 приведены характеристики коммерчески доступных методов для определения ПКт. Относительно недавно фирмой Diazyme был предложен иммунотурбидиметрический метод с использованием латексных частиц для определения ПКт, который может быть реализован на широком спектре химических анализаторов. ПКт, содержащийся в образце, связывается с конъюгатом специфических антител против ПКт, меченных латексными частицами, и вызывает агглютинацию. Степень мутности, вызванная агглютинацией, измеряется оптически и пропорциональна количеству ПКт в образце. Химический анализатор устанавливает концентрацию ПКт в образце по калибровочной кривой путем интерполяции. Реакцию контролируют при 600 нм и завершают в течение 10 минут [158]. Несмотря на то, что все перечисленные методы могут точно и с высокой чувствительностью оценить содержание ПКт в сыворотке/плазме/крови человека, необходимость в специальных анализаторах ограничивает их применение в отделениях экстренной медицинской помощи и интенсивной терапии. В этой связи, разработка быстрых, полуколичественных методов определения ПКт является альтернативой перечисленным количественным методам. Так, в работе [159] сообщается о флуоресцентном ЛПИИА для одновременного определения ПКт и С-реактивного белка на основе КТ с разным спектром излучения. Чувствительность определения ПКт составила 0,1 нг/мл с линейным диапазоном определения от 0,3 до 200 нг/мл. Показано, что предложенный ЛПИИА на основе КТ хорошо коррелирует с коммерческим методом определения ПКт (97,02%). Авторы статьи [160] описали получение КТ с функционализированными карбоксильными группами, покрытых кремниевыми наночастицами, путем объединения метода послойной сборки и метода многослойной защиты.

Таблица 2. Сравнение характеристик коммерчески доступных методов определения ПКт.

Анализатор	Свойства				
	Принцип метода	Объем образца, мкл	Диапазон измерения, нг/мл	Аналитическая чувствительность, нг/мл	Время анализа
Lumitest-PCT	Одностадийный иммунолюминесцентный анализ	20	0,1-500	0,5	≈ 1 час
LIAISON B·R·A·H·M·S PCT II Gen (DiaSorin)	Двухстадийный иммунохемилюминесцентный анализ	100	0,02-100	0,02	16 минут
B·R·A·H·M·S PCT sensitive KRYPTOR	Гомогенный иммуноанализ с использованием TRACE технологии (усиленное излучение криптогата с временным разрешением)	50	0,02-5000	0,06	19 минут
VIDAS B·R·A·H·M·S PCT (bioMérieux)	Одностадийный фермент-связанный флуоресцентный анализ	200	0,05-200	0,03	20 минут
ELECSYS B·R·A·H·M·S PCT (Roche)	Электрохемилюминесцентный иммуноанализ	30	0,02-100	0,02	18 минут
ADVIA Centaur B·R·A·H·M·S PCT (Siemens)	Одностадийный хемилюминесцентный иммуноанализ	100	0,02-75	0,02	26-29 минут
Lumipulse G B·R·A·H·M·S PCT (Fujirebio Inc.)	Двухстадийный хемилюминесцентный ИФА	60	0,02-100	0,0048	30 минут
ARCHITECT B·R·A·H·M·S PCT (Abbott)	Хемилюминесцентный иммуноанализ с использованием микрочастиц	150	0,02-100	0,01	22 минуты
Samsung IB B·R·A·H·M·S PCT	-	70	0,08-10	0,08	20 минут

Предварительно приготовленные методом Штобера наночастицы SiO_2 осаждали с положительно заряженным полиэлектролитом (полидиаллилдиметиламмония хлорид, PDDA) и отрицательно заряженными КТ состава CdSe/ZnS с помощью метода послойной сборки, далее покрывали кремниевой оболочкой. Функционализация $\text{SiO}_2@PDDA@KT@SiO_2$ наночастиц с гидрофобными углеводородами и биосовместимыми олигомерами придает свойства оптической визуализации и хорошую коллоидную стабильность в водных растворах с широким диапазоном pH, в фосфатном буфере и при термообработке. Кроме того, разработанные многослойные наночастицы, связанные со специфическими Ат, успешно использовали для определения ПКт методом флуоресцентного ЛПИА. Предел обнаружения ПКт с помощью описанного метода составил 0,1 нг/мл, что в 200 раз выше значения, полученного ЛПИА на основе коллоидного золота.

Для разработки набора для количественного определения ПКт использовали метод флуоресцентного иммуноанализа с временным разрешением в сочетании с ЛПИА [161]. Основное отличие флуоресцентного иммуноанализа с временным разрешением является применение в качестве метки хелатов лантанидов. В данном случае, специфическая флуоресцентная метка флуоресцирует сильнее и дольше, чем фоновая флуоресценция. В работе в качестве флуоресцентной метки для разработки ЛПИА применяли микрочастицы хелата европия (III), модифицированного карбоксильными группами. Комбинация ЛПИА и флуориметра с временным разрешением обеспечивает повышение эффективности обнаружения для количественных тест-систем. Предложенный анализ показал высокую чувствительность (0,08 нг/мл) и хорошую корреляцию с коммерческим набором ELECSYS B·R·A·H·M·S PCT (Roche).

Перечисленные выше методы ЛПИА с использованием КТ в качестве метки основаны на регистрации флуоресцентного сигнала, что говорит о необходимости применения инструментального оборудования. Таким образом, данные тест-системы нельзя отнести к быстрым, простым и недорогим методам для определения ПКт. В этой связи, остается актуальной задача разработки экспрессного, полуколичественного и недорогого ЛПИА теста для определения диагностически важных диапазонов концентраций ПКт в сыворотке человека.

* * *

В литературном обзоре обобщены последние тенденции для разработки высокочувствительного ЛПИИ с целью определения различных аналитов. Основными преимуществами ЛПИИ являются портативность, невысокая стоимость, простота, надежность, короткое время анализа, кроме того, не требуется сложное оборудование и квалифицированный персонал. Уникальные свойства ЛПИИ открыли возможность для определения биомаркеров заболеваний, инфекционных агентов и биоугроз в медицине, сельском хозяйстве и экологической безопасности. Однако, нередко приходится сталкиваться с проблемой недостаточной чувствительности ЛПИИ для определения низких концентраций исследуемых соединения. Описанные выше исследования демонстрируют подходы к повышению чувствительности ЛПИИ, включающие методы усиления сигнала, а также получение и применение новых наноразмерных меток, которые позволяют достигнуть более низких пределов обнаружения аналита.

Целью настоящей работы являлась разработка методов ЛПИА для количественного и визуального полуколичественного определения ПКт в сыворотке крови в клинически важных диапазонах концентраций для выявления и контроля развития сепсиса.

В ходе работы необходимо было решить следующие задачи:

- 1) получить и охарактеризовать компоненты разрабатываемых аналитических тест-систем, оптимизировать условия иммобилизации антител на мембранах, состав и свойства конъюгатов антител с НЧЗ сферической и несферической формы различного размера для определения ПКт методом ЛПИА в необходимых диапазонах концентраций;
- 2) разработать тест-системы, позволяющие осуществлять определение ПКт в клинически важных диапазонах концентраций с приборной регистрацией результатов путем использования различных типов меток и высокочувствительных систем регистрации измеряемого аналитического сигнала (например, золотые наночастицы несферической формы, КТ, агломераты НЧЗ, гигантское комбинационное рассеяние и др.);
- 3) разработать полуколичественные тест-системы для визуального безинструментального экспресс-определения модельных маркеров и ПКт, позволяющие проводить оценку наличия анализируемых соединений в заранее заданном числе определенных концентрационных диапазонов;
- 4) апробировать разработанный полуколичественный ЛПИА для экспрессного определения ПКт на реальных образцах сыворотки крови и провести сравнительную оценку полученных результатов с методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Глава II Экспериментальная часть

2.1. Материалы и методы исследования

2.1.1. Реагенты и материалы

В работе были использованы следующие реагенты:

Золотохлористоводородная кислота (HAuCl_4), цитрат натрия, гидрохинон, бычий сывороточный альбумин (БСА), белок А, Твин 20, меркаптобензойная кислота (МБК), натриевая соль биотин-3-сульфо-N-гидроксисукцинимидного эфира, дициклогексилкарбодиимид, N-гидроксисукцинимид, декстрансульфат (мол. вес 8000), нитрат серебра и набор для усиления сигнала с использованием серебра («Sigma», США); гидроксид натрия, хлорид натрия и азид натрия, одно- и двузамещенные фосфаты калия, сахараза («Helicon», Россия); стрептавидин («Имтек», Россия); аскорбиновая кислота («Биосинтез», Пенза); соляная кислота, тетраборат натрия («Химмед», Россия); субстратный раствор, содержащий 3, 3', 5, 5'-тетраметилбензидин (ТМБ) и H_2O_2 , готовый к использованию («Иммуновед», Россия); водорастворимые КТ состава CdSe/ZnS с пиком флуоресценции 655 нм, покрытые полимерной оболочкой с карбоксильными группами, (кат. №№ Q21321MP, Invitrogen, США); пероксидаза хрена («Яринвест», Россия);

Рекомбинантный белок ПКт, МАт к ПКт: <4PC2>, <PCC14>, <PCF38>, <PC22>; МАт к Кт: <CB5>, <CA2>, ПАт козы к ПКт человека, конъюгат ПАт к ПКт человека с ПХ («Биалекса», Россия); МАт к катакальцину, ПАт к ПКт («Brahms», Германия);

Лиофилизированный ХГЧ («Московский эндокринный завод», Москва); МАт к ХГЧ: <HCG8>, <HCG4> («Биалекса», Россия); МАт к ХГЧ <k001> и <k002> («Диатех-Эм», Россия).

микроцентрифужные пробирки Vivaspin 500 (Sartorius stedim biotech);

полистироловые 96-луночные планшеты фирмы «Nunc MaxiSorb» (Дания)

Все растворы готовили на деионизованной воде, полученной на установке Milli-Q (Merck Millipore, Германия).

В работе использовали буферные растворы следующего состава:

- 0,01 М К-фосфатный, 0,15 М NaCl, pH=7,4 (ФБС);
- 0,01 М К-фосфатный, 0,15 М NaCl, 0,05% твин 20, pH=7,4 (ФБСТ);
- 0,01 М боратный, pH=8,6 (ББ)

Стандартные растворы ПКт для проведения анализа готовили путем последовательного разбавления из исходного раствора с концентрацией 1 мг/мл.

Стандартные растворы ХГЧ для анализа готовили из исходного раствора с концентрацией 500 Ед/мл.

Для изготовления мультимембранных тест-полосок использовали следующие материалы:

аналитические нитроцеллюлозные мембраны – CNPF (размер пор 5, 8, 10 мкм), CNPC (размер пор 15 мкм), 150-CNPH-N («MDI», Индия);

мембрану для нанесения конъюгата – PT-R5 («MDI», Индия);

мембраны для образца - MAPDS-0300 («Arista Biologicals», США); FR1(0,6), FR1(0,35), GFB-R7L, GFB-R4 («MDI», Индия);

абсорбирующая мембрана - AP045 («MDI», Индия).

Образцы сывороток крови были предоставлены Федеральным государственным бюджетным учреждением здравоохранения Больницей Российской академии наук, клинической лабораторией (г.Троицк).

Определение концентрации ПКт в сыворотках крови проводилось с помощью набора для иммуноферментного анализа «Прокальцитонин ИФА БЕСТ» («Вектор-Бест», Россия), согласно инструкции производителя.

2.1.2. Оборудование

Измерение pH для приготовления буферных растворов проводили с помощью pH-метра фирмы «Mettler-Toledo» (Швейцария) с точностью до 0,02 ед. Измерение pH коллоидных растворов золота проводили с использованием pH-полосок фирмы Fisher (США) с диапазоном определения pH от 5 до 9 единиц.

Оптическую плотность продукта ферментативной реакции измеряли с помощью многоканального спектрофотометра для 96 – луночных планшетов («Anthos 2010», Австрия). Измерения оптической плотности проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-1202 («Shimadzu», Япония).

Спектры флуоресценции измеряли на приборе Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer («Agilent Technologies», США).

Нанесение антител на мембрану проводили с помощью автоматического диспенсера бесконтактного типа BioDot XYZ 3050 (BioJet Quanti 3000, «BioDot», США).

Резку тестовых полосок шириной ≈ 4 мм осуществляли на резке гильотинового типа Index Cutter-I, («A-Point Technologies», США).

В работе использовали центрифугу Eppendorf 5810R («Eppendorf», Германия).

Для количественного определения интенсивности окрашивания в тестовой и контрольной зонах полосок использовали сканер Epson Perfection V700 Photo (Seiko-Epson, Япония) с разрешением 600 точек на дюйм в 24-битном цвете (RGB). Обработку полученных цифровых изображений (в формате .tif) проводили с помощью программы Scion Image (http://www.scioncorp.com/pages/scion_image_windows.htm).

Для количественного определения результатов ЛПИИ с использованием в качестве метки КТ для определения ПКт использовали прибор с ультрафиолетовой лампой (модель PRO-4), предоставленный лабораторией иммунобиохимии Института биохимии им. А.Н. Баха.

Для количественного определения результатов ЛПИИ для определения ПКт методом ГКР использовали DXR Raman Microscope (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, США).

Размер НЧЗ определяли на электронном микроскопе (JEOL JEM-2100, Япония).

2.1.3. Методы исследования

Получение наночастиц коллоидного золота

Золотые наночастицы сферической формы размером 20-50 нм были получены методом Френса [25]. В кипящий 0,01% водный раствор ЗХВК при постоянном перемешивании добавляли рассчитанное из выражения $d \text{ (нм)} = 38,2V^{-0,855}$ количество 1%-ного водного раствора цитрата натрия. Раствор кипятили при постоянном перемешивании еще 15 минут, затем охлаждали до комнатной температуры в темном месте.

НЧЗ сферической формы с большим размером (>50 нм) [162] и НЧЗ в форме попкорна [46] получали путем двухстадийного синтеза. На первой стадии проводили синтез зародышей НЧЗ путем добавления 2,7 мл 1%-ного раствора цитрата натрия к 100 мл кипящего раствора 0,01% ЗХВК.

Для приготовления сферических НЧЗ размером более 50 нм, соответствующий объем зародышевого раствора вносили в раствор 0,01% HAuCl_4 при перемешивании. Затем быстро добавляли 22 мкл 1%-ного цитрата натрия и 100 мкл 0,03М гидрохинона, раствор оставляли перемешиваться в течение 15-30 минут.

Для приготовления НЧЗ в форме попкорна, к 100 мл бидистиллированной воды при интенсивном перемешивании добавляли 0,75 мл 1% раствора ЗХВК. Затем последовательно добавляли 0,5 мл зародышевого раствора, 220 мкл 1%-ного цитрата

натрия и 1 мл 0,03 М гидрохинона. Раствор перемешивали еще 30 минут при комнатной температуре.

НЧЗ в форме звезд получали аналогичным способом [163]. Зародышевый раствор НЧЗ получали добавлением к 100 мл кипящего 1мМ раствора ЗХВК 15 мл 1%-ного цитрата натрия при интенсивном перемешивании. Раствор кипятили еще 15 минут. На второй стадии, к 10 мл 0,25 мМ ЗХВК (с 10 мкл 1М соляной кислоты) добавляли 100 мкл ранее приготовленного зародышевого раствора НЧЗ при постоянном перемешивании. К смеси быстро добавляли 100 мкл 1мМ нитрата серебра и 50 мкл 1М аскорбиновой кислоты. Раствор оставляли перемешиваться в течение 10-15 минут. Готовые растворы НЧЗ хранились при +4°C в темном месте.

Спектр поглощения полученных образцов наночастиц коллоидного золота измеряли в диапазоне длины волны 400-900 нм. Размер и морфологию полученных образцов НЧЗ подтверждали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Для определения среднего размера НЧЗ выполняли анализ 100 частиц из ряда изображений ПЭМ.

Выбор оптимальных рН и концентрации антител для получения конъюгатов антител с НЧЗ

С целью выбора оптимальных условий для получения стабильных препаратов конъюгатов Ат, меченных НЧЗ, проводили титрование. Для этого готовили серию растворов коллоидного золота в диапазоне рН 5,5-9,0 с шАг 0,5 и растворов Ат с концентрациями 25; 50; 100; 200; 400 мкг/мл в ФБС. Процедура титрования включала внесение в лунки полистиролового планшета по 10 мкл раствора белка в горизонтальном направлении и по 100 мкл растворов коллоидного золота с разным рН в вертикальном направлении. После инкубации смеси в течение 15 минут на шейкере, в каждую лунку планшета добавляли по 40 мкл 10%-ного NaCl и измеряли оптическое поглощение при 520 и 580 нм. По полученным данным строили зависимости разности оптических поглощений ($A_{520}-A_{580}$) от концентрации Ат, и определяли рН и концентрацию Ат, необходимых для получения стабильного препарата.

Получение конъюгата антител с НЧЗ

Для приготовления конъюгатов антител с НЧЗ, в том числе, конъюгата НЧЗ с пАт к ПКт, меченных ПХ, к 10 мл раствора коллоидного золота с выбранным рН добавляли по каплям при перемешивании 1 мл раствора Ат с выбранной концентрацией. Смесь перемешивали в течение 30 минут при комнатной температуре, затем добавляли БСА до конечной концентрации в растворе 0,2% и инкубировали 30 минут. После инкубации

добавляли сахарозу до конечной концентрации 10% и раствор азиды натрия до конечной концентрации 0,01%.

Для удаления несвязавшихся Ат, полученный раствор конъюгата центрифугировали в течение 20-30 минут при разных скоростях в зависимости от размера частиц. Супернатант удаляли, осадок суспендировали в требуемом объеме ФБС, содержащего 0,1% БСА, 10% сахарозы и 0,01% азиды натрия.

Конъюгат пАт, меченных ПХ, с НЧЗ готовили

7 мкл полученного раствора конъюгата с оптической плотностью 1-2 опт. ед. наносили на полоску мембраны для конъюгата размером 4x4 мм и высушивали при комнатной температуре в течение 5 часов.

Получение биотинилированных антител

Биотинилированные пАт получали по описанной ранее методике [164]. Натриевую соль биотин-3-сульфо-N-гидроксисукцинимидного эфира растворяли в воде до конечной концентрации 20 мг/мл. Затем к 200 мкл пАт с концентрацией 3 мг/мл добавляли 1,75 мкл свежеприготовленного раствора натриевой соли биотин-3-сульфо-N-гидроксисукцинимидного эфира, смесь инкубировали в течение 45 минут на шейкере. Свободный биотин удаляли путем ультрафильтрации. После этого определяли концентрацию конъюгата, измеряя значение оптической плотности раствора при длине волны 280 нм и сравнивая с оптической плотностью исходного раствора. Биотинилированные Ат хранили при -20°C до дальнейшего использования.

Получение комплексного конъюгата биотинилированных антител с НЧЗ

Процедура получения конъюгата биотинилированных Ат с НЧЗ была аналогична описанной выше методике получения конъюгата Ат, меченных НЧЗ. Для получения комплексного конъюгата биотинилированных Ат с образованием агрегатов НЧЗ к полученному раствору конъюгата добавляли раствор стрептавидина в ФБС с соотношениями биотинилированных Ат в конъюгате к стрептавидину: 15:1, 15:3, 15:5 и 15:10. Смесь инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре, затем раствор конъюгата с оптической плотностью 1 опт. ед. наносили на мембрану для конъюгата и высушивали при комнатной температуре.

Получение конъюгата антител, меченных КТ

К 125 мкл раствора карбоксильных КТ состава CdSe/ZnS с пиком флуоресценции 655 нм в боратном буфере (50 мМ, pH 9,0) с концентрацией 8 мкМ добавляли 1,5 мг дициклогексилкарбодиимида и 0,5 мг N-гидроксисукцинимиды. Затем быстро добавляли 300 мкл Ат в концентрации 5 мг/мл. Смесь инкубировали при постоянном перемешивании

на шейкере в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте. Полученный конъюгат очищали от свободных низкомолекулярных реагентов посредством диализа в течение трех циклов против боратного буфера с помощью микроцентрифужных пробирок Vivaspin 500. Разделение проводили при 12000g в течение 10 минут при комнатной температуре. После каждого цикла центрифугирования фильтрат удаляли, а конъюгат оставался на поверхности мембраны, пропускающей низкомолекулярные соединения. После трехкратного центрифугирования собирали сконцентрированный конъюгат.

Получение иммунопробы состава Ат-НЧЗ-МБК

К кипящему раствору 0,01%-ной ЗХВК объемом 120 мл быстро, при интенсивном перемешивании добавляли 0,7 мл 1%-ного раствора цитрата натрия. Смесь кипятили еще в течение 15 минут. После охлаждения готового раствора, к 10 мл коллоидного золота добавляли 10 мкл раствора 1мМ МБК, смесь оставляли перемешиваться в течение 3 часов. рН раствора НЧЗ-МБК доводили до 7,5 с помощью 0,1М карбоната натрия. Для получения конъюгата НЧЗ-МБК с Ат, к 10 мл полученного раствора добавляли 1 мл Ат в концентрации 15 мкг/мл. Смесь оставляли перемешиваться в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем в смесь добавляли 20%-ный раствор БСА до конечной концентрации 0,2% с последующей инкубацией в течение 30 минут. Полученный раствор центрифугировали при 4000g в течение 20 минут; супернатант удаляли, а осадок суспендировали в требуемом объеме ФБС, содержащем 0,1% БСА, 10% сахарозы и 0,01% азида натрия. Раствор конъюгата с оптической плотностью 2 опт. ед. наносили на полоску стекловолоконной мембраны размером 4x4 мм и высушивали при комнатной температуре.

Компановка ЛПИИА тест-полоски для определения ПКТ

На аналитическую мембрану наносили в виде тестовой линии раствор специфических Ат в ФБС с помощью автоматического программируемого диспенсера. В качестве контрольной зоны использовали раствор белка А в ФБС с концентрацией 0,5 мг/мл, который наносили на расстоянии 5 мм от тестовой линии. Для формирования градиентного ЛПИИА, на аналитическую мембрану наносили растворы специфических антител в ФБС в диапазоне концентраций от 0,1 до 1 мг/мл, расстояние между линиями составило 3 мм. Использовали следующие параметры диспенсера: размер капли - 30 нл, шаг - 0,3 мм, скорость - 50 мм/сек. Высушивание полосок проводили при комнатной температуре в течение 24 часов. Аналитическую мембрану резали на полоски шириной 5 мм. Тест-полоски (75*4 мм) собирали в соответствии со схемой, изображенной на рисунке 1. На тест-полоски шириной 4 мм наклеивали последовательно, внахлест мембрану для конъюгата, мембрану для образца и впитывающую мембрану.

Проведение ЛПИИА

Для проведения ЛПИИА, тест-полоски помещали на горизонтальную поверхность и наносили 100 мкл стандартного раствора/анализируемого образца, содержащего ПКт или ХГЧ, на мембрану для образца. Стандартные растворы ПКт и ХГЧ готовили в ФБСТ. С целью оценки эффективности градиентного ЛПИИА ХГЧ использовали модельные образцы мочи, в которые добавляли ХГЧ. Визуальную оценку результатов проводили через 10-15 минут после анализа. Для проведения количественной оценки результатов анализа, тест-полоски полностью высушивали и проводили сканирование. Полученные изображения обрабатывали в программе Scion Image для Windows, определяли интенсивность окрашенных линий и строили градуировочные графики зависимости интенсивности тестовой линии от концентрации вещества в анализируемом растворе. Для регистрации флуоресцентного сигнала ЛПИИА тест-системы на основе КТ использовали портативный флуоресцентный детектор.

Предел визуального обнаружения ПКт (нг/мл) или ХГЧ (мЕд/мл) определяли как минимальное содержание Аг, сигнал от которого можно было визуально и надежно отличить от фона, что соответствовало значению сигнала анализатора 2-3 отн. ед. В случае количественной оценки содержания аналита, предел обнаружения считали, как концентрацию следуемого соединения, при которой регистрируемый сигнал в 3 раза превосходил стандартное отклонение фонового сигнала.

Проведение ЛПИИА на основе НЧЗ - ПХ

Тест-полоски (75*4 мм) собирали в соответствии со схемой (рис. 1) без использования мембраны для конъюгата. Для проведения анализа, полоски помещали на горизонтальную поверхность и наносили смесь, состоящую из 100 мкл образца и 10 мкл конъюгата пАт-ПХ-НЧЗ, на мембрану для образца. После развития красного окрашивания, характерного для 20 нм НЧЗ, регистрировали сигнал. Для проведения дополнительной стадии усиления сигнала, полоски помещали в раствор ТМБ, содержащий декстрансульфат (МВ=8000) в конечной концентрации 0,05%, и инкубировали в течение 5 минут при перемешивании. Затем, полоски высушивали при комнатной температуре в течение 30 минут и проводили сканирование результатов. Полученные изображения анализировали с помощью программы Scion Image; по результатам строили градуировочные графики зависимости интенсивности окрашивания тестовой линии от концентрации ПКт.

Процедура ЛПИИ на основе НЧЗ с использованием метода усиления серебром

Процедура ЛПИИ на основе НЧЗ с использованием метода усиления серебром сходна с традиционным методом. Используемый в работе набор для усиления серебром состоял из растворов нитрата серебра и гидрохинона, которые непосредственно перед анализом смешивали в равных пропорциях. После образования окрашенных красных линий в тестовой и контрольной зонах аналитической мембраны, связанном с формированием меченого НЧЗ (20 нм) иммунокомплекса, полоску погружали в раствор для усиления серебром на 10 минут. После того, как красная окраска на полосках менялась на черную, тест-полоски промывали дистиллированной водой и погружали в фиксирующий раствор на 5 минут. Далее, тест-полоски промывали дистиллированной водой, высушивали, проводили сканирование результатов и анализ в программе Scion Image.

Проведение ЛПИИ на основе ГКР

Для проведения количественного анализа результатов ЛПИИ ПКт измеряли сигнал, производимый иммунопробой, с помощью рамановского микроскопа. Были установлены следующие настройки: лазер с длиной волны возбуждения при 785 нм и мощностью 24 мВт, время интеграции - 10 с. Измерения проводили в 10 точках вдоль средней части тестовой полосы. Для количественной оценки содержания ПКт в стандартных растворах измеряли интенсивность характеристического пика МБК при 1074 см^{-1} .

Проведение градиентного ЛПИИ

Для проведения градиентного ЛПИИ, тест-полоски помещали на горизонтальную поверхность и наносили 100 мкл стандартного раствора/анализируемого образца, содержащего ПКт или ХГЧ, на мембрану для образца. После высыхания тест-полосок, результаты градиентного ЛПИИ оценивали путем подсчета количества проявившихся, окрашенных тестовых линий в аналитической зоне, которое соответствовало определенным концентрационным диапазонам Ag.

Статистический анализ

Результаты, полученные методом градиентного ЛПИИ для определения ПКт, сравнивали с результатами метода ИФА-ПКт. Чувствительность и специфичность метода градиентного ЛПИИ были рассчитаны с помощью программного обеспечения, MedCalc statistical software. Чувствительность тест-системы определялась как доля истинных положительных случаев сепсиса, достоверно определенных с помощью разработанного теста, и была рассчитана по формуле:

$Ч = ИП / (ИП + ЛО) * 100\%$, где ИП – истинно положительный результат, ЛО – ложноотрицательный результат.

Специфичность тест-системы определялась как доля истинных отрицательных случаев, выявленных с помощью разработанного теста, и была рассчитана по формуле:

$С = ИО / (ИО + ЛП) * 100\%$, где ИО – достоверно отрицательный результат, ЛП – ложноположительный результат. Для проверки статистической гипотезы о наличии взаимосвязи между качественными результатами двух методов (градиентным ЛПИА и ИФА) рассчитывали значение χ^2 Пирсона.

Глава III Результаты и обсуждение

Растущий интерес к применению быстрых тестов в медицинской диагностике с целью ранней диагностики и мониторинга протекания заболевания требует разработки высокочувствительных ЛПИА систем с простой интерпретацией результатов. Кроме того, возможность преобразования качественного анализа по принципу «да-нет» в полуколичественный или количественный анализ является приоритетным направлением в «point-of-care» диагностике. Поэтому целью настоящей работы являлась разработка методов ЛПИА для количественного и визуального полуколичественного определения ПКт в сыворотке крови в клинически важных диапазонах концентраций для выявления и контроля развития сепсиса.

3.1. Разработка ЛПИА тест-системы для определения ПКт

Основной задачей данного этапа работы являлась разработка быстрой тест-системы на основе стандартной схемы ЛПИА с использованием в качестве инструментально (или визуально) детектируемой метки НЧЗ сферической формы. Разработка стандартного ЛПИА ПКт включала решение следующих задач: получение сферических НЧЗ и стабильных конъюгатов метки со специфическими Ат; подбор оптимальных компонентов, материалов и соотношений реагентов. С целью изучения влияния размера метки на аналитические характеристики ЛПИА исследовали НЧЗ размером от 20 до 100 нм.

3.1.1. Получение сферических НЧЗ

Сферические НЧЗ размером 20, 35 и 50 нм получали по описанному методу Френса, который заключается в восстановлении ЗХВК цитратом натрия [25]. Применение метода Френса для получения сферических НЧЗ размером более 50 нм приводит к полидисперсному распределению частиц в растворе. Поэтому синтез сферических НЧЗ размером 70 и 100 нм проводили с использованием двухстадийного метода с промежуточной стадией образования зародышевого раствора [162]. На рисунке 14 представлены спектры поглощения полученных НЧЗ в диапазоне 400-900 нм.

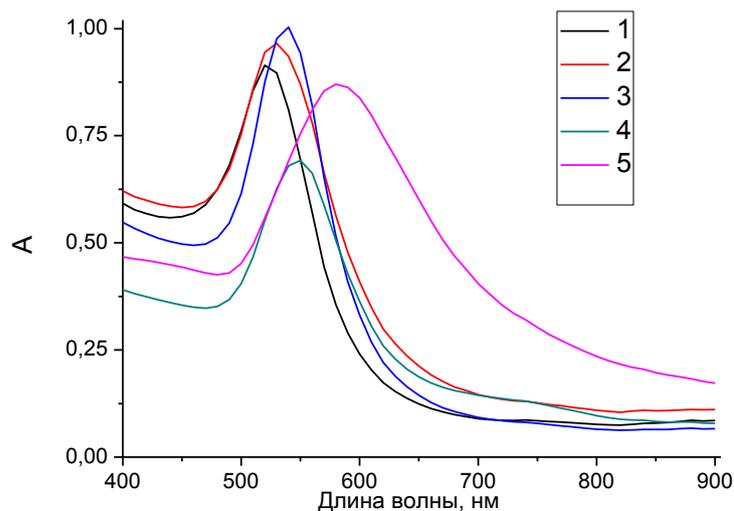
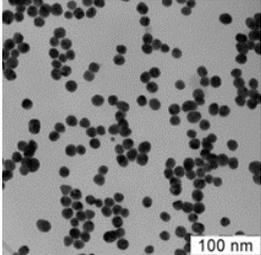
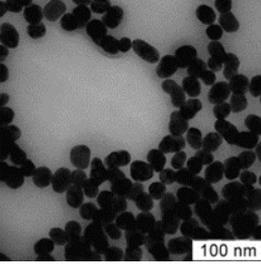
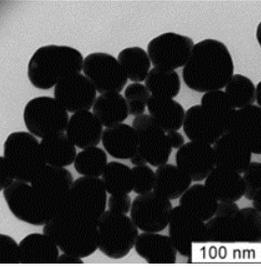
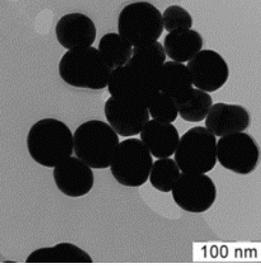
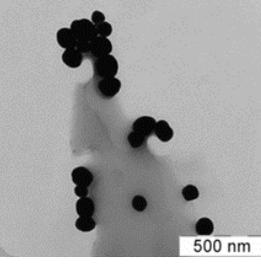


Рис. 14. Спектры поглощения коллоидных растворов НЧЗ диаметром 20 нм (1); 35 нм (2) нм; 50 нм (3); 70 нм (4); 100 нм (5).

На спектрах полученных растворов НЧЗ наблюдали характерные пики поглощения, которые зависели от размера наночастиц. Размер и морфология полученных образцов НЧЗ были подтверждены методом ПЭМ (таблица 3). Цвет полученных коллоидных растворов НЧЗ зависел от размера наночастиц. Так, с увеличением размера сферических НЧЗ от 20 до 50 нм цвет раствора менялся от красного до пурпурного, соответственно, а при дальнейшем увеличении размера до 100 нм наблюдался серо-оранжевый оттенок раствора. Коллоидные растворы хранились при 4°C в темном месте и сохраняли стабильность в течение как минимум трех месяцев.

Таблица 3. Фотографии коллоидных растворов и ПЭМ изображения золотых наночастиц разного размера.

Образец	Фотография	ПЭМ изображение	Пик плазмонного резонанса, нм	Средний диаметр, нм (ПЭМ)
1			520	$20,0 \pm 1,0$
2			530	$35,1 \pm 2,3$
3			537	$50,4 \pm 1,6$
4			547	$70,2 \pm 1,8$
5			582	$100,2 \pm 2,0$

3.1.2. Получение конъюгатов специфических антител с НЧЗ

Состав коллоидных НЧЗ представляет собой золотое ядро, окруженное отрицательно заряженным двойным электрическим слоем. Высокая концентрация электролитов в коллоидном растворе вызывает коагуляцию частиц и изменение характерного красного цвета раствора на сине-серый. Это явление объясняется уменьшением отталкивания одноименно заряженных частиц при увеличении ионной силы. Макромолекулярные лиганды адсорбируются на поверхности золотых наночастиц посредством комбинации электростатических и гидрофобных взаимодействий. Коллоидное золото с достаточным количеством адсорбированных макромолекул на поверхности не подвергается коагуляции после добавления растворов с высоким содержанием солей, что свидетельствует об образовании стабильной пробы. Количество белка, необходимого для получения стабильного конъюгата, определяют путем добавления раствора электролита в препараты наночастиц, предварительно покрытых определенным количеством белка. Кроме того, важным параметром для достижения оптимальной адсорбции белка на поверхности наночастиц является рН раствора коллоидного золота, которое подбирается обычно эмпирически.

В настоящей работе для исследования были доступны 5 видов моноклональных Ат: <4PC2>, <CB5>, <CA2>, <PC22> и пАт к ПКт человека. Для выбора оптимальных условий сорбции антител на поверхности НЧЗ проводили шахматное титрование. К растворам коллоидного золота со значениями рН в диапазоне от 5,5 до 9,0 добавляли специфические Ат с разной концентрацией (от 2,5 до 40 мкг/мл). При увеличении ионной силы путем добавления 10%-ного раствора хлорида натрия происходила коагуляция нестабилизированных или недостаточно стабилизированных белком НЧЗ. Характерный пик поглощения стабилизированных коллоидных наночастиц соответствует примерно длине волны 520 нм. При возникновении процессов коагуляции нестабилизированных НЧЗ регистрируется пик поглощения при 580 нм. Таким образом, по разности оптического поглощения на 520 и 580 нм можно определять количественный стабилизирующий эффект сорбции антител на поверхности НЧЗ. По графикам зависимостей разности оптических поглощений от концентрации антител для разных значений рН определяли оптимальные условия для получения стабильных конъюгатов Ат с НЧЗ. На рисунке 15 представлены результаты шахматного титрования на примере НЧЗ размером 20 нм с использованием доступных в работе Ат. В качестве оптимального рН для всех клонов Ат было выбрано значение 7,0-7,5. Считается, что минимальной концентрацией белка, необходимой для стабилизации коллоидного золота, является то

количество белка, которое способно предотвратить коагуляцию наночастиц. Важно отметить, что для достижения максимального связывания необходимо брать Ат в 10-20%-ном избытке, а иногда и в несколько раз превышающем минимальную концентрацию белка. В этом случае, избыток лиганда необходимо удалить, иначе возможна конкуренция между Ат и меченым конъюгатом в процессе анализа. В изученном диапазоне нагрузки золя по Ат (2,5-40 мкг/мл) для Ат были выбраны концентрации 10 мкг/мл (<4PC2>, <CA2>, <PC22>) и 15 мкг/мл (<CB5>, пАт). Следует отметить, что выбранные концентрации были одинаковы для наночастиц размером 20 и 35 нм. Однако, для получения стабильных конъюгатов Ат, меченных золотыми наносферами большого размера (50, 70 и 100 нм) оптимальными были установлены следующие концентрации Ат: 20 мкг/мл для наночастиц диаметром 50 нм; 40 мкг/мл для образцов НЧЗ диаметром 70 и 100 нм. Для блокировки участков на поверхности НЧЗ, не покрытых Ат, добавляли БСА к полученным образцам конъюгатов. Для предотвращения коагуляции НЧЗ в процессе центрифугирования, нанесения и высушивания конъюгата на мембране в раствор добавляли сахарозу. Стабилизирующий эффект сахарозы связан с дополнительной защитой гидратных оболочек вокруг НЧЗ за счет удержания молекул воды [28]. Избыток антител удаляли центрифугированием.

3.1.3. Оптимизация условий проведения стандартного ЛПИИ с использованием НЧЗ для определения ПКт

3.1.3.1. Выбор пары антител

Для разработки ЛПИИ ПКт была использована сэндвич-схема проведения анализа, принцип которой описан в литературном обзоре (рис. 2а). Для формирования тестовой линии на аналитическую мембрану наносили специфические Ат к ПКт. Для проведения подбора оптимальных компонентов и реагентов с целью разработки ЛПИИ ПКт в работе использовали НЧЗ размером 20 нм. Стекловолоконную мембрану для конъюгата модифицировали раствором антител, меченных НЧЗ. При добавлении образца, содержащего исследуемый аналит, ПКт, на мембрану для образца, начиналось его движение вдоль полоски под действием капиллярных сил. В присутствии ПКт, при прохождении вдоль полоски происходило взаимодействие его с конъюгатом антител, меченных НЧЗ, с образованием комплекса ПКт-меченых Ат. В тестовой зоне полоски специфические Ат связывали иммунокомплекс с образованием тройного окрашенного сэндвич-комплекса. Интенсивность окрашивания тестовой линии зависела от количества исследуемого вещества в образце.

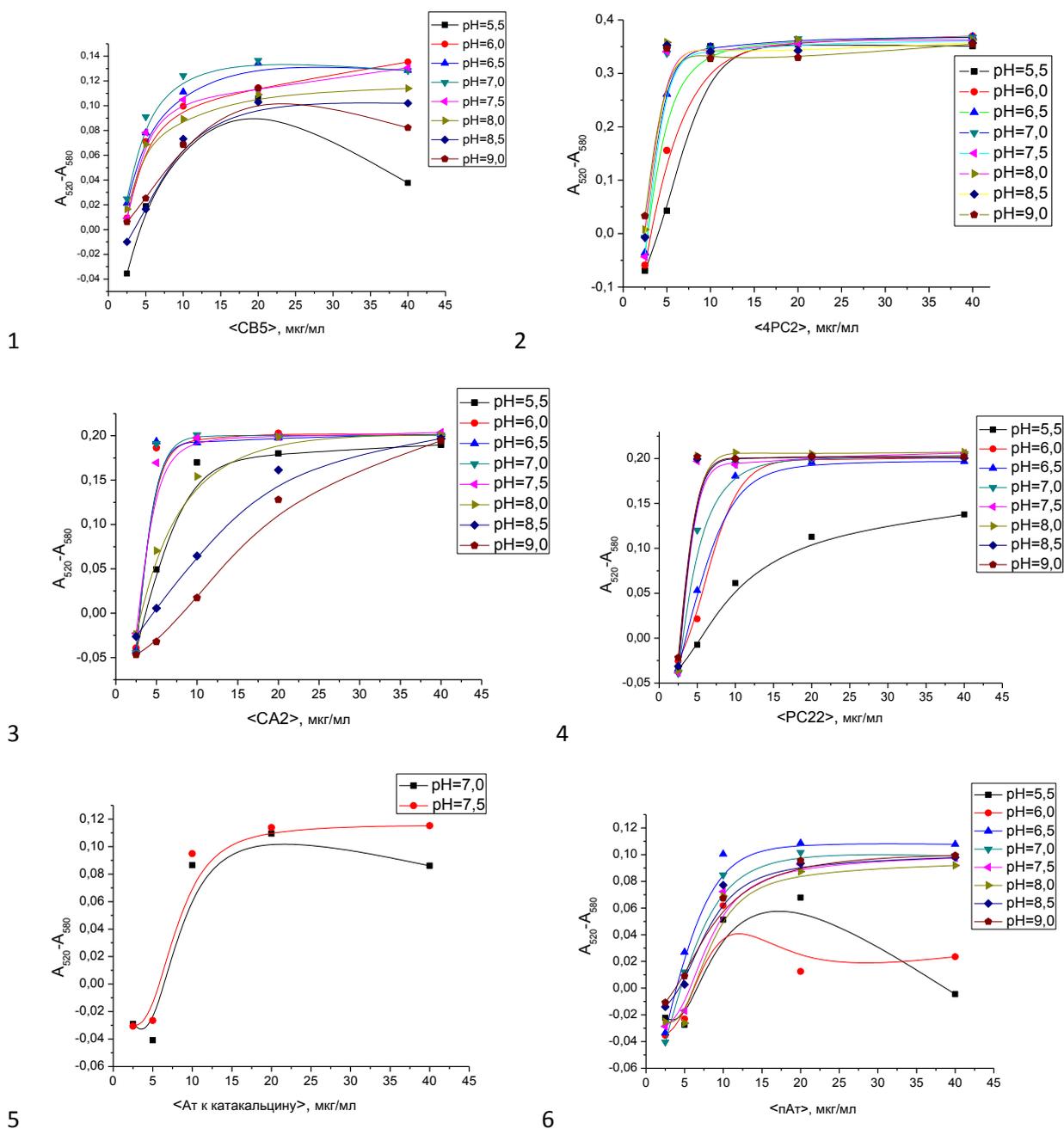


Рис. 15. Зависимости разности оптического поглощения конъюгатов специфических Ат с НЧЗ (20 нм) от концентрации, полученные для моноклональных антител <CB5> (1), <4PC2> (2), <CA2> (3), <PC22> (4), <Ат к катакальцину> (5) и поликлональных антител (6) при разных значениях рН.

Одной из главных задач при разработке ЛПИИ является выбор подходящей пары антител, обеспечивающей максимальную чувствительность анализа для определения ПКт. С этой целью были изучены различные комбинации доступных антител, когда одно из них иммобилизовали на фазе, а другое – метили детектирующим агентом. Для каждой комбинации антител был проведен ЛПИИ в стандартных растворах ПКт. По результатам анализа с получившимися комбинациями антител строили градуировочные графики интенсивности окрашивания тестовой линии от концентрации ПКт (рис. 16).

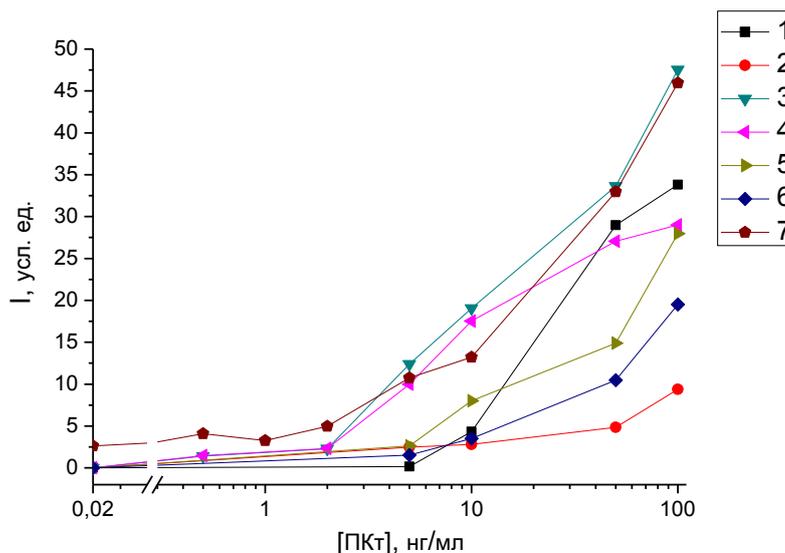


Рис. 16. Градуировочные графики, полученные для определения ПКт:

- 1) <пАт> (фаза) - <СА2> (конъюгат)
- 2) <пАт> (фаза) - <РС22> (конъюгат)
- 3) <СВ5> (фаза) - <пАт> (конъюгат)
- 4) <пАт> (фаза) - <СВ5> (конъюгат)
- 5) <СА2> (фаза) - <пАт> (конъюгат)
- 6) <СВ5> (фаза) - <РС22> (конъюгат)
- 7) <пАт> (фаза) - <Ат к катакальцину> (конъюгат).

Таблица 4. Выбор пары Ат.

№	Иммобилизованные Ат	Ат, меченные НЧЗ	Предел обнаружения ПКт, нг/мл
1	<пАт>	<СА2>	10
2	<пАт>	<РС22>	5
3	<СВ5>	<пАт>	2
4	<пАт>	<СВ5>	2
5	<СА2>	<пАт>	5
6	<СВ5>	<РС22>	10
7	<пАт>	<Ат к катакальцину>	2 (фоновый сигнал)

Наиболее низкий предел обнаружения ПКт наблюдался для ЛПИА на основе мАт <СВ5> и пАт (таблица 4). Однако, в случае использования пАт, иммобилизованных на аналитической мембране, с мечеными мАт <СВ5>, аналитический сигнал снижался (рис. 16 (4)). Использование других клонов антител и комбинаций приводило к снижению чувствительности и аналитического сигнала. Поэтому, для дальнейшей работы была выбрана комбинация <СВ5> (фаза) - <пАт> (конъюгат), которая обеспечивала наиболее низкий предел обнаружения ПКт и высокий аналитический сигнал при отсутствии фонового сигнала.

3.1.3.2. Выбор оптимального размера метки

На данном этапе работы изучали влияние размера НЧЗ (в диапазоне от 20 до 100 нм) на характеристики ЛПИА ПКт. Тест-полоску собирали с использованием выбранной ранее пары Ат: <СВ5> (фаза) - <пАт> (конъюгат). С увеличением размера наночастиц происходит увеличение площади поверхности частиц, что, теоретически, обеспечивает высокий выход иммобилизованных на поверхности НЧЗ антител и, соответственно, повышение чувствительности сэндвич-формата ЛПИА с использованием такого конъюгата. В этой связи был проведен ЛПИА в стандартных растворах ПКт с использованием в качестве метки сферических НЧЗ разного размера (рис. 17). Однако, применение НЧЗ размером 70 и 100 нм в качестве метки привело к недетектируемому,

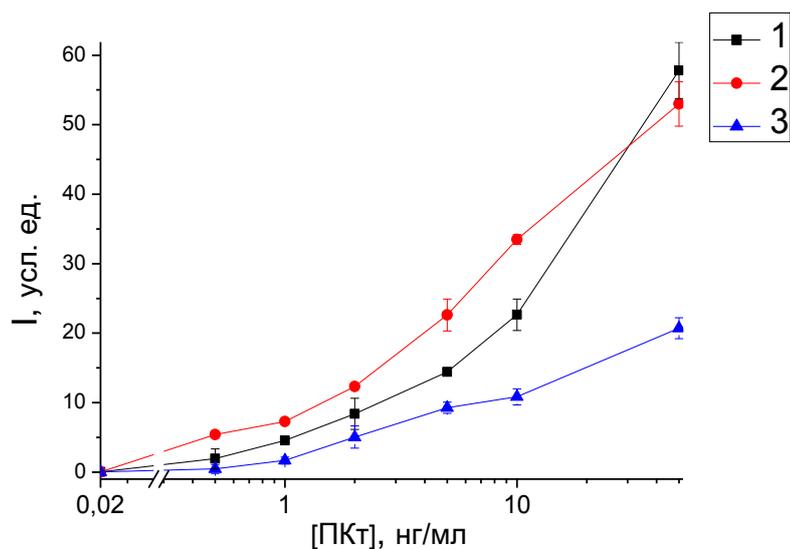


Рис. 17. Градуировочные графики ЛПИИ с использованием в качестве метки сферических наночастиц размером 20 нм (1), 35 нм (2) и 50 нм (3) для определения ПКт.

бледному окрашиванию тестовой зоны, по результатам которого было нецелесообразно строить градуировочные зависимости.

Полученные результаты показывают, что применение НЧЗ размером 35 нм позволяет незначительно снизить предел обнаружения ПКт и повысить аналитический сигнал в области низких концентраций ПКт, которые соотносятся с развитием системной инфекции в организме человека. При этом появления фонового сигнала с увеличением размера метки не наблюдалось. Повышение характеристик ЛПИИ с увеличением размера сферических наночастиц может объясняться более контрастной, пурпурной окраской метки на полоске, которая визуальнее легче детектируется на белом фоне аналитической мембраны. Однако, дальнейшее увеличение размера НЧЗ до 50 нм приводит к снижению аналитического сигнала, а частицы с размером 70 и 100 нм формируют полосу бледно-серого цвета, которую трудно оценить визуальнее или с помощью прибора. Полученные результаты согласуются с литературными данными, где было показана зависимость предела обнаружения, полученного для сэндвич-формата иммунохроматографической тест-системы, от размера НЧЗ на примере теста для определения вируса картофеля X [165]. Поэтому для дальнейшей работы в качестве метки ЛПИИ ПКт использовали сферические наночастицы размером 35 нм.

3.1.3.3. Выбор концентрации компонентов ЛПИА тест-системы

Для выбора оптимальной концентрации мАт <СВ5>, иммобилизованных на аналитической мембране, был проведен ЛПИА с использованием различных концентраций реагентов для определения ПКт в стандартных растворах (рис. 18). При изготовлении тест-полосок оптическая плотность (A_{520}) используемого раствора конъюгата пАт с НЧЗ составила 1,0. Из анализа полученных градуировочных графиков видно, что при увеличении концентрации адсорбированных мАт <СВ5> до 1 мг/мл происходит повышение интенсивности регистрируемого сигнала. Дальнейшее повышение концентрации иммобилизованных антител до 1,5 мг/мл приводит к появлению фонового сигнала в условиях отсутствия анализируемого Аг в пробе. Поэтому для формирования тестовой линии в ЛПИА для определения ПКт на аналитическую мембрану наносили 1 мг/мл мАт <СВ5>.

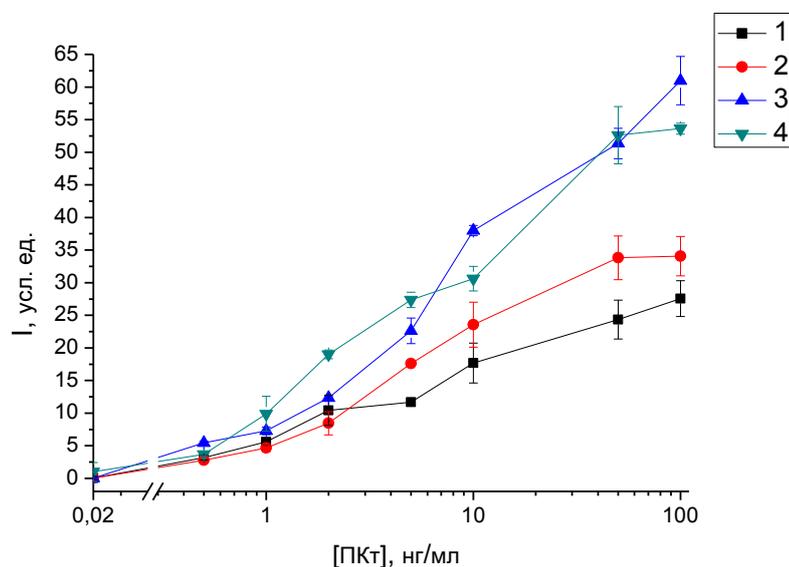


Рис. 18. Градуировочные графики, полученные для разных концентраций иммобилизованных антител: 0,25 мг/мл (1); 0,5 мг/мл (2); 1 мг/мл (3); 1,5 (4).

3.1.3.4. Выбор мембранных материалов для проведения ЛПИА ПКт

Сыворотка крови человека представляет собой сложный многокомпонентный материал, состоящий из белков, углеводов, жиров и других компонентов. Поэтому для эффективного протекания сыворотки по тест-полоске одной из главных задач при разработке ЛПИА для определения ПКт в сыворотках крови человека является выбор оптимальных мембранных компонентов. Основная функция мембран для нанесения образца заключается в отделении компонентов, входящих в состав анализируемых

образцов сыворотки, которые могут оказывать негативное влияние на чувствительность и специфичность анализа. Основное отличие мембран состоит в методах предобработки: добавление различных солей, детергентов и др. Обычно, конкретные описания свойств и структур мембран производителями не приводятся. Поэтому подбор мембраны для нанесения образца с целью разработки определенного ЛПИА необходимо осуществлять экспериментально.

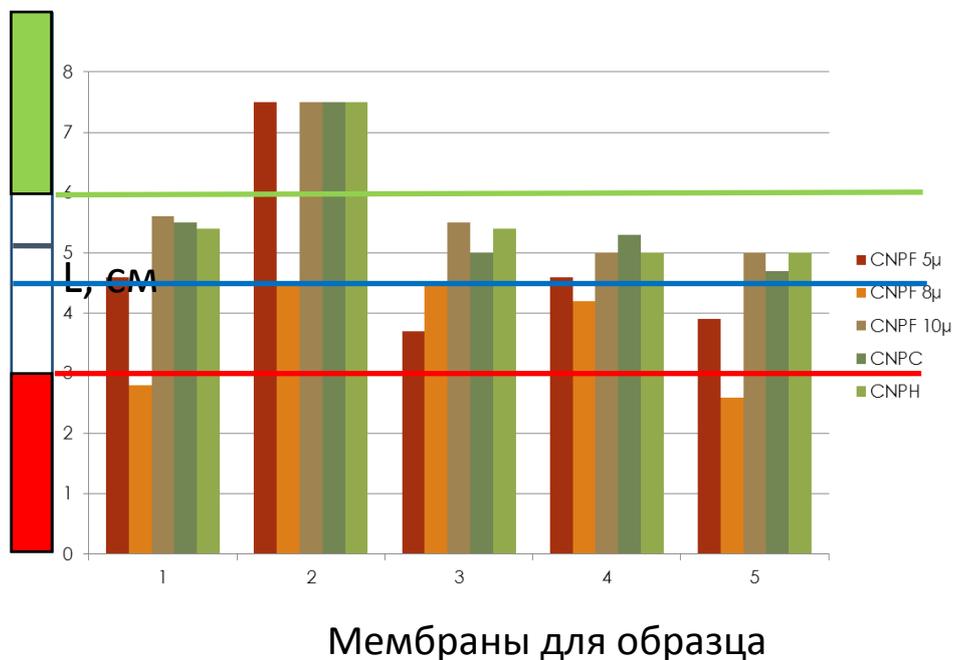
Для разработки ЛПИА были изучены 5 типов мембран для нанесения образца, различающихся своей структурой и свойствами (GFB-R7L; GFB-R4; Arista Biol., FR1 (0,35) и FR1 (0,6)), а также пять типов аналитических мембран (CNPf (5 мкм), CNPF (8 мкм), CNPF (10 мкм), 150-N-CNPH, CNPC (15 мкм)), отличающихся по своей сорбционной емкости, скорости протекания жидкости и размерам пор (таблица 5).

Таблица 5. Характеристики аналитических мембран фирмы «MDI».

Мембрана	Размер пор, мкм	Скорость протекания жидкости	Толщина мембрана, мкм	Связывающая способность белков
CNPf	5	220 сек/4 см	100	низкая
CNPf	8	170 сек/4 см	100	низкая
CNPf	10	125 сек/4 см	100	низкая
150-N-CNPH	-	150 сек/4 см	110	высокая
CNPC	15	100 сек/4 см	105	средняя

Для проведения эксперимента фиксировали объем (100 мкл сыворотки) и время протекания (10 минут) образца. Выбор комбинации мембран был основан на критериях наименьшего времени протекания сыворотки крови человека и прохождением образца до зоны впитывающей мембраны (рис. 19). Показано, что не для всех комбинаций мембран образец доходит до зоны абсорбирующей мембраны. Наилучшими характеристиками обладали мембраны для образца GFB-R4 (0,35) и GFB-R7L (0,6) в комбинации с аналитическими мембранами CNPF (10 мкм), CNPC и CNPH. Однако скорость протекания сыворотки выше в случае мембраны для образца GFB-R4 (0,35). Для выбора аналитической мембраны был проведен ЛПИА с использованием аналитических мембран CNPF (10 мкм), CNPC (15 мкм) и CNPH в комбинации с мембраной для образца GFB-R4 (0,35) для определения ПКт в стандартных образцах (рис. 20). Показано, что

аналитический сигнал в ЛПИА для определения ПКт с использованием аналитической мембраны CNPC незначительно превышал аналогичный, полученный для аналитических мембран 150-N-CNPH и CNPF (10 мкм).



Мембраны для образца: (1) – GFB-R7L (0,6); (2) – GFB-R4 (0,35); (3) – Arista Biol.; (4) – FR1 (0,35); (5) – FR1 (0,6).

Рис. 19. Выбор аналитической мембраны и мембраны для образца.

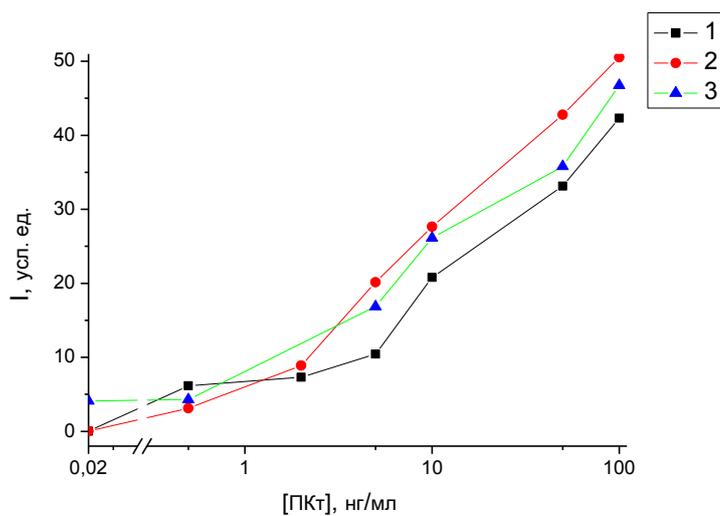


Рис. 20. Градуировочные графики ЛПИА ПКт, полученные для разных аналитических мембран: (1) – 150-N-CNPH; (2) – CNPC (15μ); (3) – CNPF (10μ).

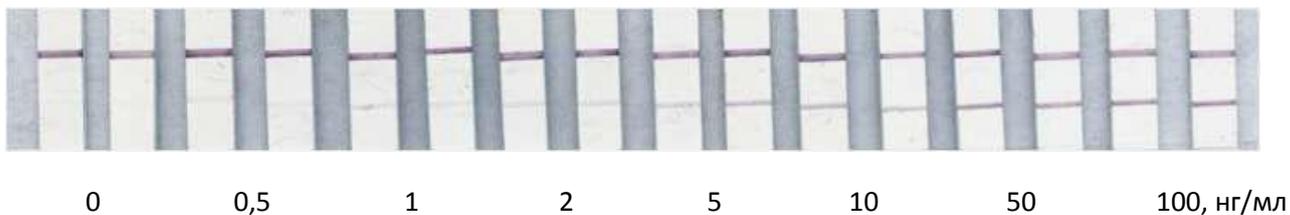
Кроме того, использование аналитической мембраны CNPF (10 мкм) приводило к появлению фонового сигнала в отсутствии анализируемого Аг. Таким образом, для дальнейших исследований была выбрана аналитическая мембрана CNPC с размером пор 15 мкм и наименьшим временем протекания жидкости в комбинации с мембраной для образца GFB-R4 (0,35).

3.2. ЛПИИ с использованием сферических наночастиц в качестве метки для определения ПКт

С учетом подобранных оптимальных компонентов и реагентов тест-системы был проведен ЛПИИ в стандартных растворах, содержащих определенные концентрации ПКт. Для компоновки тест-полоски использовали аналитическую мембрану CNPC (15 мкм) и мембрану для образца GFB-R4 (0,35); конъюгат пАт, меченных сферическими НЧЗ размером 35 нм, наносили на мембрану для конъюгата; на аналитическую мембрану иммобилизовали раствор моноклональных антител <CB5> с концентрацией 1 мг/мл в ФБС, для формирования контрольной линии использовали раствор белка А с концентрацией 0,5 мг/мл в ФБС. Предел обнаружения ПКт составил 0,5 нг/мл (рис. 21). Разработанная тест-система для определения ПКт позволяет визуально и инструментально регистрировать значения концентрации ПКт, соответствующие наличию системной инфекции, однако не позволяет определять ПКт в диапазоне от 0,25 до 0,5 нг/мл, коррелирующие с локальной бактериальной инфекцией в организме человека. Поэтому с целью снижения предела обнаружения ПКт для разработки высокочувствительного ЛПИИ было предложено рассмотреть различные подходы, а также разработать новые способы для снижения предела обнаружения исследуемого соединения.

Среди проведенных исследований в области ЛПИИ для определения различных биологически активных соединений можно выделить два фактора, влияющих на чувствительность метода - это используемые метки для генерирования сигнала и методы регистрации результатов анализа. Таким образом, можно отметить несколько основных путей для повышения чувствительности ЛПИИ: 1) при использовании в качестве метки НЧЗ - модификация метки или введение дополнительной стадии анализа с целью усиления регистрируемого сигнала; 2) применение меток более сложного состава или разработка новых типов меток и систем, направленных на повышение аналитического сигнала; 3) оптимизация анализа или системы регистрации сигнала.

а)



б)

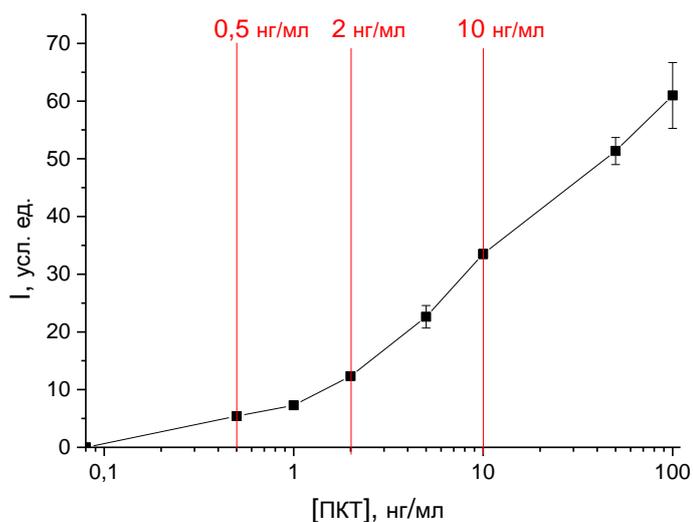


Рис. 21. Результаты ЛПИА (а) и градуировочный график, полученный для ЛПИА ПКт в стандартных растворах (б). Красными вертикальными линиями обозначены клинически важные диапазоны концентраций ПКт в сыворотке.

3.3. Подходы, направленные на повышение чувствительности ЛПИА для определения ПКт

3.3.1. Модификация метки с целью повышения чувствительности анализа ПКт

3.3.1.1. ЛПИА с использованием в качестве метки НЧЗ и фермента

Одним из преимуществ НЧЗ является возможность их использования не только как основной метки в ЛПИА, но и в качестве носителей дополнительной ферментной метки. При использовании в качестве прямой метки, НЧЗ формируют красные полосы в тестовой и контрольной зонах тест-системы, но при связывании наночастиц с Ат,

модифицированными ПХ, они проявляют свойства носителей метки. В работе было предложено использовать в качестве такой двойной метки конъюгат НЧЗ с Ат, предварительно уже меченными ПХ. Таким образом, визуальную окраску в тестовой линии, формируемую за счет образования меченого НЧЗ специфического иммунокомплекса, можно дополнительно "усилить" образованием окрашенного продукта ферментативной реакции. За основу разработки ЛПИИ с использованием двойной метки НЧЗ – ПХ были приняты результаты, представленные ранее в работе [20].

Для разработки ЛПИИ с использованием метки НЧЗ (35 нм) – ПХ был получен конъюгат золотых наночастиц с коммерческим препаратом пАт, меченных ПХ. Оптимальные условия для приготовления конъюгата (рН и концентрация меченых ПХ антител) были выбраны на основании кривых зависимостей разности оптических поглощений от концентрации антител для разных значений рН (рис. 22).

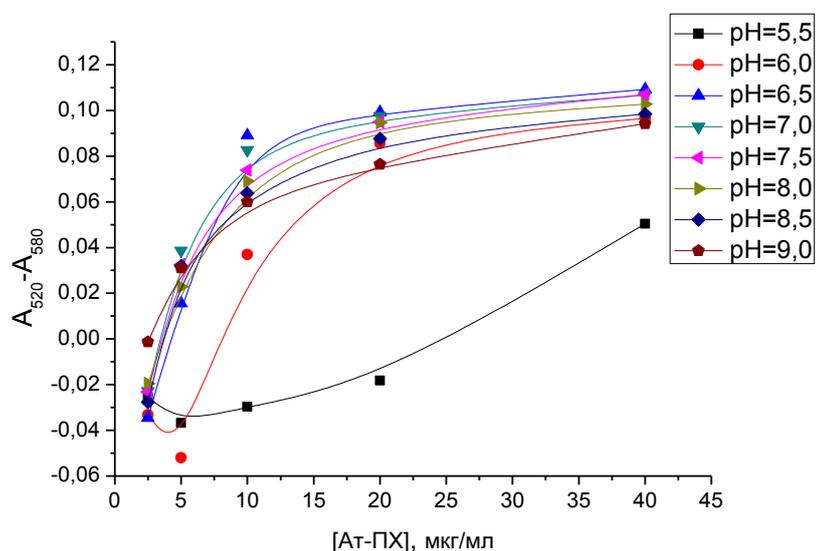


Рис. 22. Зависимости разности оптического поглощения от концентрации, полученные для конъюгата пАт с ПХ, при разных значениях рН.

Оптимальными условиями для получения стабильного конъюгата пАт, меченных ПХ, с НЧЗ были выбраны: 15 мкг/мл пАт-ПХ; рН 7,0. Полученный конъюгат наносили на мембрану для конъюгата и высушивали. Однако, уже на следующий день фермент терял свою активность. Добавление стабилизаторов или лиофильное высушивание конъюгата на мембране позволяет продлить активность фермента не более, чем на 4-5 суток. Поэтому, для проведения ЛПИИ на основе НЧЗ и фермента конъюгат Ат, меченных ПХ и НЧЗ, использовали в жидком виде. Так как данный способ снижения предела обнаружения

аналита состоит в применении дополнительной ферментной метки, формирующей дополнительное яркое окрашивание в тестовой зоне полоски, на аналитическую мембрану наносили раствор мАт с концентрацией 0,5 мг/мл, что в 2 раза ниже экспериментально подобранной для ЛПИИА с использованием НЧЗ размером 35 нм. Для проведения анализа, конъюгат Ат с НЧЗ и ПХ ($A_{520}=1,0$) смешивали с раствором, содержащим определенные концентрации ПКт, и наносили на мембрану для образца. После пропускания растворов детектировали два сигнала, один из которых соответствовал красному окрашиванию НЧЗ, а второй – окраске хромогена, образующейся в результате ферментативной активности ПХ. Красное окрашивание наночастиц позволило визуально определять 1 нг/мл ПКт. После проведения дополнительной стадии инкубации тест-полосок в растворе субстрата ТМБ с добавлением декстрансульфата, который фиксирует окрашенный продукт в тестовой и контрольной зонах полоски, появлялось синее окрашивание на аналитической мембране. На рисунке 23 представлены градуировочные графики, полученные для ЛПИИА без проведения дополнительной стадии окрашивания (1) и после применения субстрата (2). Как видно из результатов, повышение аналитического сигнала в случае ЛПИИА на основе НЧЗ-ПХ сопровождается значительным усилением фонового сигнала.

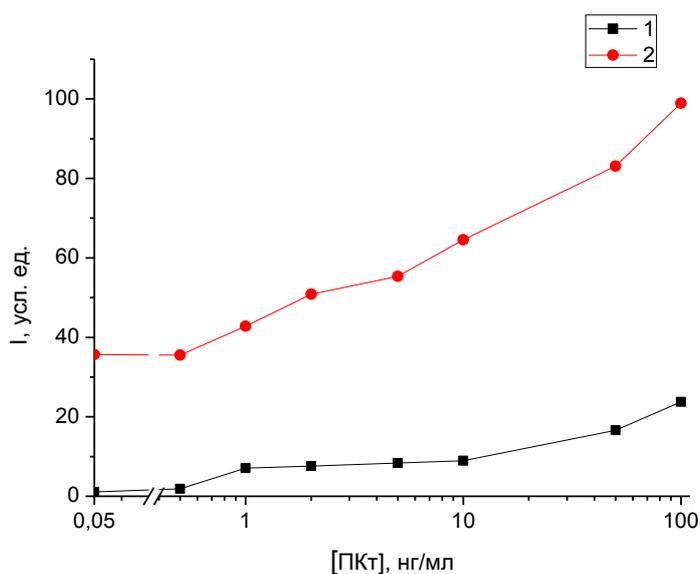


Рис. 23. Градуировочные графики ЛПИИА на основе метки НЧЗ (20 нм) – пероксидаза хрена до (1) и после окрашивания ТМБ (2).

С целью снижения фонового сигнала ЛПИИА с использованием двойной метки НЧЗ-ПХ было предложено использовать два подхода: снизить концентрацию иммобилизованных мАт <CB5> до 0,25 мг/мл или снизить концентрацию метки

(концентрация конъюгата соответствовала $A_{520}=0,5$). Как видно из представленных на рисунке 24 результатов, фоновый сигнал снизился вдвое, при этом наклон градуировочных графиков увеличился. Однако, легко детектируемый фоновый сигнал при отсутствии ПКт в образце сильно затрудняет визуальную оценку результатов анализа.

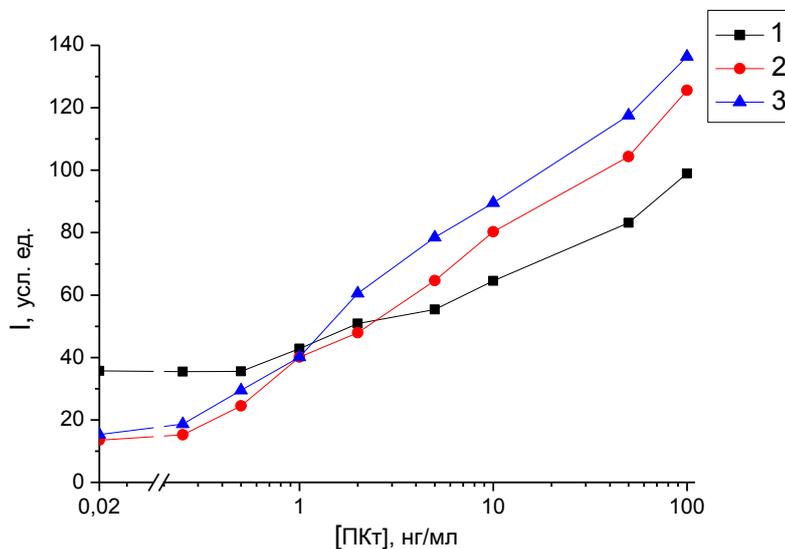


Рис. 24. Градуировочные графики ЛПИИ на основе метки НЧЗ (20 нм) – пероксидаза хрена: $m_{At} <CB5>=0,5$ мг/мл – конъюгат Ат-ПХ ($A=1,0$) (1); $m_{At} <CB5>=0,5$ мг/мл – конъюгат Ат-ПХ ($A=0,5$) (2); $m_{At} <CB5>=0,25$ мг/мл – конъюгат Ат-ПХ ($A=1,0$) (3).

В этой связи, было предложено снизить концентрацию двух компонентов – иммобилизованных антител и концентрацию раствора конъюгата, что позволило достичь необходимых аналитических характеристик. На рисунке 25 представлены визуальные результаты, полученные ЛПИИ со следующими условиями: на аналитической мембране иммобилизованы $m_{At} <CB5>$ в концентрации 0,25 мг/мл, раствор конъюгата пАт-ПХ-НЧЗ с оптической плотностью раствора 0,5. Как видно, фоновый сигнал снизился, при этом интенсивность аналитического сигнала оставалась высокой. Разработанный метод позволил сместить область определяемых концентраций ПКт в сторону низких концентраций, предел обнаружения в данном случае составил 0,1 нг/мл.

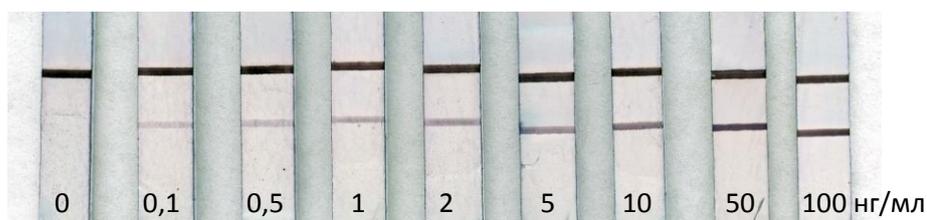


Рис. 25. Визуальный результат ЛПИА на основе НЧЗ, усиленный ПХ, после пропускания стандартных растворов ПКт.

Сравнение градуировочных графиков, полученных для ЛПИА на основе НЧЗ (35 нм) и ЛПИА с введением дополнительной ферментной метки показало, что предложенный подход для усиления аналитического сигнала позволяет снизить предел обнаружения ПКт в 5 раз (рис. 26) и визуально детектировать низкие концентрации ПКт (0,1 нг/мл), соответствующие наличию бактериальных инфекций в организме человека. Однако, данный подход усиления сигнала, генерируемого НЧЗ, заключающийся в использовании наночастиц в качестве дополнительного носителя ферментной метки, имеет ряд недостатков: нестабильность конъюгата Ат, меченных ПХ, с НЧЗ в высушенном виде, что не позволяет создать тест-полоску с готовыми компонентами; необходимость проведения дополнительных стадий анализа; увеличение продолжительности анализа до 30 минут. Таким образом, метод ЛПИА на основе двойной метки состава НЧЗ-ПХ не вполне соответствует требованиям быстрых тест-систем для анализа различных биомаркеров вне лабораторных условий.

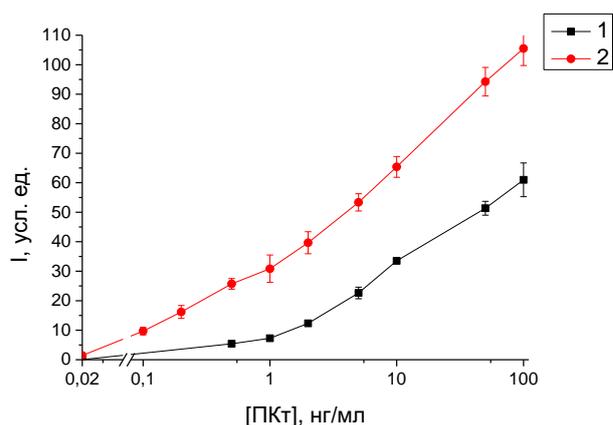


Рис. 26. Градуировочные графики ЛПИА на основе метки НЧЗ размером 35 нм (1) и ЛПИА на основе метки НЧЗ-ПХ (2) для определения ПКт в стандартных растворах.

3.3.1.2. ЛПИА на основе системы биотин-стрептавидин

Из литературных данных известно, что комплекс биотин-стрептавидин обладает хорошей реакционной специфичностью и высокой аффинностью. Каждая молекула стрептавидаина содержит четыре сайта связывания биотина. При добавлении стрептавидаина к меченым НЧЗ биотинилированным Ат образуются стабильные укрупненные агломераты НЧЗ, состоящие из нескольких исходных наночастиц меньшего размера, с адсорбированными на их поверхности Ат (рис. 27). При добавлении образца, содержащего определяемый Аг, происходит его взаимодействие с комплексным агломератом из стрептавидаина и меченых биотинилированных антител. В тестовой зоне происходит связывание сложного иммунокомплекса иммобилизованными специфическими Ат и наблюдается появление окрашенной полосы, интенсивность цвета которой пропорциональна содержанию анализируемого вещества в образце. Таким образом, можно предположить, что применение комплексных подходов в ЛПИА, основанных на формировании агломератов из большого числа золотых наночастиц за счет связывания биотина со стрептавидином, может позволить также усилить сигнал в аналитической зоне тест полоски. При этом должны сохраняться основные требования к быстрым тестам: анализ должен быть простым, проводиться в одну стадию без дополнительных манипуляций.

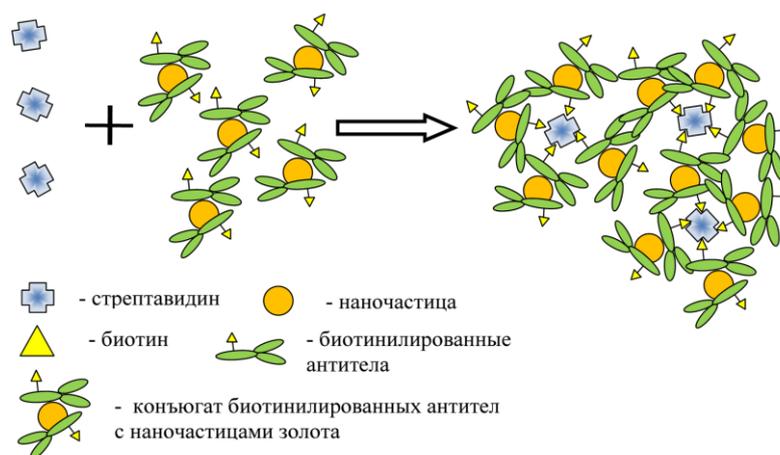


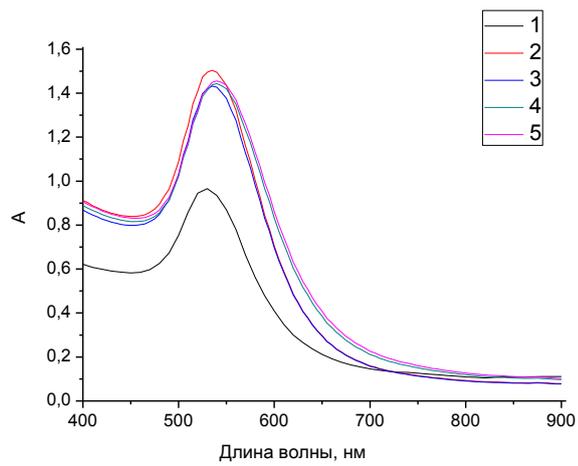
Рис. 27. Схема получения комплексного агломерата из стрептавидаина и конъюгата биотинилированных Ат с НЧЗ.

Для разработки ЛПИА на основе системы биотин-стрептавидин были получены комплексные конъюгаты, состоящие из биотинилированных поликлональных антител, меченных золотыми наночастицами, и стрептавидаина. При добавлении стрептавидаина к

раствору биотинилированных пАт, меченных НЧЗ, образуются агломераты, состоящие из исходных НЧЗ меньшего размера. В данном случае молекулы стрептавидина выполняют роль сшивки отдельных исходных НЧЗ между собой. Использование в ЛПИА образующегося комплексного конъюгата, который содержит агломерат НЧЗ, должно приводить к усилению регистрируемого сигнала за счет увеличения числа связанных НЧЗ.

С целью выбора необходимых условий для обеспечения наиболее низкого предела обнаружения Аг на основе системы биотин-стрептавидин варьировали концентрационные соотношения биотинилированных пАт, меченных золотыми наночастицами, к стрептавидину (рис. 28б). С увеличением концентрации стрептавидина, добавляемого к конъюгату биотинилированных антител, меченных НЧЗ, цвет тестовой линии на полосках менялся от красного к фиолетовому. Это объясняется образованием более крупных комплексных конъюгатов, о чем свидетельствует сдвиг пика плазмонного резонанса в длинноволновую область (рис. 28а). Из анализа градуировочных графиков, полученных для ЛПИА с разным концентрационным соотношением биотинилированных пАт, меченных НЧЗ, к стрептавидину, следует, что увеличение концентрации стрептавидина в комплексном конъюгате приводит к незначительному снижению чувствительности ЛПИА для определения ПКт (рис. 29а). Вероятно, это может быть следствием возникающих стерических затруднений при захвате Ат-ми, иммобилизованными на аналитической мембране, сложного конъюгата с Аг. Кривые 1 и 2, соответствующие соотношениям биотина к стрептавидину 15:1 и 15:3, соответственно, практически совпадают по характеристикам. Поэтому оптимальным для формирования агломератов НЧЗ было выбрано соотношение 15:1. Предел обнаружения предложенного ЛПИА на основе комплексного конъюгата для определения ПКт в стандартных растворах составил 0,1 нг/мл (рис. 29б).

а)



б)

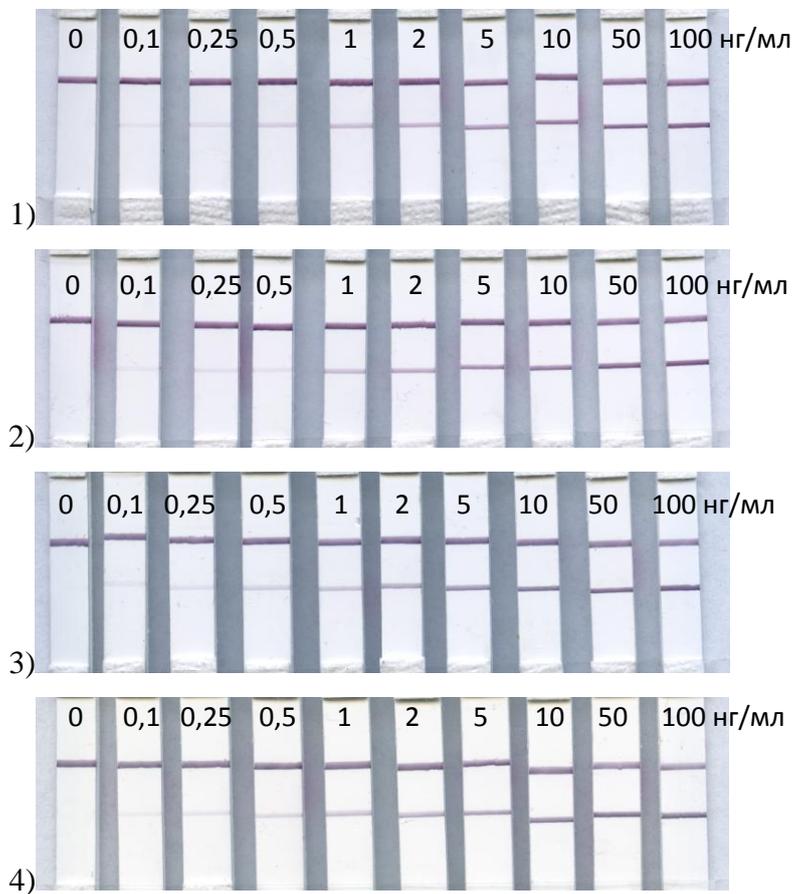


Рис. 28. Спектры поглощения, полученные для конъюгата без реализации системы биотин-стрептавидин (1); для комплексных конъюгатов с разным соотношением биотина к стрептавидину: 15:1 (2), 15:3 (3), 15:5 (4) и 15:10 (5) (а). Визуальные результаты ЛПИА на основе системы биотин-стрептавидин, полученные для соотношений биотина к стрептавидину: 15:1 (1), 15:3 (2), 15:5 (3) и 15:10 (4) (б).

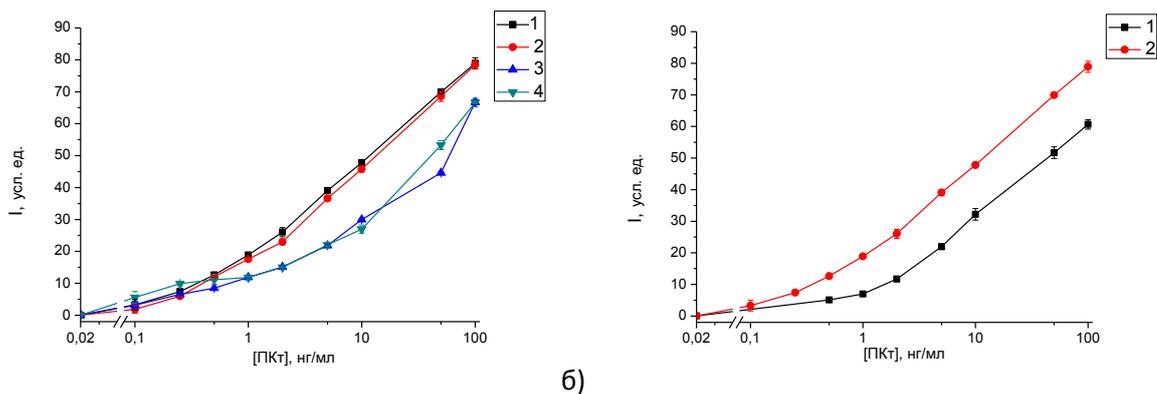


Рис. 29. Градуировочные графики ЛПИА на основе комплексного конъюгата для определения ПКТ, полученные для разных соотношений концентраций биотинилированных Ат и стрептавидина (15:1 (1); 15:3 (2); 15:5 (3) и 15:10 (4)) (а); сравнение градуировочных графиков, полученных ЛПИА на основе НЧЗ размером 35 нм (1), и ЛПИА на основе комплексного конъюгата с соотношением компонентов 15:1 (2) (б).

Таким образом, новая схема для повышения чувствительности ЛПИА, основанная на использовании комплексного конъюгата, образующегося в результате связывания меченых НЧЗ биотинилированных антител со стрептавидином, позволяет снизить предел обнаружения ПКТ в 5 раз по сравнению со стандартным ЛПИА на основе 35 нм НЧЗ. Следует отметить, что основным преимуществом данного способа является возможность повышения чувствительности количественного визуального анализа биологически активных соединений без изменения самой схемы проведения анализа и усложнения строения используемой тест-системы, что особенно выжно для разработки быстрых тестов с целью определения диагностически важных соединений.

3.3.1.3. ЛПИА с использованием несферических НЧЗ большого размера в качестве метки

Данные о свойствах различных типов НЧЗ (в форме так называемых звезд, цветов или попкорнов и т.д.), полученные за последние десятилетия, позволили сделать предположение о возможности их эффективного внедрения в качестве метки в ЛПИА. НЧЗ нетривиальной формы обладают большой площадью поверхности по сравнению с широко используемыми сферическими наночастицами, что, тем самым, позволяет повысить выход иммобилизованных антител. Кроме того, несферические НЧЗ обладают контрастной окраской, которая визуальна легко детектируется в тестовой зоне полоски. Поэтому введение несферических НЧЗ в ЛПИА может обеспечить существенное усиление

сигнала по сравнению со стандартным ЛПИА с использованием сферических НЧЗ. Опубликованы единичные работы применения НЧЗ несферической формы в виде цветов в ЛПИА для повышения чувствительности [46,166]. Однако, систематизированные данные о влиянии размера и формы золотых наночастиц на чувствительность ЛПИА не описаны. В этой связи, было изучено влияние несферических НЧЗ на примере наночастиц в форме попкорна (цветов) и звезд на характеристики сэндвич-формата ЛПИА ПКТ.

НЧЗ в форме попкорна [46] и звезд [156] получали в ходе двухступенчатого синтеза с промежуточной стадией образования зародышей и дальнейшим объединением ростового раствора с суспензией зародышей. На фотографиях, полученных с помощью ПЭМ, изображены НЧЗ со средним диаметром $100,1 \pm 5,7$ нм и $64,3 \pm 3,0$ нм, имеющие форму попкорна и звезд, соответственно (рис. 30). По данным спектров поглощения, пик плазмонного резонанса для НЧЗ в форме попкорна наблюдался в области 683 нм, а для НЧЗ в форме звезд – при 633 нм. (рис. 31).

Для приготовления конъюгатов НЧЗ в форме звезд и попкорна необходимо проведение биосовместимого синтеза в водной среде без добавления поверхностно-активных соединений. В некоторых работах описаны методы без использования поверхностно-активных веществ, позволяющие получать монодисперсные золотые нанозвезды и нанопопкорны с высоким выходом [163,167]. Для получения конъюгатов пАт, меченных наночастицами в форме звезд или попкорнов использовали наиболее распространенный способ получения меченых иммунореагентов, основанный на нековалентной (адсорбционной) конъюгации, при которой сохраняются структура и функциональные свойства Ат. Оптимизация условий для проведения анализа включала эмпирический подбор концентраций пАт, необходимых для получения стабильных иммунопроб, и составила 15 мкг/мл для НЧЗ в форме попкорна; 40 мкг/мл для НЧЗ в форме звезд с рН=7,5. Следует отметить, что для приготовления стабильных конъюгатов на основе НЧЗ в форме попкорна размером 100 нм требуется примерно в два раза меньше антител по сравнению со сферами (п. 3.1.2.) и звездами того же размера. Для проведения ЛПИА с использованием в качестве метки несферических НЧЗ были подобраны следующие оптимальные условия: концентрация раствора мАт <СВ5>, используемого для адсорбции в тестовой зоне мембраны, составила 0,5 мг/мл; на мембрану для конъюгата наносили раствор пАт, меченных НЧЗ с оптической плотностью 2,0. Согласно выбранным оптимальным условиям, был проведен ЛПИА с использованием несферических НЧЗ для определения ПКТ в стандартных растворах (рис. 32).

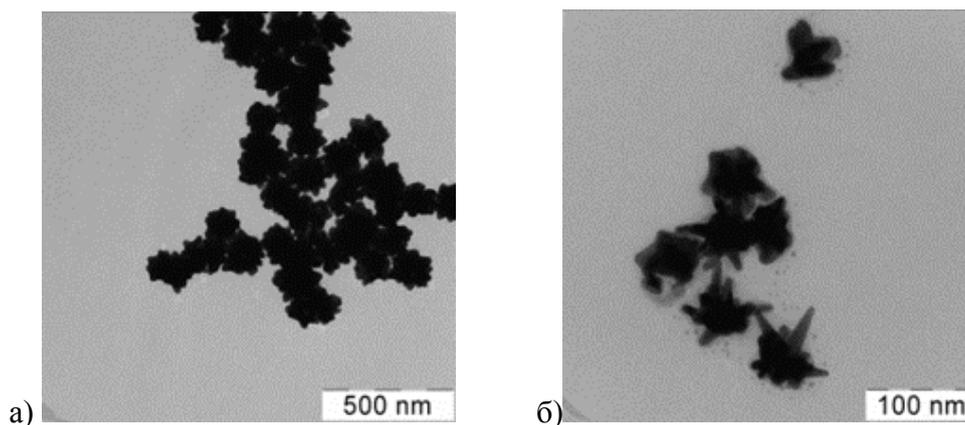


Рис. 30. Характеристика полученных образцов НЧЗ методом ПЭМ: а) НЧЗ в форме попкорна; б) НЧЗ в форме звезд.

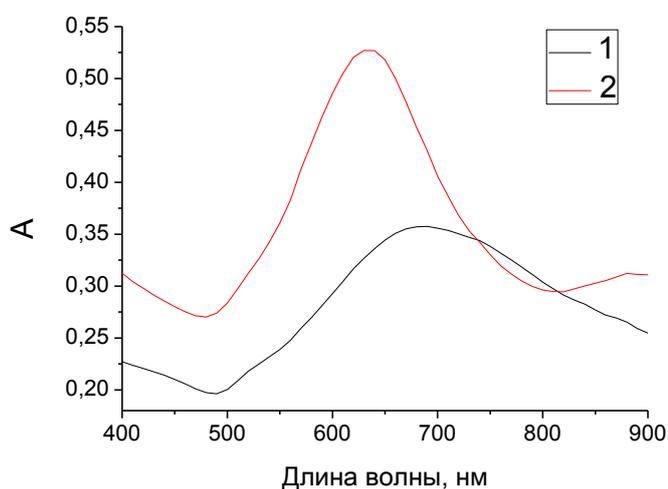


Рис. 31. Спектры поглощения для образцов: 1 - нанопопкорнов (100 нм); 2 – нанозвезд (64 нм).

По сравнению со сферическими НЧЗ большого размера (70 и 100 нм), описанными выше, структурированные наночастицы формировали на полосках контрастное и визуально хорошо детектируемое серо-синее окрашивание тестовой линии после пропускания стандартных растворов ПКт (рис. 33). Это объясняется сдвигом пика плазмонного резонанса несферических частиц в длинноволновую область, к примеру, пик плазмонного резонанса для сфер размером 100 нм находится при 582 нм, а для нанопопкорна – 683 нм.

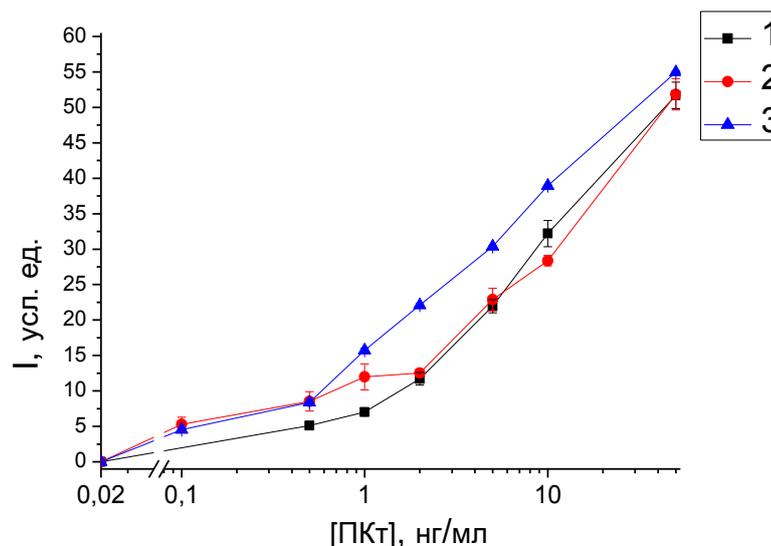


Рис. 32. Градуировочные графики ЛПИИ на основе НЧЗ сферической формы размером 35 нм (1), НЧЗ в форме звезд (2) и наночастиц в форме попкорна (3) для определения ПКТ в стандартных растворах.

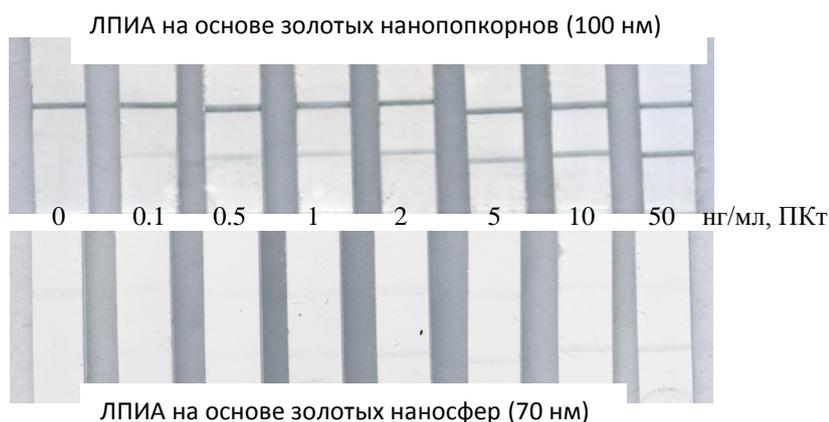


Рис. 33. Сравнение результатов ЛПИИ на тест-полосках для НЧЗ в форме попкорна и сферических НЧЗ.

НЧЗ в форме звезд нашли широкое применение в фотоакустической визуализации [168], плазмонно-резонансной фототермической терапии [169] и биосенсорах [170] благодаря своим уникальным свойствам рассеяния света и поглощающим свойствам. Однако, характеристики ЛПИИ с использованием НЧЗ в форме звезд сравнимы с ЛПИИ на основе золотых наносфер размером меньше 50 нм. Полученные результаты можно объяснить возникновением стерических затруднений из-за игольчатой структуры частиц и неравномерным распределением антител на поверхности нанозвезд, что приводит к

сложности связывания иммобилизованными на аналитической мембране специфическими Ат комплекса Аг-меченые Ат. Диапазон определяемых концентраций ПКт в случае применения несферических НЧЗ в форме попкорна в качестве метки смещается в сторону более низких концентраций с пределом обнаружения 0,1 нг/мл, что в 5 раз ниже предела обнаружения Аг методом ЛПИИА на основе сферических НЧЗ размером 35 нм (рис. 34). При этом расход специфических реагентов, используемых для иммобилизации на аналитической мембране, в два раза ниже в случае применения в качестве метки НЧЗ в форме попкорна. На основе полученных результатов можно утверждать, что на чувствительность анализа влияет не размер метки, а ее форма.

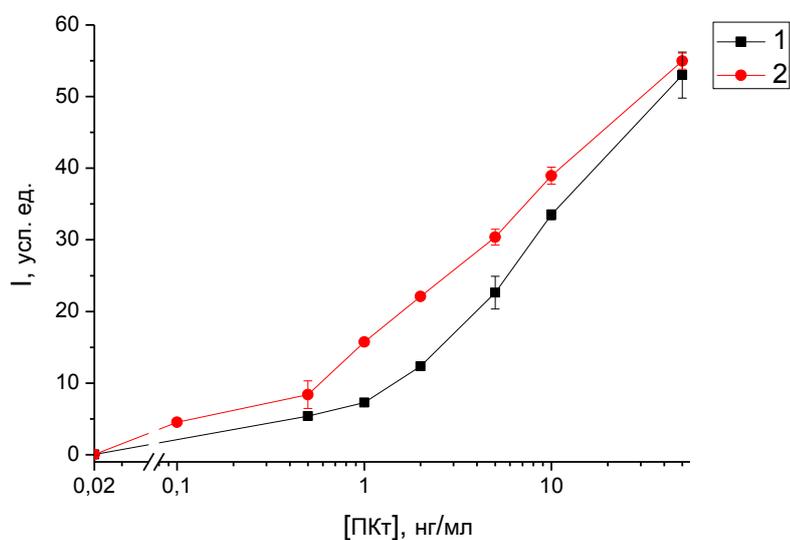


Рис. 34. Градуировочные графики, полученные для ЛПИИА при следующих условиях: 1 мг/мл мАт <CB5> - конъюгат пАт со сферическими НЧЗ размером 35 нм (1); 0,5 мг/мл мАт <CB5> - конъюгат пАт с золотыми нанопопкорнами размером 100 нм (2).

Таким образом, на основании описанных выше результатов ЛПИИА с использованием сферических НЧЗ размером 20-100 нм и ЛПИИА с использованием несферических НЧЗ можно сделать следующие выводы: увеличение размера сферических НЧЗ до 35 нм приводит к снижению предела обнаружения исследуемого аналита; применение сферических наночастиц большого размера (более 35 нм) нецелесообразно из-за низкой стабильности коллоидных растворов, а также снижения яркости окрашивания метки, что приводит к сложности визуального и приборного детектирования на тест-полоске; напротив, несферические НЧЗ имеют контрастную окраску, которую можно легко оценить визуально или с помощью прибора, что, соответственно, приводит к

снижению предела обнаружения ПКТ. Кроме того, расход специфических реагентов при разработке ЛПИА с использованием НЧЗ в форме попкорна незначительно ниже, чем для ЛПИА на основе сферических наночастиц (35 нм).

3.3.1.4. Метод усиления серебром

Одним из подходов к повышению аналитического сигнала, генерируемого НЧЗ, является метод усиления серебром. Осаждение серебра на золоте – хорошо изученное явление, которое, благодаря своей простоте и достигаемой высокой чувствительности используется в течение последних 30 лет в биосенсорах для усиления сигнала [50]. Осаждение серебра на золоте осуществляется путем смешения соли серебра (нитрата или ацетата) с восстановителем (гидрохинон в кислой среде) (рис. 6) [171].

Значительное повышение детектируемого сигнала, достигаемое путем метода усиления серебром, объясняется увеличением размера наночастиц и контрастом черных наночастиц серебра по сравнению с красными НЧЗ на белом фоне аналитической мембраны. Согласно литературным данным, размер сферических НЧЗ, используемых в ЛПИА с дополнительной стадией усиления серебром, обычно не превышает 30 нм [172,173]. В этой связи, для разработки ЛПИА с дополнительной стадией усиления серебром использовали НЧЗ размером 20 нм.

С целью снижения предела обнаружения ПКТ методом ЛПИА был реализован метод усиления серебром. Для компоновки полоски на мембрану для конъюгата наносили раствор пАт, меченных НЧЗ размером 20 нм; на аналитическую мембрану наносили 0,5 мг/мл мАт <СВ5>. Анализ проводили в стандартных растворах, содержащих определенные концентрации ПКТ. После образования окрашенных красных полосок на аналитической мембране, связанных с формированием иммунокомплекса, меченного сферическими НЧЗ размером 20 нм, полоску погружали в усиливающий раствор на 10 минут. Окрашенные полоски в аналитической зоне тест-полоски меняли свой цвет с красного на контрастный, черный.

На рисунке 35а представлены фотографии тест-полосок после использования набора для усиления серебром, и градуировочные графики, полученные для ЛПИА с дополнительной стадией усиления и традиционного ЛПИА с использованием в качестве метки сферических НЧЗ размером 20 нм. При использовании набора для усиления серебром, диапазон определяемых концентраций ПКТ смещался в область низких концентраций, а предел обнаружения составил 0,05 нг/мл (рис. 35б).

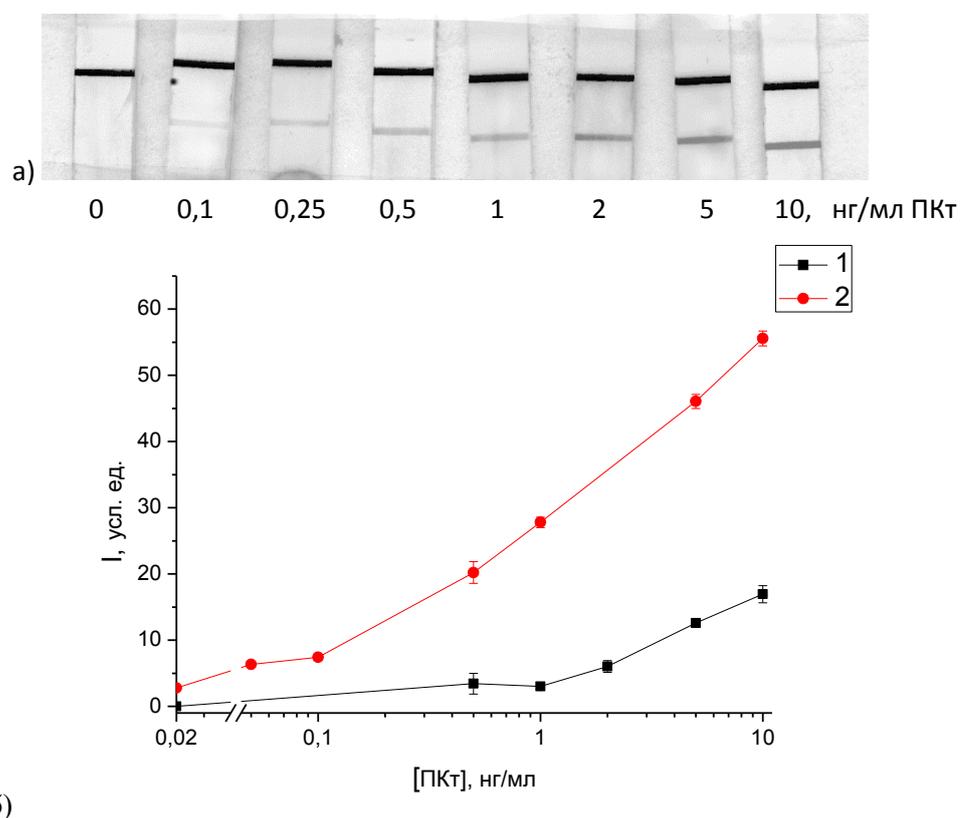


Рис. 35. ЛПИИ для определения ПКТ с использованием метода усиления серебром: а) Тест-полоски после проведения процедуры усиления серебром; б) Градуировочные графики, полученные для ЛПИИ на основе сферических НЧЗ (20 нм) до (1) и после применения метода усиления серебром (2).

3.3.1.4.1. Апробация ЛПИИ с использованием НЧЗ, усиленного серебром, на реальных образцах сыворотки крови человека

С целью оценки эффективности метода усиления серебром для повышения чувствительности ЛПИИ ПКТ была проведена апробация тест-системы на 15 реальных образцах сыворотки. Анализ образцов и стандартных образцов ПКТ методом ЛПИИ на основе НЧЗ, усиленного серебром, проводили параллельно с методом сравнения, ИФА-ПКТ. Согласно результатам стандартного метода ИФА, образцы сыворотки содержали ПКТ в диапазоне от 0,1 до 13 нг/мл. На рисунке 36 представлено графическое изображение результатов анализа, на котором по оси абсцисс отложены концентрации ПКТ, измеренные стандартным методом ИФА, а по оси ординат – интенсивность аналитического сигнала на тест-полоске после проведения ЛПИИ с дополнительной стадией усиления серебром.

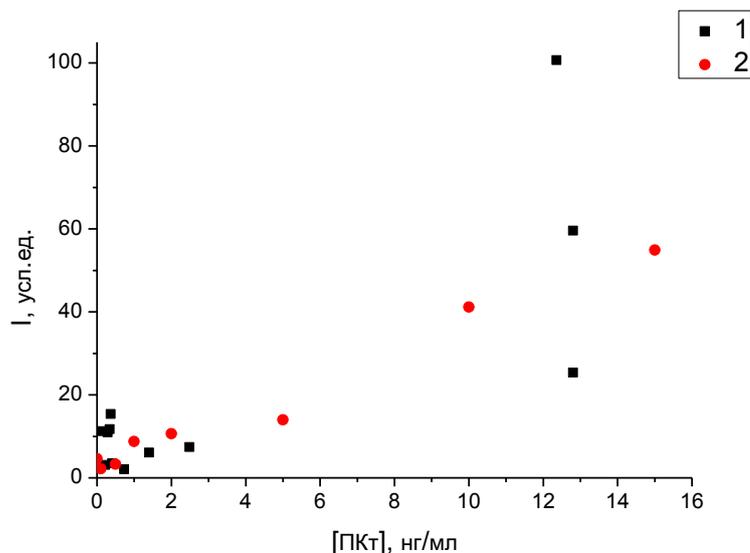


Рис. 36. Сравнение результатов, полученных методом ЛПИА на основе усиления серебром, для определения ПКТ в сыворотках крови (1) и в стандартных растворах ПКТ (2).

Визуальный предел обнаружения ПКТ с помощью традиционного ЛПИА на основе НЧЗ размером 20 нм составляет 0,5 нг/мл. После реализации метода усиления серебром, цвет тестовой линии менялся с красного на черный, при этом интенсивность окрашивания значительно повышалась. Таким образом, с помощью данного подхода можно визуально детектировать 0,1 нг/мл ПКТ.

Однако, результаты, полученные ЛПИА на основе НЧЗ с последующей процедурой усиления серебром, не совпадают с градуировочной кривой, построенной по результатам определения ПКТ в стандартных растворах этим же методом. Как видно из рисунка 35, для приблизительно равных концентраций ПКТ наблюдается большой разброс значений интенсивности аналитического сигнала. Это может быть связано с невымывшимися остатками хлорид-ионов и других анионов на тест-полосках, которые образуют нерастворимые осадки с серебром, что тем самым приводит к появлению неспецифического сигнала. Таким образом, основным недостатком метода усиления серебром является мешающее влияние хлорид-ионов, которое ограничивает применение данного подхода в ЛПИА тестах с использованием хлоридсодержащих растворов. Интенсивное промывание тест-полосок, рекомендованное для снижения неспецифического связывания, занимает много времени и не всегда, как на примере данной системы, эффективно. Кроме того, метод усиления серебром имеет ряд

недостатков, связанных с нестабильностью используемых реагентов и их чувствительности к свету, необходимости проведения дополнительных процедур анализа и, соответственно, увеличении времени его проведения.

Таким образом, апробация ЛПИИА на основе метода усиления серебром в условиях реальных образцов сыворотки крови показала недостаточную воспроизводимость результатов. Однако, можно предположить, что данный подход является эффективным способом для снижения предела обнаружения аналита методом ЛПИИА в образцах, не содержащих хлорид-ионы.

* * *

В этом разделе были рассмотрены подходы для снижения предела обнаружения ПКт методом ЛПИИА, основанные на модификации метки НЧЗ: ЛПИИА на основе двойной метки НЧЗ – ПХ; ЛПИИА с использованием комплексного конъюгата НЧЗ с Ат; ЛПИИА с использованием в качестве метки несферических НЧЗ; ЛПИИА на основе сферических НЧЗ (20 нм), усиленный серебром (рис. 37). Несмотря на снижение предела обнаружения ПКт ЛПИИА в 5-10 раз (таблица 6), обеспечиваемое путем введения дополнительной ферментной метки или реализации метода усиления серебром, такие подходы имеют ряд недостатков: необходимость в дополнительных реагентах; нестабильность используемых реагентов; дополнительные стадии процедуры анализа, что приводит к увеличению времени тестирования. Кроме того, ЛПИИА с дополнительным усилением сигнала сложно проводить вне лабораторных условий. Апробация ЛПИИА на основе НЧЗ, усиленного серебром, на реальных образцах сыворотки показала высокую вероятность появления ложноположительных результатов, что тем самым говорит о неэффективности данного подхода для разработки высокочувствительного и быстрого теста для определения ПКт. Напротив, ЛПИИА тесты с использованием комплексного агломерата НЧЗ, формируемого за счет связывания биотина со стрептавидином, а также ЛПИИА тест-системы с использованием в качестве метки структурированных золотых наночастиц в форме попкорна содержат все компоненты в высушенном виде и не требуют дополнительных реагентов и процедур анализа. Таким образом, эти разработанные подходы на основе модификации НЧЗ могут использоваться с целью снижения предела обнаружения различных соединений, в том числе, диагностически важных маркеров заболеваний методом ЛПИИА.

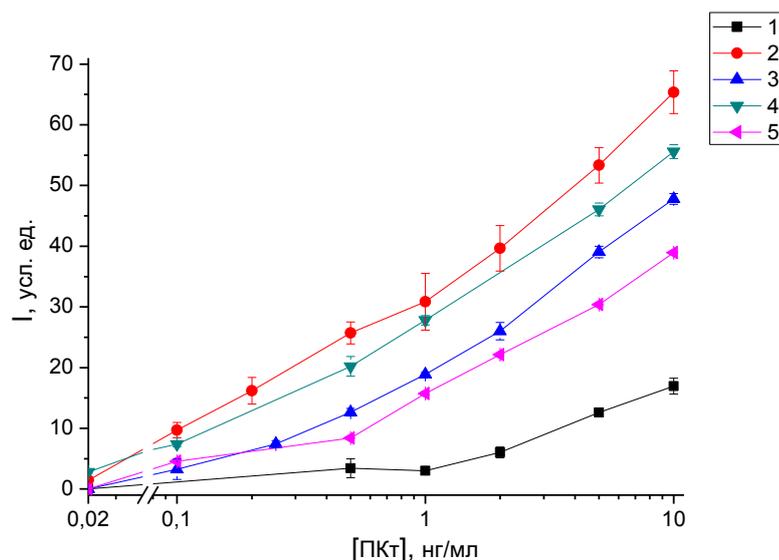


Рис. 37. Градуировочные графики для определения ПКТ, полученные: 1 – ЛПИИ с использованием сферических НЧЗ (35 нм); 2 - ЛПИИ на основе метки состава НЧЗ – ПХ; 3 - ЛПИИ с использованием комплексного конъюгата на основе системы биотин-стрептавидин; 4 - ЛПИИ с использованием в качестве метки золотых нанопокорнов; 5 – ЛПИИ на основе сферических НЧЗ (20 нм), усиленный серебром.

Таблица 6. Обобщение результатов ЛПИИ с использованием подходов для снижения предела обнаружения ПКТ, направленных на модификацию НЧЗ.

№	Метка	Предел обнаружения ПКТ, нг/мл
1	Сферические НЧЗ (35 нм)	0,5
2	НЧЗ-ПХ	0,1
3	Агломерат НЧЗ	0,1
4	НЧЗ в форме попкорна	0,1
5	НЧЗ, покрытые серебром	0,05

3.3.2. ЛПИИ с использованием квантовых точек для определения ПКТ

КТ представляют собой полупроводниковые флуоресцентные нанокристаллы и являются перспективной меткой в ЛПИИ благодаря своим уникальным свойствам, таким как высокая фотостабильность по сравнению с органическими флуорофорами, широкий спектр поглощения, возбуждение в широком диапазоне длин волн и узкий симметричный

пик эмиссии. ЛПИА с использованием КТ в качестве метки позволяет на порядки повысить чувствительность [89,174,175].

В работе использовали коммерческий препарат водорастворимых КТ состава CdSe/ZnS с пиком флуоресценции 655 нм, покрытых полимерной оболочкой с карбоксильными группами. Спектр флуоресценции используемого в работе препарата КТ характеризуется пиком эмиссии в области 655 нм и полушириной пика – 29 нм (рис. 38).

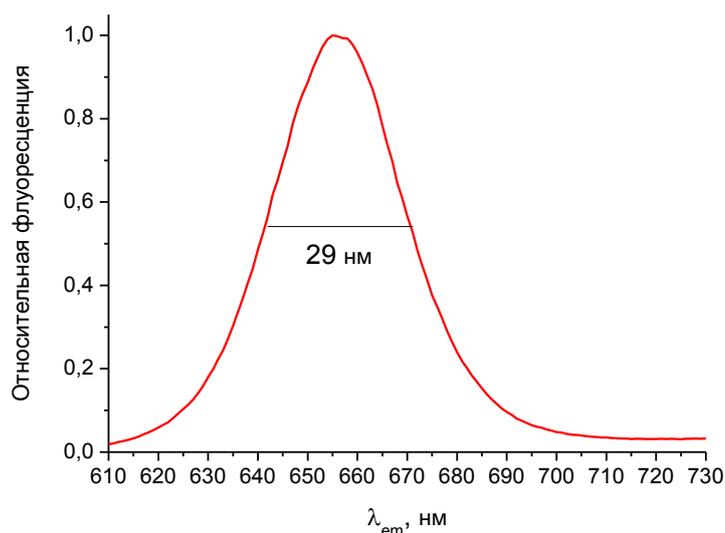


Рис. 38. Спектр флуоресценции КТ.

Методы получения конъюгатов антител с наночастицами включают физическую адсорбцию белка на поверхности метки, ковалентное связывание между активными группами белка и наночастиц, ковалентное связывание антител с дополнительной оболочкой метки [164,176]. Процесс конъюгации Кт с биомолекулами может быть осуществлен путем электростатического связывания, нековалентным связыванием через систему биотин-авидин, прямым ковалентным связыванием или с помощью высокоаффинного мечения индивидуальных, гистидин-меченых белков с использованием КТ, модифицированных никельнитрилоуксусной кислотой. Однако, чаще всего используют методы ковалентной конъюгации, основанные на реакции связывания между аминной и карбоксильной группами (катализируемая карбодиимидом). Преимуществом ковалентной конъюгации является то, что многие белки содержат аминные и карбоксильные группы, и, таким образом, нет необходимости в проведении химической модификации перед приготовлением конъюгатов с КТ.

Для работы были доступны коммерческие КТ, покрытые полимерным покрытием с карбоксильными группами. По данным производителя, на поверхности одной КТ располагается порядка 100 карбоксильных групп. Поэтому для получения конъюгата КТ с пАт к ПКт использовали ковалентное связывание между аминной и карбоксильной группами (рис. 39), методика проведения которого описана в статье [177].

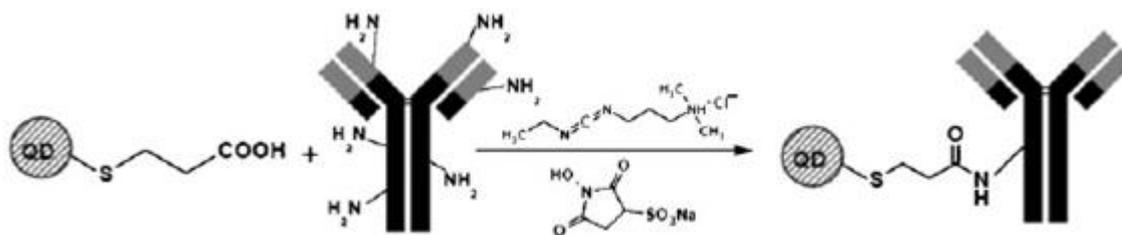


Рис. 39. Схема процесса конъюгации Ат с КТ [177].

Карбоксильная группа на поверхности КТ реагирует с аминогруппой антител с образованием пептидной связи. В процессе синтеза конъюгата, карбодиимид и сульфогидроксисукцинимид вводили в сухом виде в раствор, так как в этом случае можно легко повысить соотношение химических агентов к КТ и снизить риск их гидролитического расщепления. Белок добавляли в раствор немедленно после смешивания КТ со сшивающими агентами без проведения дополнительной стадии инкубации.

Для разработки ЛПИА на основе КТ для определения ПКт в стандартных растворах, на аналитическую мембрану наносили мАт <СВ5> в концентрации 0,5 мг/мл. На мембрану для конъюгата наносили конъюгат пАт, меченных КТ. Однако, после пропускания образца, содержащего ПКт, конъюгат КТ с пАт практически не продвигался по мембране. В связи с этим было предложено проводить анализ путем внесения аналитической части тест-полоски в смесь исследуемого раствора с конъюгатом Ат, меченных КТ. Результаты ЛПИА оценивали количественно путем облучения аналитической зоны тест-полоски ультрафиолетовым светом с длиной волны 340 нм и последующей программной обработкой полученных результатов (рис. 40).

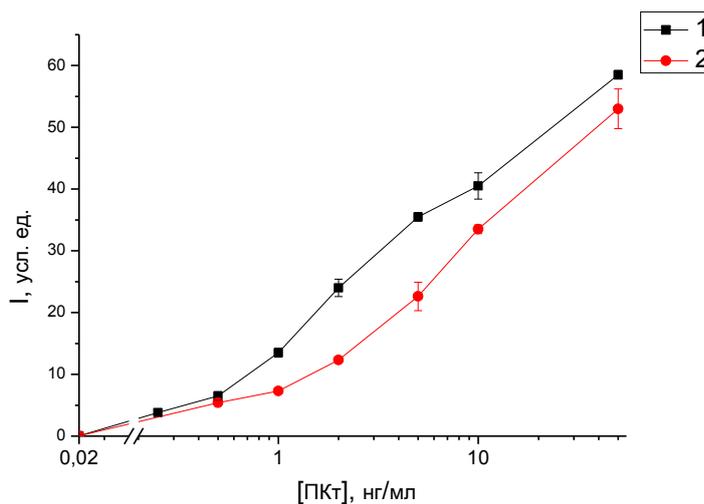


Рис. 40. Градуировочные графики ЛПИА на основе КТ (1) и сферических НЧЗ размером 35 нм (2).

Применение КТ в качестве метки для ЛПИА позволило снизить предел обнаружения ПКТ до 0,25 нг/мл. Несмотря на незначительное улучшение характеристик метода, КТ обладают рядом недостатков, связанных с высокой стоимостью метки, трудоемкой процедурой приготовления конъюгатов с биомолекулами, а также необходимостью использования портативных флуориметров для оценки результатов анализа, что ограничивает применимость тест-систем с флуоресцентным методом регистрации результатов.

3.3.3. Оптимизация анализа и системы регистрации сигнала для определения ПКТ

3.3.3.1. ЛПИА на основе гигантского комбинационного рассеяния

Одним из перспективных подходов для повышения чувствительности ЛПИА для ПКТ и перевода качественной оценки результатов по принципу «да-нет» в количественную является использование ГКР в качестве метода детекции сигнала. Популярность этого метода растет благодаря возможности определения биомолекул с высокой селективностью и чувствительностью [178,179]. Высокая чувствительность метода ГКР легла в основу его применения в иммуноанализе.

Принцип ЛПИА в комбинации с ГКР аналогичен традиционному ЛПИА (рис. 41). Различные исследовательские группы изучали зависимость между усилением и формой/размером иммобилизованных на подложке НЧЗ с использованием различных анализов [180,181]. Полученные результаты показывают, что усиление сигнала ГКР

зависит от многих факторов, включая размер НЧЗ, однако, с противоречивыми выводами. Так, для 4-аминотиофенола, адсорбированного на поверхности НЧЗ, интенсивность ГКР с использованием НЧЗ размером 30 нм была ниже, чем в случае применения НЧЗ размером 18 нм [180]. Когда молекулы 4-аминотиофенола были зажаты между НЧЗ и гладкой золотой подложкой, интенсивность ГКР увеличивалась по мере увеличения размера наночастиц. Наибольшая интенсивность ГКР наблюдалась при использовании гладкой золотой поверхности и НЧЗ размером 60 нм [182]. При использовании в качестве молекулы-репортера 4-меркаптобензойной кислоты интенсивность ГКР повышалась с увеличением размера НЧЗ. В работе [183] изучали влияние размера НЧЗ на интенсивность ГКР на примере спектров 4-аминотиофенола и 4-нитротиофенола. При постоянном количестве золотых НЧЗ наблюдалась положительная линейная зависимость между размером частиц и сигналом ГКР. Это объясняется увеличением площади поверхности с увеличением размера НЧЗ, что приводит к более высокой интенсивности ГКР при одинаковом общем числе наночастиц. Наибольшая интенсивность ГКР наблюдалась при использовании НЧЗ размером 50 нм с одинаковой общей площадью поверхности или концентрацией золота, что объясняется зависимостью между усилением и размером или площадью поверхности наночастиц.

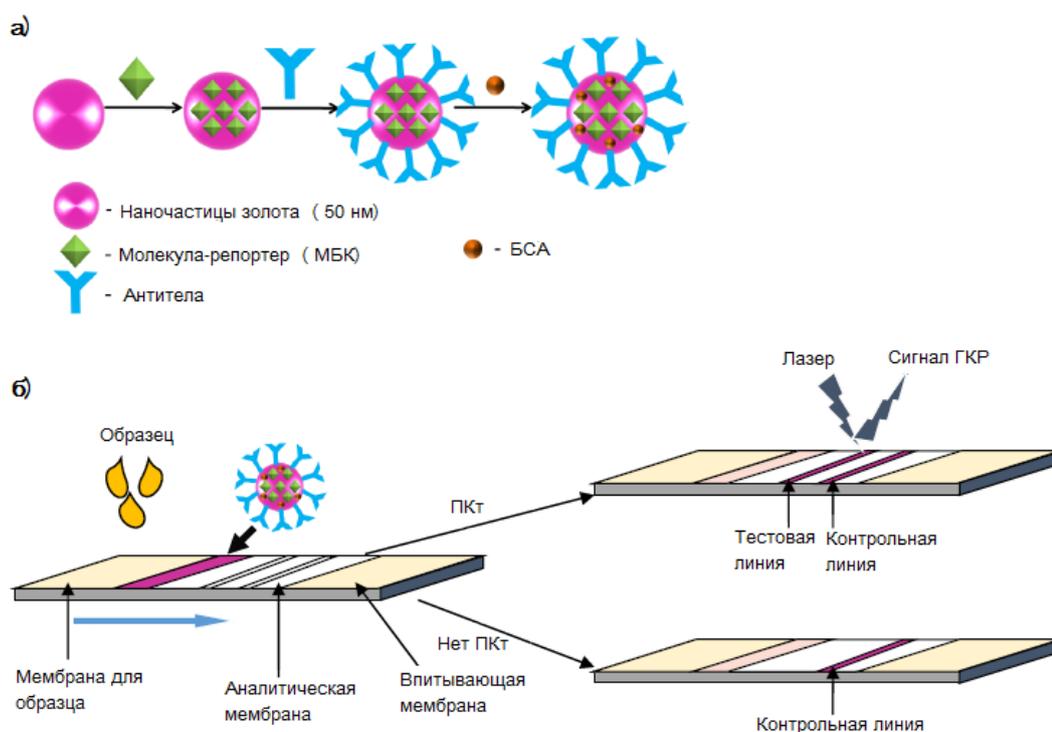


Рис. 41. Приготовление иммунопробы Ат-НЧЗ-МБК (а); схема ЛПИИ на основе ГКР (б).

В этой связи для разработки ЛПИИ на основе ГКР использовали НЧЗ размером 50 нм (п. 3.1.1.), которые обеспечивают формирование визуально детектируемого сигнала при проведении стандартной процедуры ЛПИИ и достаточную интенсивность при регистрации сигнала ГКР. Для повышения чувствительности ЛПИИ на основе ГКР к раствору коллоидного золота добавляли большое количество молекул МБК, которые соединялись с наночастицами посредством тиольных групп на поверхности кислоты. МБК является одной из наиболее популярных рамановских репортер-молекул с характерными пиками в области 1074 см^{-1} и 1583 см^{-1} . Для формирования тестовой линии на аналитическую мембрану наносили раствор мАт<СВ5> с концентрацией 1 мг/мл (п. 3.1.3.3.). Конъюгат НЧЗ, меченных МБК, с пАт наносили на мембрану для конъюгата. После пропускания образца, содержащего ПКт, в области тестовой и контрольной линий формировались окрашенные полоски фиолетового цвета. После высыхания тест-полосок, результаты анализа сначала измеряли фотометрически. Затем измеряли сигнал в тестовой зоне полоски от репортер-молекулы на рамановском микроскопе. Количественный анализ проводили по измерению интенсивности характерного пика на длине волны 1074 см^{-1} , которая соответствовала определенному содержанию ПКт в стандартном растворе.

На рисунке 42 изображены полученные спектры ГКР для разных концентраций ПКт с характерными для МБК пиками при 1074 см^{-1} и 1583 см^{-1} . Видно, что с увеличением концентрации ПКт интенсивность сигнала на характеристической длине волны 1074 см^{-1} возрастает. По полученным результатам строили градуировочный график зависимости интенсивности пика при 1074 см^{-1} от концентрации ПКт в образце (рис. 43). Предел обнаружения ПКт с помощью данного метода регистрации сигнала составил 0,5 нг/мл. Были проанализированы и сопоставлены два метода детекции (фотометрический и ГКР) результатов ЛПИИ для определения ПКт с одинаковым размером и типом используемой метки. ЛПИИ на основе ГКР демонстрирует сравнимые результаты с ЛПИИ на основе сферических НЧЗ размером 50 нм (рис. 43). Кроме того, для реализации ЛПИИ в комбинации с ГКР вне лабораторных условий необходимо иметь портативные анализаторы, что в свою очередь, увеличивает конечную стоимость тест-системы. Таким образом, на примере ЛПИИ для определения ПКт можно сделать вывод, что усложнение процедуры иммунохроматографического анализа путем регистрации результатов методом ГКР нецелесообразно.

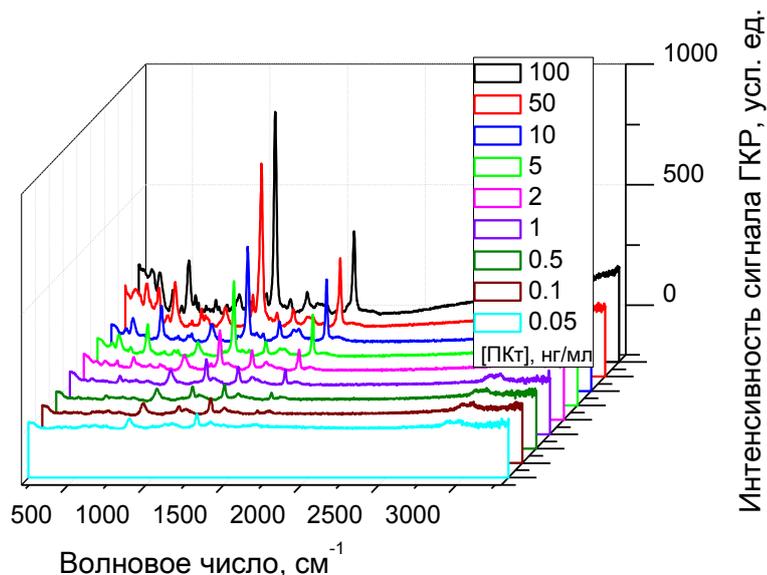


Рис. 42. ГКР спектры тестовых линий ЛПИА, соответствующие различным концентрациям ПКТ.

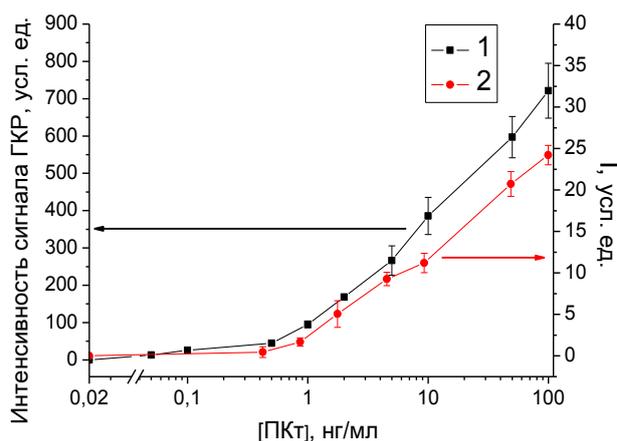


Рис. 43. Градуировочные графики ЛПИА ПКТ на основе поверхностно-усиленного рамановского рассеяния (1) и фотометрического метода детекции сигнала (2).

* * *

Обобщенные результаты по использованию различных подходов для возможного снижения предела обнаружения на примере тест-системы для визуального и количественного определения ПКТ приведены в таблице 7. Показано, что предложенные методы позволяют снизить предел обнаружения ПКТ в 2-10 раз. Таким образом, в случае, когда чувствительность стандартной схемы ЛПИА не позволяет определять концентрации исследуемого соединения в необходимом диапазоне, может быть выбран один из описанных выше подходов в соответствии с требованиями и задачами, предъявляемыми к

разрабатываемому анализу. Однако, в данной работе в целях разработки визуального, быстрого и бесприборного ЛПИА, позволяющего определять диапазоны клинически значимых концентраций Пкт в сыворотке крови, был выбран наиболее удобный подход, основанный на применении метки - НЧЗ в форме попкорна.

Таблица 7. Обобщение результатов ЛПИА Пкт с использованием подходов для снижения предела обнаружения, основанных на модификации НЧЗ.

Подход	Метка	Метод регистрации	Предел обнаружения Пкт, нг/мл	Недостатки
Стандартный ЛПИА	НЧЗ сферической формы	фотометрический	0,5	-
Модификация метки	НЧЗ-ПХ	фотометрический	0,1	Нестабильность реагентов, дополнительная стадия анализа
Модификация метки	Агломерат НЧЗ (35 нм)	фотометрический	0,1	-
Модификация метки	НЧЗ в форме попкорна или цветов	фотометрический	0,1	-
Модификация метки	НЧЗ, покрытые серебром	фотометрический	0,05	Нестабильность реагентов, дополнительная стадия анализа, мешающее влияние компонентов образца
Другой тип метки	КТ	флуориметрический	0,25	Дорогостоящая метка, необходимость приборной регистрации результатов
Система регистрации сигнала	НЧЗ сферической формы (50 нм)	ГКР	0,5	Необходимость приборной регистрации результатов, время анализа

3.4. Градиентный ЛПИИ для полуколичественного определения диагностически важных соединений

Ранее в данной работе были рассмотрены тест-системы, позволяющие визуально или количественно, с помощью специальных приборов, оценить концентрацию ПКТ в образцах. Однако, применение таких тестовых устройств в клинической практике для дифференциальной диагностики между различными состояниями и тяжелой бактериальной инфекцией (сепсисом), а также проведения мониторинга за динамикой уровня биомаркера ограничено необходимостью наличия специальных приборов (ЛПИИ на основе КТ, ГКР метод регистрации результатов ЛПИИ), временем проведения анализа (ЛПИИ с дополнительными стадиями усиления сигнала) или сложностью точной оценки интенсивности окрашивания (в случае визуальной детекции результатов ЛПИИ). В этой связи, в настоящей работе предложен полуколичественный метод визуального анализа, «градиентный ЛПИИ», принципиальное отличие которого от стандартного ЛПИИ состоит в способе оценки результатов. Полуколичественное безинструментальное определение исследуемого аналита методом стандартного ЛПИИ обычно проводится путем сравнения интенсивности окрашивания тестовой линии с контрольной карточкой сравнения; полуколичественный анализ методом градиентного ЛПИИ проводится путем соотнесения количества проявившихся тестовых линий на полоске с диапазонами концентраций исследуемого аналита [184]. Градиентный формат ЛПИИ аналогичен описанному в литературном обзоре «баркод»-формату ЛПИИ и заключается в формировании нескольких тестовых линий на аналитической зоне тест-полоски. Однако, в предлагаемом градиентном варианте ЛПИИ на аналитическую мембрану наносят Ат с возрастающей концентрацией от линии к линии (рис. 44) таким образом, чтобы каждая из линий соответствовала своему пределу обнаружения вещества, Число формируемых линий (N) заранее определяется количеством необходимых диапазонов анализируемых концентраций (N+1).

Полуколичественная оценка результатов в данном случае проводится путем соотнесения количества проявившихся окрашенных тестовых линий в аналитической зоне тест-полоски с диапазоном концентраций исследуемого аналита.

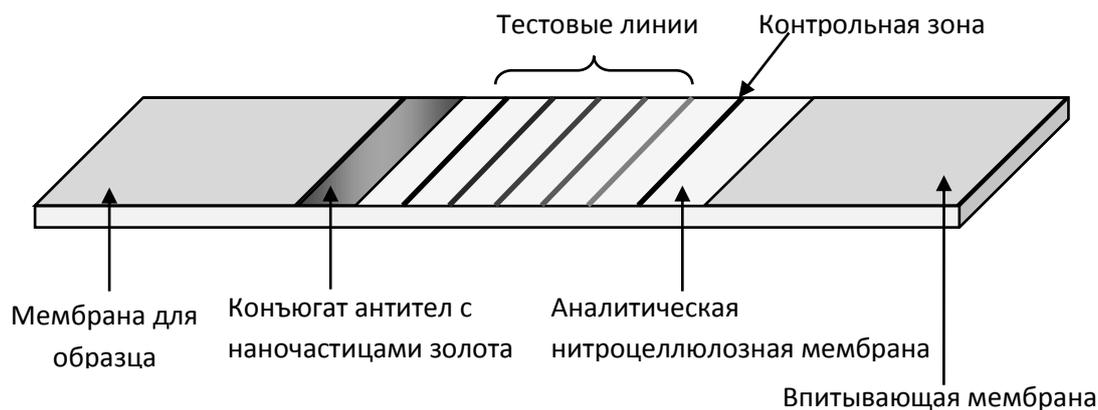


Рис. 44. Схема тест-полоски для проведения градиентного ЛПИА.

Принцип градиентного ЛПИА был разработан и реализован ранее на примере тонкослойной проточной кюветы, в которой находилась бумажная мембрана с градиентным распределением антител, созданных на носителе с применением метода фотоиммобилизации [185]. Проведение ИФА сэндвич-формата с градиентным распределением антител на мембране приводило к формированию градиентного распределения комплекса Ат1-Аг-конъюгат Ат2-ПХ. После использования субстрата, на мембране наблюдалось градиентное распределение степени окрашивания участков матрицы по ее длине.

3.4.1. Математическая модель градиентного формата ЛПИА

Пропускание по тест-полоске образца, содержащего анализируемый Аг, приводит к градиентному распределению комплекса Ат-Аг-меченое Ат и, соответственно, к градиентному распределению степени окрашивания участков тест-системы по длине, являющемуся, в данном случае, результатом проявления метки НЧЗ. Известно, что зависимость интенсивности окрашивания поверхности тест-полоски от концентрации метки имеет сигмоидный вид. Нижнее плато соответствует участку зависимости, когда увеличение содержания метки не регистрируется визуально/прибором и окраска мембраны соответствует окраске фона. Начиная с некоего значения концентрации метки, прибор начнет детектировать рост сигнала; такой критической концентрации метки соответствует критическая концентрация метки в составе тройного комплекса Ат-Аг-меченое Ат, концентрация которого, в свою очередь, связана с концентрацией Аг в образце. В этом случае, градиентное распределение окрашивания по тест-полоске

является функцией определяемой концентрации Аг. Рассмотрим модель градиентного ЛПИА сэндвич-формата, в котором Ат иммобилизованы на аналитической мембране, причем их концентрация различна и является функцией расстояния от данной тестовой линии до конца мембраны, что то же самое, номера тестовой линии. Причем распределение концентрации белка на аналитической мембране задается заранее.

Рассмотрим случай, когда реакция связывания Аг с иммобилизованными Ат проходит за время, достаточное для наступления равновесия. Примем, что иммунокомплексы, образовавшиеся в результате взаимодействия Аг и иммобилизованных антител, количественно оттитровываются на стадии сорбции конъюгата антител с меткой. Таким образом, при заданных параметрах взаимодействия Аг и иммобилизованных антител, распределение метки на мембране будет определяться концентрацией Аг в растворе и функцией распределения иммуноглобулинов на фазе.

Рассмотрим взаимодействие на каждом участке мембраны изолированно. После установления равновесия концентрации компонентов в системе будут связаны следующим образом:

$$(I) K = \frac{B}{(Am_0 - B) \times (Az_0 - B)},$$

где B - концентрация иммунокомплекса на носителе; Am_0 и Az_0 - начальные концентрации Ат и Аг, соответственно.

Из равенства (I) следует:

$$Az = B \times \left(1 + \frac{K^{-1}}{Am_0 - B} \right)$$

Зафиксируем концентрацию B как $B_{критическую}(B_{кр})$, т.е. как ту величину концентрации комплекса, которая в результате процедуры мечения может быть достоверно отличима от фонового значения. Очевидно, что эта величина зависит от типа метки и метода ее регистрации. Тогда,

$$Az_0 = B_{кр} \times \left(1 + \frac{K^{-1}}{Am_0 - B_{кр}} \right)$$

т.е., при $K = const$ и $B_{кр} = const$, начальная концентрация Аг, при которой концентрация комплекса достигает величины $B_{кр}$ есть функция начальной концентрации антител. Выше было введено предположение, что концентрация антител зависит от

расстояния от данной тестовой линии до конца аналитической мембраны, т.е. $Am_0 = \varphi(x)$.

Тогда:

(II)

$$Az_0 |_{B=B_{кр}} = B_{кр} * \left(1 + \frac{K^{-1}}{\varphi(x) - B_{кр}}\right)$$

и при постоянных K и $B_{кр}$ концентрация Az_0 , для которой $B = B_{кр}$, есть функция выбранной координаты x . Это означает, что каждой концентрации Az_0 будет соответствовать координата x на мембране, где концентрация комплекса B достигнет критической величины $B_{кр}$.

Рассмотрим некоторые частные случаи:

1) Пусть концентрация антител на мембране линейно возрастает по ее длине, т.е. ,

$$Am_0 = \varphi(x) = \alpha x + \beta, \text{ где } \alpha \text{ и } \beta - \text{ постоянные величины.}$$

Получим:

$$Az_0 |_{B=B_{кр}} = B_{кр} * \left(1 + \frac{K^{-1}}{\alpha x + \beta - B_{кр}}\right)$$

- гиперболическая зависимость, изображенная на рис. 45а.

2) Пусть распределение антител на мембране подчиняется гиперболическому

закону $\varphi(x) = \beta + \frac{\alpha}{x}$. Тогда:

$$Az_0 |_{B=B_{кр}} = B_{кр} * \left(1 + \frac{K^{-1}}{\frac{\alpha}{x} + \beta - B_{кр}}\right)$$

Графики данной функции изображены на рис. 45б.

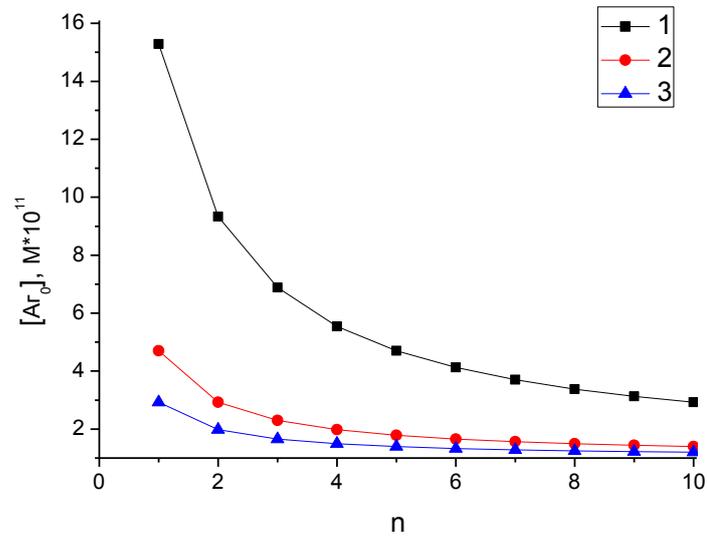
Видно, что изменяя параметры α и β , мы влияем на ход кривой $Az_0 |_{B=B_{кр}}(x)$. Так, при увеличении постоянной β система становится чувствительной к диапазону больших концентраций Ag.

3) Определим, какой должна быть зависимость $Am_0(x)$ для того, чтобы

концентрация $Az_0 |_{B=B_{кр}}(x)$ была прямо пропорциональна координате x , т.е.

$$Az_0 |_{B=B_{кр}} = \alpha x + \beta = B_{кр} * \left(1 + \frac{K^{-1}}{\varphi(x) - B_{кр}}\right)$$

a)



б)

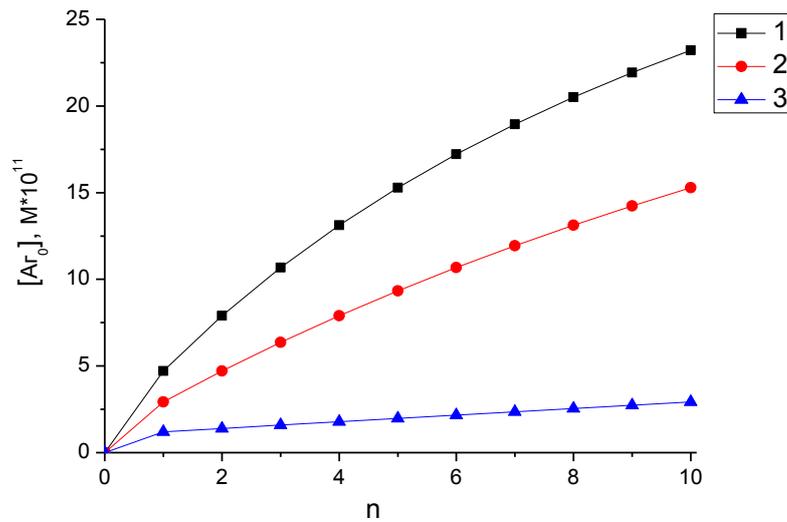


Рис. 45. Теоретическая зависимость концентрации Ag , при которой достигается концентрация иммунного комплекса $B_{кр}$, от номера зоны. Зависимость $Am(x)$:

а) $Am_0 = \alpha x + \beta$, 1) $\alpha = 1 \cdot 10^{-10}$ М, 2) $\alpha = 5 \cdot 10^{-10}$ М, 3) $\alpha = 1 \cdot 10^{-9}$ М; б) $Am_0 = \beta + \frac{\alpha}{x}$, 1) $\alpha = 5 \cdot 10^{-10}$ М, 2) $\alpha = 1 \cdot 10^{-9}$ М, 3) $\alpha = 1 \cdot 10^{-8}$ М. $B_{кр} = 1 \cdot 10^{-11}$ М; $K = 5 \cdot 10^8$ М⁻¹; $\beta = 5 \cdot 10^{-11}$ М.

Тогда:

$$\varphi(x) = \frac{B_{кр} * K^{-1}}{\alpha x + \beta - B_{кр}} + B_{кр}$$

Изменяя параметр α , мы влияем на тангенс угла наклона зависимости $A_{20} |_{B=B_{кр}}(x)$ и таким образом воздействуем на диапазон определяемых концентраций Аг в системе.

Как следует из приведенных выше теоретических расчетов, метод градиентного распределения иммобилизованных на мембране антител может быть применен для бесприборной количественной оценки результатов ЛПИА. Для экспериментальной проверки предложенного градиентного формата ЛПИА в качестве модельного белкового Аг был выбран маркер беременности, ХГЧ.

3.4.2. Разработка градиентного ЛПИА на примере модельной системы для определения маркера беременности – ХГЧ

ХГЧ представляет собой гетеродимерный гликопротеиновый гормон, который секретируется клетками трофобласта. В настоящее время практически все коммерческие тесты для определения ХГЧ основаны на сэндвич-принципе, в котором используются либо мАт, либо комбинация моноклональных антител с поликлональной антисывороткой. мАт против ХГЧ фиксируют на твердой фазе для захвата димерного Аг, тогда как вторые мАт/поликлональная антисыворотка, связанные в конъюгат с сигнальным агентом (краситель, радиоактивный материал или фермент для спектрометрического / люминесцентного определения), взаимодействуют с дистальным участком Аг для количественного определения ХГЧ [186].

Для отработки принципов градиентного ЛПИА было предложено использовать тест-систему для определения маркера беременности, ХГЧ. Выбор модельной системы обусловлен широким диапазоном возможных концентраций ХГЧ в моче, а также практическим значением маркера, так как содержание ХГЧ в моче коррелирует со сроком беременности.

3.4.2.1. Подбор оптимальных условий и компонентов для проведения градиентного ЛПИА ХГЧ

В настоящей работе были доступны 4 пары моноклональных антител к ХГЧ. Основываясь на результатах, полученных для ЛПИА ПКт, в качестве метки для проведения ЛПИА ХГЧ были выбраны сферические НЧЗ размером 35 нм. С целью выбора оптимальных условий для получения стабильных конъюгатов антител с НЧЗ проводили титрование, результаты которого представлены на рисунке 46. По данным производителя,

комбинацию мАт<HCG8> - мАт<HCG4> следует использовать, когда мАт<HCG8> иммобилизованы на аналитической мембране, а конъюгат приготовлен с мАт<HCG4>. В этой связи, кривые титрования для мАт<HCG8> на рисунке 46 не представлены.

Для приготовления конъюгатов антител с НЧЗ в качестве оптимального значения рН для всех видов антител было выбрано рН коллоидного золота 7,0-7,5. Необходимое количество антител для получения стабильных препаратов конъюгатов в рассмотренном диапазоне концентраций белка 0-40 мкг/мл составило: 10 мкг/мл для мАт<k001> и мАт<HCG4>; 15 мкг/мл для мАт<k002>.

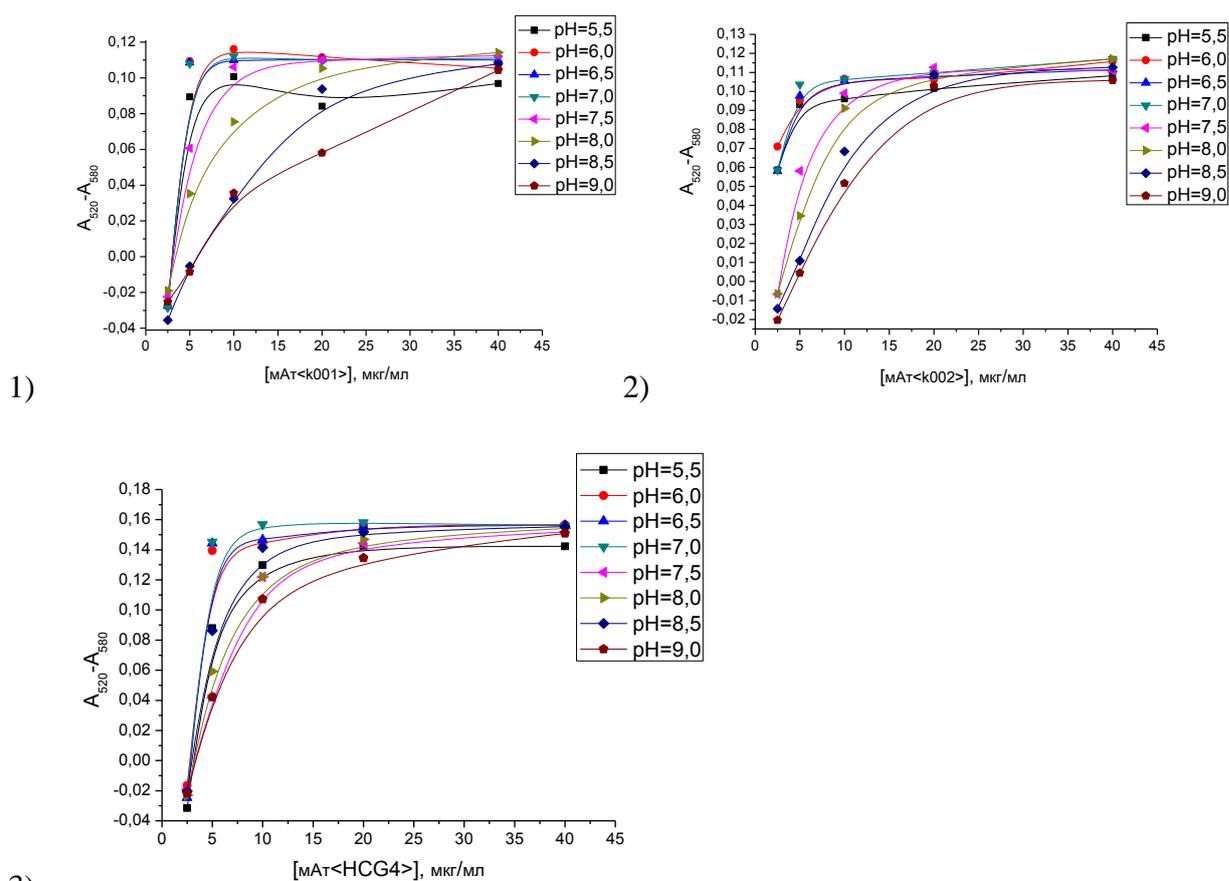


Рис. 46. Зависимости разности оптических поглощений от концентрации мАт<k001> (1), мАт<k002> (2) и мАт<HCG4> (3) для разных значений рН.

На основании подобранных оптимальных условий для получения стабильных конъюгатов были приготовлены препараты мАт <k001>, <k002> и <HCG4>, меченные сферическими НЧЗ размером 35 нм. На следующем этапе работы необходимо было выбрать пару антител, обеспечивающую максимальную чувствительность анализа ХГЧ. С этой целью были изучены различные комбинации антител, когда на мембране иммобилизовали один клон антител, а конъюгат готовили с другими Ат (рис. 47).

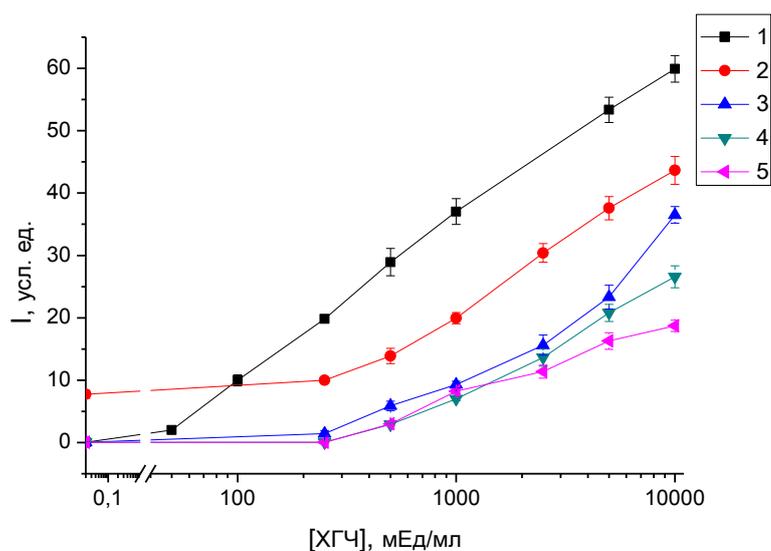


Рис. 47. Градуировочные графики, полученные для определения ХГЧ:

- (1) мАт<k001> - конъюгат мАт<k002>; (2) мАт<k002> - конъюгат мАт<k001>; (3) мАт<k002> - конъюгат мАт<НСГ4>; (4) мАт<НСГ8> - конъюгат мАт<k001>; (5) мАт<НСГ8> - конъюгат мАт<НСГ4>

По полученным результатам ЛПИИА для определения ХГЧ в стандартных растворах видно, что наилучшими характеристиками обладает пара мАт<k001>, иммобилизованных на мембране, и мАт<k002>, меченных НЧЗ. Изменение положения этой пары антител друг относительно друга в ЛПИИА приводило к заметному снижению аналитического сигнала и появлению фонового сигнала (таблица 8). При использовании других клонов антител и комбинаций на их основе наблюдалось заметное снижение аналитического сигнала и сдвиг предела обнаружения в сторону более высоких концентраций ХГЧ.

Таблица 8. Выбор пары Ат для ЛПИИА ХГЧ.

№	Иммобилизованные Ат	Ат, меченные НЧЗ	Предел обнаружения ХГЧ, мЕд/мл
1	мАт<k001>	мАт<k002>	50
2	мАт<k002>	мАт<k001>	250 (фоновый сигнал)
3	мАт<k002>	мАт<НСГ4>	250
4	мАт<НСГ8>	мАт<k001>	500
5	мАт<НСГ8>	мАт<НСГ4>	500

Таким образом, дальнейшая разработка градиентного ЛПИИА для определения ХГЧ проводилась с использованием мАт<k001>, иммобилизованных на мембране, и конъюгата мАт<k002> со сферическими НЧЗ размером 35 нм. Для разработки градиентного ЛПИИА, позволяющего проводить полуколичественную оценку ХГЧ путем подсчета числа проявившихся тестовых полос, необходимо было подобрать оптимальные концентрации антител, иммобилизуемых на аналитической мембране. С этой целью на аналитическую мембрану иммобилизовали Ат в диапазоне концентраций 0,1-1 мг/мл и проводили ЛПИИА в стандартных растворах, содержащих определенные концентрации ХГЧ. Задача состояла в том, чтобы выбрать такие концентрации иммобилизуемых антител, с использованием которых бы достигались разные значения предела обнаружения аналита методом ЛПИИА, разделяющие весь диапазон определяемых концентраций ХГЧ на отдельные концентрационные диапазоны. Таким образом, для формирования градиентного ЛПИИА были выбраны следующие концентрации мАт<k001>: 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 1 мг/мл.

3.4.2.2. Градиентный ЛПИИА для полуколичественного определения ХГЧ

Для формирования градиентного ЛПИИА ХГЧ на аналитическую мембрану сорбционно иммобилизовали мАт<k001> в виде поперечных линий с увеличивающейся концентрацией антител от места фиксации мембраны, пропитанной конъюгатом меченных НЧЗ мАт<k002>. При нанесении образца, содержащего ХГЧ, Аг связывался с Ат, мечеными НЧЗ. Ввиду избытка антител на поверхности НЧЗ, Аг должен находиться преимущественно в форме иммунокомплекса. Дальнейшее формирование иммунокомплексов на полоске характеризуется константой равновесия между свободными Ат и Аг, поэтому при достижении участков с иммобилизованными мАт<k001> с образованием тройного окрашенного сэндвич-комплекса формирование окрашенной линии происходит только при достижении и превышении определенной концентрации антител на мембране.

На рисунке 48 представлены результаты градиентного ЛПИИА для определения стандартных образцов, содержащих определенное количество ХГЧ. На аналитической мембране нанесены мАт<k001> в концентрациях 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 1 мг/мл, возрастающей от места фиксации мембраны для конъюгата.



0 250 500 1250 2500 5000 мЕд/мл, ХГЧ

Рис. 48. Градиентный ЛПИИА в стандартных растворах ХГЧ.

Однако, как видно на сканированном изображении тест-полосок, при нанесении антител таким способом не наблюдалось четкой зависимости между количеством окрашенных тестовых линий и концентрацией ХГЧ: при пропускании раствора, содержащего 250 мЕд/мл ХГЧ, на полоске проявлялись все пять тестовых линий, а при увеличении концентрации Аг - аналитический сигнал усиливался. Поэтому для проведения градиентного ЛПИИА ХГЧ был изменен порядок нанесения Ат на аналитическую мембрану: от 1 до 0,3 мг/мл мАт$k001$ от места фиксации мембраны с конъюгатом. В данном случае, наносимый образец ХГЧ должен преимущественно связаться с Ат высокой концентрации (1 мг/мл), которые иммобилизованы первыми после мембраны с конъюгатом. На рисунке 49 показаны результаты градиентного ЛПИИА, полученные для тест-полосок с последовательно снижающимися концентрациями антител на мембране. Для оценки эффективности тест-системы в условиях реального образца, анализ проводили в модельных растворах мочи, содержащих определенное количество ХГЧ.



0 50 100 250 400 500 600 800 1000 2500 5000 10000 мЕд/мл

Рис. 50. Градиентный ЛПИИА в модельных образцах мочи, содержащих определенные концентрации ХГЧ.

Как и предполагалось, обратный порядок нанесения антител – от больших концентраций к меньшим – позволил получить более четкую зависимость количества окрашенных тестовых линий от диапазона концентраций Аг. Диапазон определяемых концентраций ХГЧ разработанной тест-системы составил от 50 до 10000 мЕд/мл. Полуколичественную оценку результатов проводили визуально путем подсчета количества проявившихся окрашенных линий на тест-полоске (таблица 9).

Таблица 9. Интерпретация результатов градиентного ЛПИИА ХГЧ: соответствие количества окрашенных линий на тест-полоске определенным диапазонам концентраций Аг.

Диапазон концентраций ХГЧ, мЕд/мл	Количество окрашенных линий на тест-полоске
$\geq 50 - \leq 100$	1-2
$> 100 - \leq 400$	3
$> 400 - \leq 600$	4
> 600	5

Таким образом, основные принципы градиентного ЛПИИА, реализованные на примере модельной системы определения ХГЧ, явились основой для разработки полуколичественной, визуальной и быстрой тест-системы, позволяющей путем подсчета числа окрашенных линий определять диапазон концентраций маркера бактериальных инфекций и сепсиса ПКт.

3.4.3. Разработка градиентного ЛПИИА для определения ПКт

Главная задача настоящей работы заключалась в создании тест-системы для быстрого, визуального и полуколичественного определения ПКт в клинически важных диапазонах концентраций, позволяющих проводить дифференциальную диагностику между различными клиническими состояниями и тяжелой бактериальной инфекцией (сепсисом). Основываясь на данных градиентного ЛПИИА ХГЧ, нами был разработан формат градиентного ЛПИИА для определения диапазонов концентраций ПКт без применения инструментального оборудования.

3.4.3.1. Подбор оптимальных условий и компонентов для проведения градиентного ЛПИИА ПКт

Принцип градиентного ЛПИИА состоит в нанесении на аналитическую зону устройства нескольких параллельных тестовых линий с возрастающей концентрацией Ат от линии к линии. За основу разработки градиентного ЛПИИА ПКт взяли ЛПИИА тест-систему с использованием сферических НЧЗ размером 35 нм в качестве метки, описанную в п. 3.2. В работе использовали пару мАт<СВ5>, иммобилизуемых на аналитической мембране, и ПАт к ПКт, меченные НЧЗ. НЧЗ в качестве метки для ЛПИИА играют важную роль в эффективности определения и чувствительности анализа. Как было описано ранее, размер и форма метки влияют на характеристики анализа. Так, НЧЗ в форме попкорна обладают большей площадью поверхности по сравнению со сферическими частицами того же размера из-за своей трехмерной структуры. Было показано, что применение несферических НЧЗ в качестве метки позволяет повысить чувствительность определения ПКт в стандартных растворах в 5 раз по сравнению с ЛПИИА на основе сферических НЧЗ размером 35 нм (п. 3.1.3.2.). Можно предположить, что использование в качестве метки НЧЗ в форме попкорнов позволит повысить чувствительность градиентного ЛПИИА для определения ПКт в области низких концентраций.

Таким образом, на основании рассмотренных выше подходов, направленных на снижение предела обнаружения ПКт, наряду с градиентным ЛПИИА с использованием сферических наночастиц было предложено реализовать градиентный ЛПИИА с использованием НЧЗ в форме попкорна.

Для разработки градиентного ЛПИИА, позволяющего разделить диапазон концентраций ПКт на пять клинически значимых диапазонов для проведения дифференциальной диагностики различных клинических состояний путем подсчета числа окрашенных тестовых линий, необходимо было подобрать оптимальные концентрации моноклональных антител <СВ5>, иммобилизуемых в аналитическую зону мембраны. Задача состояла в том, чтобы выбрать такие концентрации антител, которые бы позволили получать различное количество проявившихся тестовых линий в зависимости от содержания ПКт в образце: 1 линию для ПКт в диапазоне от 0,25 до 0,5 нг/мл; 2 линию для ПКт от 0,5 до 2 нг/мл; 3-4 линию для ПКт от 2 до <10 нг/мл и 4 линию для ПКт более 10 нг/мл. Как и для модельной тест-системы градиентного ЛПИИА ХГЧ, с целью выбора необходимых концентраций мАт<СВ5>, на аналитическую мембрану наносили Ат в диапазоне концентраций от 0,1 до 1 мг/мл и проводили ЛПИИА в буферных растворах, содержащих определенные концентрации ПКт. Оптимальные условия выбирали таким

образом, чтобы можно было выделить и дифференцировать диагностически значимые диапазоны концентраций ПКТ, соответствующие уровням биомаркера в определенных стадиях заболевания. По результатам ЛПИА с иммобилизованными АТ в указанном диапазоне концентраций, для формирования градиентного ЛПИА на аналитическую нитроцеллюлозную мембрану выбрали растворы с концентрацией мАт <СВ5>: 0,1; 0,25; 0,5; 1 мг/мл.

3.4.3.2. Градиентный ЛПИА для полуколичественного определения ПКТ в сыворотке крови

С учетом подобранных оптимальных условий, первоначально формировали тест-системы градиентного ЛПИА на основе НЧЗ сферической формы (35 нм) и градиентного ЛПИА на основе НЧЗ в форме попкорнов (100 нм), и оценивали путем пропускания стандартных растворов, содержащих определенные концентрации ПКТ (рис. 50). Разработанные тест-системы позволяют определять 5 диапазонов концентраций ПКТ в стандартных растворах: менее 0,25 нг/мл; от 0,25 до 0,5 нг/мл; от 0,5 до 2 нг/мл; от 2 до 10 нг/мл; выше 10 нг/мл. Предел обнаружения градиентного ЛПИА составил 0,25 нг/мл для сферических наночастиц в качестве метки и 0,1 нг/мл при использовании метки НЧЗ в форме попкорнов.

На рисунке 51 представлены трехмерные зависимости интенсивности окрашивания тестовых линий от концентрации Аг, полученные для разных концентраций антител, иммобилизованных на аналитической мембране тест-полосок. Из графиков видно, что для каждого значения концентрации мАт<СВ5> существуют свои калибровочные зависимости, с увеличением концентрации антител на поверхности повышается аналитический сигнал, а предел обнаружения смещается в сторону меньших концентраций ПКТ. Таким образом, наблюдается четкая дифференциация всего диапазона определяемых концентраций ПКТ на отдельные, диагностически значимые концентрационные диапазоны. Полученные данные согласуются с описанной выше математической моделью градиентного формата ЛПИА (п. 3.4.1.), где говорилось, что начальная концентрация Аг, при которой концентрация сэндвич-комплекса достигает величины $B_{кр}$, есть функция начальной концентрации антител.

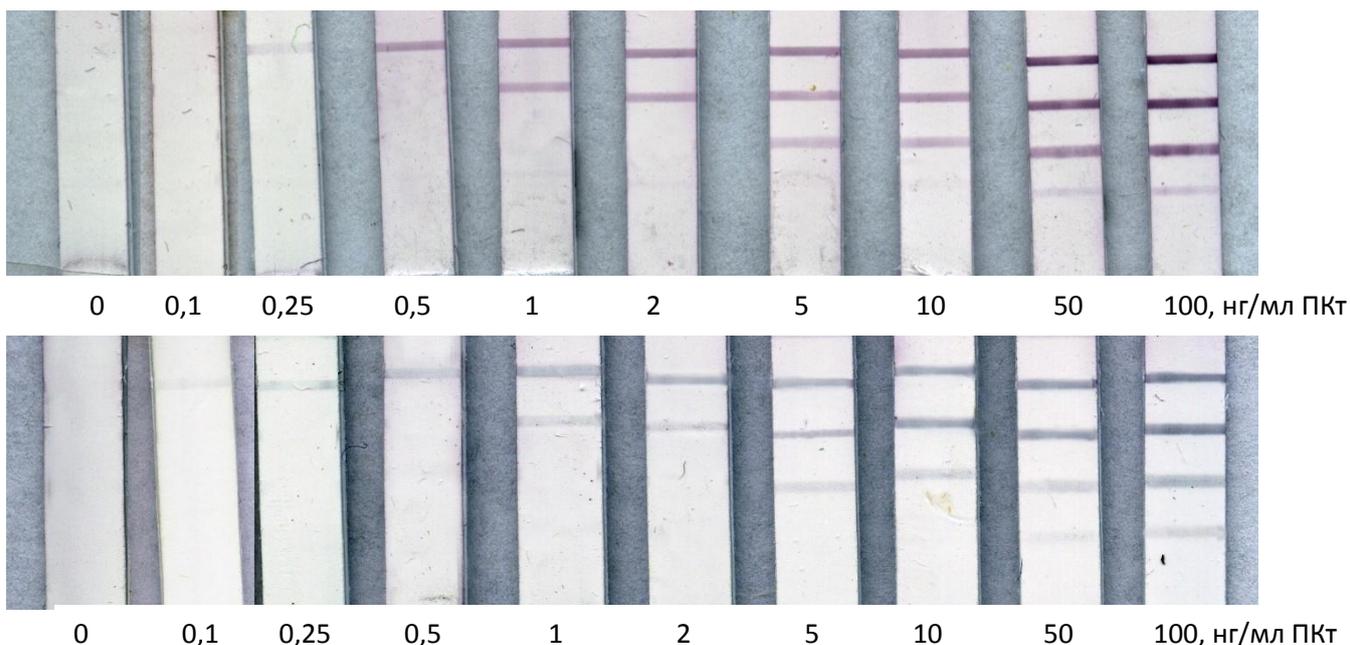


Рис. 50. Градиентный ЛПИА на основе 35 нм золотых наночастиц (а) и градиентный ЛПИА на основе 100 нм НЧЗ в форме попкорнов (б) после пропускания 100 мкл стандартного раствора ПКт.

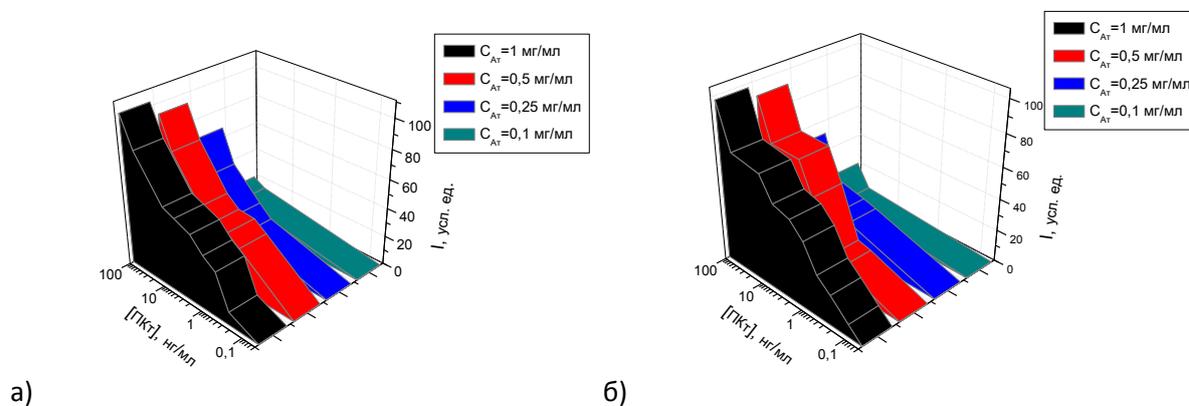


Рис. 51. Трехмерные изображения зависимостей интенсивности аналитического сигнала от концентрации ПКт, полученные для разных значений концентраций иммобилизованных антител: градиентный ЛПИА на основе сферических НЧЗ (а), градиентный ЛПИА на основе НЧЗ в форме попкорнов (б).

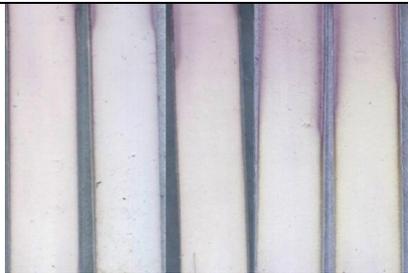
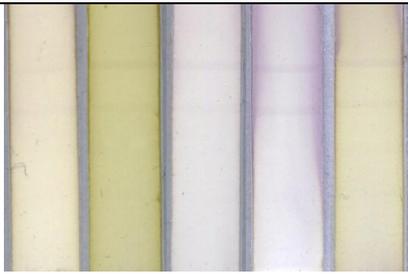
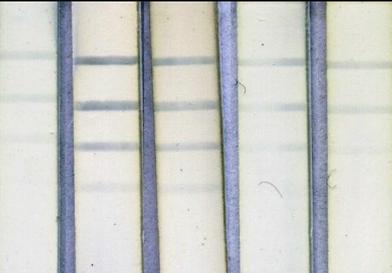
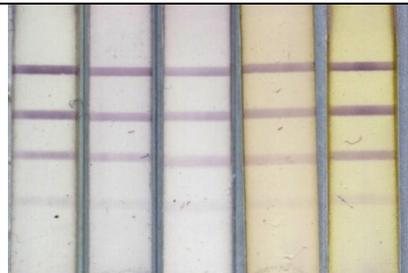
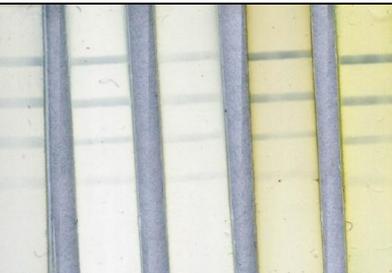
То есть, в данном случае для того, чтобы на полоске проявилась первая окрашенная линия, соответствующая 1 мг/мл антител, необходимо пропустить образец, содержащий больше 0,25 нг/мл ПКт; а для появления на полоске 4-й линии необходимо пропустить

образец, содержащий 50 нг/мл ПКт. Изменяя начальную концентрацию антител, можно оказывать влияние на диапазон определяемых концентраций Аг в тест-системе.

Для изучения применимости разработанного градиентного ЛПИИ в клинической практике были проанализированы 82 образца сывороток. Внешний вид тест-полосок после проведения градиентного ЛПИИ для определения ПКт в реальных образцах представлен в таблице 10. Полуколичественную оценку результатов анализа проводили путем соотнесения количества проявившихся полос на мембране с диапазоном концентраций определяемого аналита. В концентрациях ниже 0,25 нг/мл в аналитической зоне наблюдалось отсутствие окрашенных линий, что соотносится с уровнем ПКт, свидетельствующим об отсутствии заболевания в организме. При концентрациях от 0,25 до 0,5 нг/мл регистрировалась одна линия, соответствующая концентрациям маркера, при которых подтверждается наличие локальной бактериальной инфекции. При значениях ПКт от 0,5 до 2 нг/мл появлялись 2 линии, которые соотносились с уровнем ПКт, указывающим на наличие системной инфекции, однако не дающий с уверенностью ставить диагноз «сепсис». Содержание ПКт от 2 до 10 нг/мл, свидетельствующее с высокой вероятностью об инфекционном процессе с системным воспалением, приводящем к сепсису, в тест-системе выявлялось в виде 3-4 окрашенных линий на тест полоске. Концентрация ПКт выше 10 нг/мл регистрировалась в виде 4 окрашенных линий, что коррелирует с уровнем маркера, наблюдающимся исключительно у пациентов с тяжелым сепсисом или септическим шоком. Таким образом, разработанный градиентный ЛПИИ с использованием в качестве метки сферических НЧЗ или нанополкоров позволяет определять ПКт в сыворотках крови с пределом обнаружения 0,25 нг/мл.

При выборе оптимальной метки, обеспечивающей высокую чувствительность анализа, были рассмотрены несферические НЧЗ в форме полкерна, которые показали снижение предела обнаружения аналита в 5 раз для ЛПИИ ПКт в стандартных растворах. В связи с этим, в работе был реализован градиентный ЛПИИ на основе НЧЗ в форме полкерна с целью повышения аналитических характеристик тест-системы (таблица 10). Однако, применение несферической формы частиц в качестве метки для разработанной системы градиентного ЛПИИ ПКт в реальных образцах сывороток крови показало сравнимые результаты с ЛПИИ на основе сферических НЧЗ.

Таблица 10. Сканированные изображения тест-полосок после проведения градиентного ЛПИИ в образцах сывороток крови человека.

Диапазоны концентраций ПКТ	Градиентный ЛПИИ на основе сферических НЧЗ	Градиентный ЛПИИ на основе НЧЗ в форме попкорнов
Менее 0,25 нг/мл (0 линий)		
От 0,25 до 0,5 нг/мл (1 линия)		
От 0,5 до 2 нг/мл (2 линии)		
От 2 до 10 нг/мл (3-4 линии)		
Более 10 нг/мл (4 линии)		

Это может быть связано со сложной формой метки, которая в условиях образцов реальной сыворотки создает стерические затруднения для связывания меченных антител с поверхностью анализируемого Аг. Тем не менее, можно предположить, что применение НЧЗ в форме попкорнов в качестве метки в ЛПИА для определения аналитов в образцах другого состава позволит повысить чувствительность метода.

3.4.3.3. Сравнение градиентного ЛПИА ПКт с методом ИФА

С целью подтверждения эффективности разработанного градиентного ЛПИА для определения ПКт было проведено сравнение полученных результатов с методом ИФА. Анализ методами градиентного ЛПИА и ИФА проводили параллельно. По результатам ИФА были получены следующие данные: 25 образцов с содержанием ПКт менее 0,25 нг/мл; 16 образцов с ПКт от 0,25 до 0,5 нг/мл; 14 образцов, содержащих ПКт в диапазоне от 0,5 до 2 нг/мл; 14 образцов с ПКт от 2 до 10 нг/мл; 13 образцов, уровень ПКт в которых составил более 10 нг/мл. Чувствительность метода ИФА-ПКт, заявленная производителем, составляет 0,04 нг/мл с диапазоном определяемых концентраций от 0 до 12,8 нг/мл.

Сравнение данных, полученных градиентным ЛПИА, с методом ИФА показало хорошую сходимость для концентрации ПКт выше 2 нг/мл, однако в диапазоне концентраций от 0,25 до 2 нг/мл наблюдалось появление ложноотрицательных результатов (таблица 11). Следует отметить, что в диапазоне ПКт от 0,5 до 2 нг/мл к ложноотрицательным относили образцы, у которых результат соответствовал сдвигу диапазона концентраций в сторону ПКт от 0,25 до 0,5 нг/мл, то есть, на полоске проявлялась только одна окрашенная линия вместо двух. В этой связи, полученные данные можно считать приемлемыми, поскольку основной задачей быстрой тест-системы является мониторинг динамики уровня ПКт в сыворотке крови. Замена метки в виде сферических НЧЗ на частицы в форме попкорна не привела к улучшению характеристик градиентного ЛПИА ПКт.

Таблица 11. Сравнение результатов, полученных ИФА и градиентными ЛПИИ тест-системами для определения ПКт в сыворотке крови.

Метод	менее 0,25 нг/мл 0 линий	от 0,25 до 0,5 нг/мл 1 линия	от 0,5 до 2 нг/мл 2 линии	от 2 до 10 нг/мл 3-4 линии	более 10 нг/мл 4 линии
ИФА	25	16	14	14	13
Градиентный ЛПИИ с использованием сферических НЧЗ (35 нм)	24 1 – Л(+)	13 3 – Л(-)	11 3 – Л(-)	13 1 – (Л-)	12 1 – (Л-)
Градиентный ЛПИИ с использованием НЧЗ в форме попкорна	24 1 – Л(+)	11 5 – Л(-)	8 6 – Л(-)	11 3 – Л(-)	13

Для оценки информативности и разрешающей способности разработанного градиентного ЛПИИ на основе сферических НЧЗ (35 нм) и градиентного ЛПИИ на основе НЧЗ в форме попкорнов (100 нм) для диагностики бактериальных инфекций и сепсиса оценивали чувствительность, специфичность и точность метода. Данные показатели отражают возможность постановки правильного диагноза у больных и здоровых людей. В таблице 12 сведены статистические результаты быстрого и полуколичественного градиентного ЛПИИ для определения ПКт в сыворотке крови человека. Градиентный ЛПИИ тест на основе сферических НЧЗ позволил выявить 49 из 57 положительных образцов и 24 из 25 отрицательных образцов с чувствительностью 87,50%. С помощью градиентного ЛПИИ с использованием в качестве метки золотых нанпопкорнов были выявлены 43 из 57 положительных образцов и 24 из 25 отрицательных образцов с чувствительностью 76,60%. Для оценки значимости различий между выявленными в результате градиентного ЛПИИ количеством исходов и количеством исходов, полученных контрольным методом ИФА-ПКт, использовали непараметрический метод – критерий χ^2 Пирсона. Уровень значимости для градиентного ЛПИИ на основе сферических НЧЗ составил $p=0,750$; для градиентного ЛПИИ на основе НЧЗ в форме

попкорнов – $p=0,491$. Полученные результаты можно интерпретировать следующим образом: при $p>0,05$ нулевая гипотеза о совпадении частот, наблюдаемых методом градиентного ЛПИА и частот, полученных ИФА, не отклоняется.

На сегодняшний день коммерчески доступна иммунохроматографическая тест-система для полуколичественного определения ПКт в сыворотке или плазме крови, выпускаемая немецкой компанией Brahms. Полуколичественное определение диапазона концентраций ПКт проводится путем соотнесения интенсивности окрашивания проявившейся на полоске линии с приложенной в наборе контрольной карточкой. Однако, недостатком такой тест-системы является вероятность появления ложных результатов, возникающих: в случае трудностей индивидуальной интерпретации интенсивности тестовой линии; в случае изменения цвета сыворотки крови (например, высокое содержание билирубина, придающего желтый оттенок сыворотке), которое приводит к снижению интенсивности окрашивания тестовой линии. В таблице 13 проведено сравнение предложенного нового метода градиентного ЛПИА с коммерческой иммунохроматографической тест-системой для определения ПКт. Как видно, градиентный ЛПИА ПКт по своим характеристикам превосходит существующий тест, основанный на аналогичном принципе ЛПИА с использованием в качестве метки НЧЗ.

Таблица 12. Оценка информативности и разрешающей способности предложенного диагностического метода градиентного ЛПИИ для опеределения ПКт в сыворотке крови человека.

Статистика	Формула	Значение	95%-ный доверительный интервал
Чувствительность	$\frac{a}{a+b}$	87,50	75,93% - 94,82%
		76,60	61,97% - 87,70%
Специфичность	$\frac{d}{c+d}$	92,31	74,87% - 99,05%
		92,31	74,87% - 99,05%
Отношение правдоподобности положительного результата исследования	$\frac{\text{Чувствительность}}{1 - \text{Специфичность}}$	11,38	2,99 - 43,24
		9,96	2,60 - 38,06
Отношение правдоподобности отрицательного результата исследования	$\frac{1 - \text{Чувствительность}}{\text{Специфичность}}$	0,14	0,07 - 0,27
		0,25	0,15 - 0,43
Распространенность заболевания	$\frac{a+b}{a+b+c+d}$	68,29	57,08% - 78,13%
		64,38	52,31% - 75,25%
Прогностическая ценность положительного результата	$\frac{a}{a+c}$	96,08	86,57% - 98,94%
		94,74	82,48% - 98,57%
Прогностическая ценность отрицательного результата	$\frac{d}{b+d}$	77,42	62,96% - 87,37%
		68,57	56,25% - 78,74%
Точность	$\frac{a+d}{a+b+c+d}$	89,02	80,18% - 94,86%
		82,19	71,47% - 90,16%

* Красным цветом выделены значения для градиентного ЛПИИ на основе сферических НЧЗ, а синим – для градиентного ЛПИИ на основе НЧЗ в форме попкорнов.

a - число истинно положительных результатов, b - число ложноотрицательных результатов, c - число ложноположительных результатов, d - число истинно отрицательных результатов.

Таблица 13. Сравнение характеристик разработанного градиентного ЛПИИ с коммерческой тест-системой.

Тест	Оценка результатов анализа	Объем образца, мкл	Время анализа, минут	Предел обнаружения, нг/мл
Иммунохроматографическая тест-полоска (PCT-Q, Brahms)	Путем сравнения интенсивности окрашенной полоски с контрольной карточкой	200	30	0,5
Градиентный ЛПИИ	Путем подсчета числа окрашенных тестовых линий, соответствующих определенному диапазону концентраций ПКт	100	10-15	0,2

Таким образом, разработанные тест-системы на основе градиентного ЛПИИ, реализованные для двух типов метки, позволяют быстро (в течение 10-15 минут), визуально и с высокой чувствительностью определять 5 клинически значимых диапазонов концентраций ПКт и могут быть в дальнейшем адаптированы для использования в клинической практике с целью подтверждения или опровержения диагноза "сепсис", а также для мониторинга за ходом проводимого лечения.

Выводы

1. Для разработки экспресс-метода определения ПКт в буферных растворах и сыворотке крови проведена оптимизация состава компонентов тест-систем, в том числе золотых наночастиц сферической и несферической формы различного диаметра в качестве регистрируемых меток, определены оптимальные значения рН и концентрационные условия для получения конъюгатов антител с наночастицами золота, а также осуществлен выбор возможных комбинаций антител и свойств мембранных носителей.
2. Разработан количественный экспресс-метод ЛПИА ПКт на основе фотометрической детекции с использованием в качестве метки антител сферических наночастиц золота с диаметром 35 нм. Предел обнаружения ПКт составил 0,5 нг/мл, время определения - 10 минут, объем образца – 100 мкл. Разработанный метод позволяет визуально без использования специальных приборов определять концентрации ПКт выше 2 нг/мл, что свидетельствует о системном воспалении и возможном развитии сепсиса в организме.
3. Для более точного количественного определения концентраций ПКт в "серой" зоне (от 0,25 до 2 нг/мл) и верификации сепсиса рассмотрены возможные способы понижения предела обнаружения ПКт, включающие несколько основных подходов: снижение предела регистрации метки путем введения фермента ПХ в состав конъюгата золотых наночастиц с антителами; использование в качестве нового вида меток в иммуноанализе укрупненного агломерата конъюгата обычных сферических наночастиц золота с биотинилированными антителами в присутствии стрептавидина; использование в качестве метки наночастиц золота несферической формы ("нанозвезды" и "нанопопкорн"); введение дополнительной стадии "усиления" серебром; использование КТ в качестве метки антител; и использование для регистрации конечного сигнала метода гигантского комбинационного рассеяния. Все предложенные подходы позволяют в 2-10 раз снизить определяемый предел обнаружения ПКт, однако для практического использования и визуальной детекции наиболее перспективными являются системы, в которых в качестве метки используются наночастицы золота в форме "попкорна" или укрупненного агломерата на основе системы стрептавидин-биотин.
4. На примере определения ХГЧ в диапазоне 50 – 10000 мЕд/мл разработан принцип полуколичественного визуального ЛПИА (градиентный иммуноанализ), позволяющий проводить оценку концентраций анализируемых веществ в заранее заданном числе определенных диапазонов концентраций путем подсчета числа видимых тестовых линий. Данный принцип проведения анализа был реализован для полуколичественного

определения ПКт в пяти клинически значимых диапазонах концентраций в сыворотке, что дает возможность проведения дифференциальной диагностики между различными клиническими состояниями и тяжелой бактериальной инфекцией (сепсисом). Предел обнаружения градиентного ЛПИИ для определения ПКт в сыворотке крови составил 0,25 нг/мл, время проведения анализа – 10-15 минут, объем образца – 100 мкл. Показано соответствие результатов градиентного ЛПИИ ПКт с результатами, полученными методом ИФА, в пяти диапазонах концентраций маркера.

Список литературы

1. Plotz C.M. and Singer J.M. The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis // *Am. J. Med.* – 1956. – V. 21. – P. 888-892.
2. Berson S.A. and Yalow R.S. Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody // *J. Clin. Invest.* – 1959. – V. 38. – No. 11. – P. 1996-2016.
3. Vaitukaitis J.L., Braunstein G.D., and Ross G.T. A radioimmunoassay which specifically measures human chorionic gonadotropin in the presence of human luteinizing hormone // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1972. – V. 113. – No. 6. – P. 751-758.
4. Samsonova J.V., Safronova V.A., Osipov A.P. Rapid flow-through enzyme immunoassay of progesterone in whole cows' milk // *Analytical Biochemistry.* – 2018. – V. 545. – P. 43-48.
5. Yu C.Y. et al. Dry-reagent gold nanoparticle-based lateral flow biosensor for the simultaneous detection of *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 // *J. Microbiol. Methods.* – 2011. – V. 86. – No. 3. – P. 277-282.
6. Fu Q., Liang J., Lan C., Zhou K., Shi C., and Tang Y. Development of a novel dual-functional lateral-flow sensor for on-site detection of small molecule analytes // *Sensors Actuators B Chem.* – 2014. – V. 203. – P. 683-689.
7. Amerongen A. et al. Colloidal carbon particles as a new label for rapid immunochemical test methods: quantitative computer image analysis of results // *J. Biotechnol.* – 1993. – V. 30. – No. 2. – P. 185-195.
8. Ching K.H., He X., Stanker L.H., Lin A.V, McGarvey J.A., and Hnasko R. Detection of Shiga Toxins by Lateral Flow Assay // *Toxins (Basel)* – 2015. – V. 7. – No. 4. – P. 1163-1173.
9. Mei Z. et al. One-step signal amplified lateral flow strip biosensor for ultrasensitive and on-site detection of bisphenol A (BPA) in aqueous samples // *Biosens. Bioelectron.* – 2013. – V. 49. – P. 457-461.
10. Sajid M., Kawde A.-N., and Daud M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review // *J. Saudi Chem. Soc.* – 2015. – V. 19. – No. 6. – P. 689-705.
11. Van Dam G., Witchers J., Ferreira T., Ghatai D. Van Amerongen A., Deelder A. Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2004. – V.42. – P. 5458-5461.
12. Fridley G., Holstein C., Oza S., Yager P. The evolution of nitrocellulose as a material for bioassays // *MRS Bulletin.* – 2013. – V. 38. – P. 326-330.
13. O'Farrell B. and Bauer J. Developing highly sensitive, more reproducible lateral flow assays. Part 1: New approaches to old problems // *IVD Technol.* – 2006. – P. 41-50.

14. Millipore Corp. Rapid lateral flow test strips: consideration for product development. [Электронный ресурс]// 2013. URL:
<http://www.millipore.com/techpublications/tech1/tb500en00>
15. Barnett J.M. et al. An inexpensive, fast and sensitive quantitative lateral flow magneto-immunoassay for total prostate specific antigen // *Biosensors*. – 2014. – V. 4. – No. 3. – P. 204-220.
16. Lee L.G., Nordman E.S., Johnson M.D., and Oldham M.F. A Low-Cost, High-Performance System for Fluorescence Lateral Flow Assays // *Biosensors*. – 2013. – V. 3. – No. 4. – P. 360-373.
17. Wang Y., Xu C., Ow H. Commercial nanoparticles for stem cell labeling and tracking // *Theranostics*. – 2013. – V. 3. – No 8. – P. 544-560.
18. Dosev D., Nichkova M., Kennedy I.M. Inorganic lanthanide nanophosphors in biotechnology // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2008. – V. 8. – No 3. – P. 1052-1067.
19. Seydack M. Nanoparticle labels in immunosensing using optical detection methods // *Biosens. Bioelectron.* – 2005. – V. 20. – No. 12. – P. 2454-2469.
20. Parolo C., de la Escosura-Muniz A., and Merkoci A. Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes // *Biosens. Bioelectron.* – 2013. – V. 40. – No. 1. – P. 412-416.
21. Дыкман Л.А., Богатырев В.А. Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии // *Успехи химии* – 2007. – Т. 76. – No. 2. – С. 199-213.
22. Choi W.K. et al. A combined top-down and bottom-up approach for precise placement of metal nanoparticles on silicon // *Small* – 2008. – V. 4. – No. 3. – P. 330-333.
23. Borowskaja D.P. Zur Methodik der Goldsolbereitung // *Ztschr. Immunitatsforsch. Exp. Ther.* – 1934. – V. 82. – P. 178-182.
24. Turkevich J., Stevenson P., and Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold // *Discuss. Faraday. Soc.* – 1951. – V. 11. – P. 55-75.
25. Frens G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions // *Nat. Phys. Sci.* – 1973. – V. 241. – P. 20.
26. Turkevich J. Colloidal gold. Part I. Historical and preparative aspects: morphology and structure // *Gold Bull.* – 1985. – V. 18. – P. 86-91.
27. Mirkin C.A. Programming the Assembly of Two- and Three-Dimensional Architectures with DNA and Nanoscale Inorganic Building Blocks // *Inorg. Chem.* – 2000. – V. 39. – No. 11. – P. 2258-2272.

28. Хлебцов Н.Г. и др. Оптические свойства коллоидного золота и его конъюгатов с биоспецифическими макромолекулами // Коллоидный журнал.- 1995. – Т. 57. - № 3. – С. 412-423.
29. Baschong W., Lucocq J.M., and Roth J. ‘Thiocyanate gold’: small (2-3 nm) colloidal gold for affinity cytochemical labeling in electron microscopy // Histochemistry – 1985. – V. 83. – No. 5. – P. 409-411.
30. Goia D.V. and Matijevic E. Preparation of monodispersed metal particles // New J. Chem. – 1998. – V. 22. – No. 11. – P. 1203-1215.
31. Goudarzi S., Ahmadi A., Farhadi M., Kamrava S.K., Saghafi S., and Omidfar K. Development of a new immunochromatographic assay using gold nanoparticles for screening of IgA deficiency // Iran. J. Allergy. Asthma. Immunol. – 2015. – V. 14. – No. 1. – P. 105-112.
32. Jiang T. et al. Development and validation of a lateral flow immunoassay using colloidal gold for the identification of serotype-specific foot-and-mouth disease virus O, A and Asia 1 // J. Virol. Methods – 2011. – V. 171. – No. 1. – P. 74-80.
33. Yin H.-Y., Chu P.-T., Tsai W.-C., and Wen H.-W. Development of a barcode-style lateral flow immunoassay for the rapid semi-quantification of gliadin in foods // Food Chem. – 2016. – V. 192. – P. 934-942.
34. Lauren A., Megan A. The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in biodiagnostics, therapy, and drug delivery // Arch Toxicol. – 2014. – No. 88. – P. 1391-1417.
35. Mie G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speciell kolloidaler Metallösungen // Ann. Phys. 1908. – Bd. 25. – S. 377-445.
36. Turkevich J., Garton G., Stevenson P.C. The color of colloidal gold // J. Colloid Sci. – 1954. – 9(suppl. 1). – P. 26-35.
37. Khlebtsov B. and Khlebtsov N. Enhanced solid-phase immunoassay using gold nanoshells: effect of nanoparticle optical properties // Nanotechnology – 2008. – V. 19. – No. 43. – P. 435703.
38. Liao J.-Y. and Li H. Lateral flow immunodipstick for visual detection of aflatoxin B1 in food using immuno-nanoparticles composed of a silver core and a gold shell // Microchim. Acta – 2010. – V. 171. – No. 3. – P. 289-295.
39. Tang D. et al. Magnetic nanogold microspheres-based lateral-flow immunodipstick for rapid detection of aflatoxin B2 in food // Biosens. Bioelectron. – 2009. – V. 25. – No. 2. – P. 514-518.
40. Choi D.H. et al. A dual gold nanoparticle conjugate-based lateral flow assay (LFA) method for the analysis of troponin I // Biosens. Bioelectron. – 2010. – V. 25. – No. 8. – P. 1999-2002.

41. Chen M. et al. Dual gold nanoparticle lateflow immunoassay for sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 // *Anal. Chim. Acta* – 2015. – V. 876. – P. 71-76.
42. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы. Синтез, свойства, биомедицинское применение // *Наука* – 2008. – С. 319.
43. Englebienne P., Van Hoonacker A. Bionanotechnology: The Science of Revealing Life with Nanostructures // *Current Nanoscience* – 2005. – V. 1. – No. 2. – P. 97-106.
44. Liao H., Nehl C.L., and Hafner J.H. Biomedical applications of plasmon resonant metal nanoparticles // *Nanomedicine (Lond)* – 2006. – V. 1. – No. 2. – P. 201-208.
45. Khlebtsov N. et al. Analytical and theranostic applications of gold nanoparticles and multifunctional nanocomposites // *Theranostics* – 2013. – V. 3. – No. 3. – P. 167-180.
46. Zhang L. et al. Hierarchical Flowerlike Gold Nanoparticles Labeled Immunochromatography Test Strip for Highly Sensitive Detection of *Escherichia coli* O157:H7 // *Langmuir* – 2015. – V. 31. – No. 19. – P. 5537-5544.
47. Chiao D.-J., Shyu R.-H., Hu C.-S., Chiang H.-Y., and Tang S.-S. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of botulinum neurotoxin type B // *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. life Sci.* – 2004. – V. 809. – No. 1. – P. 37-41.
48. Yang W. et al. A colloidal gold probe-based silver enhancement immunochromatographic assay for the rapid detection of abrin-a // *Biosens. Bioelectron.* – 2011. – V. 26. – No. 8. – P. 3710-3713.
49. Drygin Yu F., Blintsov A.N., Osipov A.P., Grigorenko V.G., Andreeva I.P., Uskov A.I., Varitsev Yu A., Anisimov B.V., Novikov V.K., Atabekov J.G. High-Sensitivity Express Immunochromatographic Method for Detection of Plant Infection by Tobacco Mosaic Virus // *Biochemistry (Moscow)* – 2009. – V. 74. – No. 9. – P. 986-993.
50. Liu R., Zhang Y., Zhang S., Qiu W., and Gao Y. Silver Enhancement of Gold Nanoparticles for Biosensing: From Qualitative to Quantitative // *Appl. Spectrosc. Rev.* – 2014. – V. 49. – No. 2. – P. 121-138.
51. Gupta S., Huda S., Kilpatrick P. K., and Velev O. D. Characterization and optimization of gold nanoparticle-based silver-enhanced immunoassays // *Anal. Chem.* – 2007. – V. 79. – No. 10. – P. 3810-3820.
52. Wada A., Sakoda Y., Oyamada T., Kida H. Development of a highly sensitive immunochromatographic detection kit for H5 influenza virus hemagglutinin using silver amplification // *J Virol Methods* – 2011. – V. 178. – No. 1-2. – P. 82-86.

53. Linares E.M., Kubota L.T., Michaelis J., and Thalhammer S. Enhancement of the detection limit for lateral flow immunoassays: evaluation and comparison of bioconjugates // *J. Immunol. Methods* – 2012. – V. 375. – No. 1–2. – P. 264-270.
54. Nagatani N. et al. Gold nanoparticle-based novel enhancement method for the development of highly sensitive immunochromatographic test strips // *Sci. Technol. Adv. Mater.* – 2006. – V. 7. – No. 3. – P. 270-275.
55. Mao X., Ma Y., Zhang A., Zhang L., Zeng L., and Liu G. Disposable nucleic acid biosensors based on gold nanoparticle probes and lateral flow strip // *Anal. Chem.* – 2009. – V. 81. – No. 4. – P. 1660-1668.
56. He Y. et al. Ultrasensitive nucleic acid biosensor based on enzyme-gold nanoparticle dual label and lateral flow strip biosensor // *Biosens. Bioelectron.* – 2011. – V. 26. – No. 5. – P. 2018-2024.
57. Kaur J. et al. Immunochromatographic dipstick assay format using gold nanoparticles labeled protein-hapten conjugate for the detection of atrazine // *Environ. Sci. Technol.* – 2007. – V. 41. – No. 14. – P. 5028-5036.
58. Li J. et al. Gold immunochromatographic strips for enhanced detection of avian influenza and Newcastle disease viruses // *Anal. Chim. Acta* – 2013. – V. 782. – P. 54-58.
59. Hendrickson O.D., Urusov A.E., Kuznetsova D.A., Zherdev A.V. and Dzantiev B.B. A Biotin–Streptavidin Module for Signal Amplification in Immunochromatographic Analysis to Control Antibiotic Levels // *Int. J. Appl. Eng. Res.* – 2017. – V. 12. – No. 23. – P. 13552-13564.
60. Kikkas I., Mallone R., Larger E., Volland H., Morel N. A rapid lateral flow immunoassay for the detection of tyrosine phosphatase-like protein IA-2 autoantibodies in human serum // *PLoS one* – 2014. – V. 9. – No. 7. – P. e103088.
61. Posthuma-Trumpie G.A., Wichers J.H., Koets M., Berendsen L. B. J. M., and van Amerongen A. Amorphous carbon nanoparticles: a versatile label for rapid diagnostic (immuno)assays // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – V. 402. – No. 2. – P. 593-600.
62. Lonnberg M. and Carlsson J. Quantitative detection in the attomole range for immunochromatographic tests by means of a flatbed scanner // *Anal. Biochem.* – 2001. – V. 293. – No. 2. – P. 224-231.
63. Qiu W. et al. Carbon nanotube-based lateral flow biosensor for sensitive and rapid detection of DNA sequence // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – V. 64. – P. 367-372.
64. Lonnberg M., Drevin M., and Carlsson J. Ultra-sensitive immunochromatographic assay for quantitative determination of erythropoietin // *J. Immunol. Methods.* – 2008. – V. 339. – No. 2. – P. 236-244.

65. Mohamad N., Nor K., Razak A., Tan S. C., and Noordin R. Properties of surface functionalized iron oxide nanoparticles (ferrofluid) conjugated antibody for lateral flow immunoassay application // *J. Alloys Compd.* – 2012. – V. 538. – P. 100-106.
66. Liu C. et al. Lateral flow immunochromatographic assay for sensitive pesticide detection by using Fe₃O₄ nanoparticle aggregates as color reagents // *Anal. Chem.* – 2011. – V. 83. – No. 17. – P. 6778-6784.
67. Lou S.C., Patel C., Ching S., and Gordon J. One-step competitive immunochromatographic assay for semiquantitative determination of lipoprotein(a) in plasma // *Clin. Chem.* – 1993. – V. 39. – No. 4. – P. 619-624.
68. Jiang T. et al. Sensitive detection of Escherichia coli O157:H7 using Pt-Au bimetal nanoparticles with peroxidase-like amplification // *Biosens. Bioelectron.* – 2016. – V. 77. – P. 687-694.
69. Park J.-M., Jung H.-W., Chang Y.W., Kim H.-S., Kang M.-J., and Pyun J.-C. Chemiluminescence lateral flow immunoassay based on Pt nanoparticle with peroxidase activity // *Anal. Chim. Acta* – 2015. – V. 853. – P. 360-367.
70. Wang F., Tan W.B., Zhang Y., Fan X., and Wang M. Luminescent nanomaterials for biological labelling // *Nanotechnology* – 2005. – V. 17. – No. 1. – P. R1.
71. Nooney R.I., McCormack E., and McDonagh C. Optimization of size, morphology and colloidal stability of fluorescein dye-doped silica NPs for application in immunoassays // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – V. 404. – No. 10. – P. 2807-2818.
72. Oh S.W., Kim Y.M., Kim H.J., Kim S.J., Cho J.-S., and Choi E. Y. Point-of-care fluorescence immunoassay for prostate specific antigen // *Clin. Chim. Acta.* – 2009. – V. 406. – No. 1-2. – P. 18-22.
73. Oh S.W. et al. Evaluation of fluorescence hs-CRP immunoassay for point-of-care testing // *Clin. Chim. Acta.* – 2005. – V. 356. – No. 1-2. – P. 172-177.
74. Choi S., Choi E.Y., Kim D.J., Kim J.H., Kim T.S., and Oh S.W. A rapid, simple measurement of human albumin in whole blood using a fluorescence immunoassay (I) // *Clin. Chim. Acta.* – 2004. – V. 339. - No 1-2. – P 147-156.
75. Choi S., Choi E.Y., Kim H.S., and Oh S.W. On-site quantification of human urinary albumin by a fluorescence immunoassay // *Clin. Chem.* – 2004. – V. 50. – No. 6. – P. 1052-1055.
76. Jeong J.H., Kim T.K., Oh S.W., and Choi E.Y. Fluorescence immunoassay for thyroid stimulating hormone in whole blood // *BioChip J.* – 2013. – V. 7. – No. 4. – P. 408-414.
77. Yeo S.J., Cuc B.T., Kim S.A., Kim D.T.H., Bao D.T., Tien T.T.T., Anh N.T.V., Choi D.Y., Chong C.K., Kim H.S., Park H. Rapid detection of avian influenza A virus by

- immuno chromatographic test using a novel fluorescent dye // *Biosens Bioelectron.* – 2017. – V. 94. – P. 677-685.
78. Kim Y.M., Oh S.W., Jeong S.Y., Pyo D.J., and Choi E.Y. Development of an ultrarapid one-step fluorescence immuno chromatographic assay system for the quantification of microcystins // *Environ. Sci. Technol.* – 2003. – V. 37. – No. 9. – P. 1899-1904.
79. Dabbousi B.O. et al. (CdSe)ZnS Core–Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites // *J. Phys. Chem. B* – 1997. – V. 101. – No. 46. – P. 9463-9475.
80. Lim S.J., Chon B., Joo T., and Shin S.K. Synthesis and Characterization of Zinc-Blende CdSe-Based Core/Shell Nanocrystals and Their Luminescence in Water // *J. Phys. Chem. C* – 2008. – V. 112. – No. 6. – P. 1744-1747.
81. Chan W.C. and Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection // *Science* – 1998. – V. 281. – No 5385. – P. 2016-2018.
82. Bruchez M.J., Moronne M., Gin P., Weiss S., and Alivisatos A. P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels // *Science* – 1998. – V. 281. – No. 5385. – P 2013-2016.
83. Mattoussi H. et al. Self-Assembly of CdSe–ZnS Quantum Dot Bioconjugates Using an Engineered Recombinant Protein // *J. Am. Chem. Soc.* – 2000. – V. 122. – No. 49. – P. 12142-12150.
84. Murray C.B., Norris D.J., Bawendi M.G. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E=S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites // *Journal of American Chemical Society.* – 1993. – V. 115. – P. 8706-8715.
85. Cimaglia F. et al. Quantum dots nanoparticle-based lateral flow assay for rapid detection of *Mycobacterium* species using anti-FprA antibodies // *Nanotechnol. Dev.* – 2012. – V. 2. – No. 1. – P. 26-30.
86. Shen J. et al. Immuno chromatographic assay for quantitative and sensitive detection of hepatitis B virus surface antigen using highly luminescent quantum dot-beads // *Talanta.* – 2015. – V. 142. – P. 145-149.
87. Wang C., Hou F., and Ma Y. Simultaneous quantitative detection of multiple tumor markers with a rapid and sensitive multicolor quantum dots based immuno chromatographic test strip // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – V. 68. – P. 156-162.
88. Qu H. et al. Rapid lateral-flow immuno assay for the quantum dot-based detection of puerarin // *Biosens. Bioelectron.* – 2016. – V. 81. – P. 358-362.

89. Taranova N.A., Berlina A.N., Zherdev A.V, and Dzantiev B.B. ‘Traffic light’ immunochromatographic test based on multicolor quantum dots for the simultaneous detection of several antibiotics in milk // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – V. 63. – P. 255-261.
90. Li X., Li W., Yang Q., Gong X., Guo W., Dong C., Liu J., Xuan L., Chang J. Rapid and quantitative detection of prostate specific antigen with a quantum dot nanobeads-based immunochromatography test strip // *ACS Appl Mater Interfaces* – 2014. – V. 6. – No. 9. – P. 6406-6414.
91. Ren M., Xu H., Huang X., Kuang M., Xiong Y., Xu H., Xu Y., Chen H., Wang A. Immunochromatographic assay for ultrasensitive detection of aflatoxin B₁ in maize by highly luminescent quantum dot beads // *ACS Appl Mater Interfaces* – 2014. – V. 6. – No. 16. – P.14215-14222.
92. Duan H., Chen X., Xu W., Fu J., Xiong Y., Wang A. // Quantum-dot submicrobead-based immunochromatographic assay for quantitative and sensitive detection of zearalenone // *Talanta* – 2015. – V. 132. – P.126-131.
93. Liang R.-L. et al. Rapid and sensitive lateral flow immunoassay method for determining alpha fetoprotein in serum using europium (III) chelate microparticles-based lateral flow test strips // *Anal. Chim. Acta* – 2015. – V. 891. – P. 277-283.
94. Järvenpää M.L., Kuningas K., Niemi I., Hedberg P., Ristiniemi N., Pettersson K., Lövgren T. Rapid and sensitive cardiac troponin I immunoassay based on fluorescent europium (III)-chelate-dyed nanoparticles // *Clin Chim Acta* – 2012. – V. 414. – P. 70-75.
95. Zhou Y., Xia X., Xu Y., Ke W., Yang W., Li Q. Application of europium(III) chelates-bonded silica nanoparticle in time-resolved immunofluorometric detection assay for human thyroid stimulating hormone // *Anal Chim Acta* – 2012. – V. 722. – P. 95-99.
96. Rundström G., Jonsson A., Mårtensson O., Mendel-Hartvig I., Venge P. Lateral flow immunoassay using Europium (III) chelate microparticles and time-resolved fluorescence for eosinophils and neutrophils in whole blood // *Clin Chem.* – 2007. – V. 53. – No. 2. – P. 342-348.
97. Song C., Zhi A., Liu Q., Yang J., Jia G., Shervin J., Tang L., Hu X., Deng R., Xu C., Zhang G. Rapid and sensitive detection of β -agonists using a portable fluorescence biosensor based on fluorescent nanosilica and a lateral flow test strip // *Biosens Bioelectron.* – 2013. – V. 50. – P. 62-65.
98. Song X., Knotts M. Time-resolved luminescent lateral flow assay technology // *Anal Chim Acta* – 2008. – V. 626. – No. 2. – P. 186-92.

99. Xia X., Xu Y., Ke R., Zhang H., Zou M., Yang W., Li Q. A highly sensitive europium nanoparticle-based lateral flow immunoassay for detection of chloramphenicol residue // *Anal Bioanal Chem.* – 2013. – V. 405. – No. 23. – P. 7541-7544.
100. Xia X., Xu Y., Zhao X., Li Q. Lateral flow immunoassay using europium chelate-loaded silica nanoparticles as labels // *Clin Chem.* – 2009. – V. 55. – No. 1. – P. 179-182.
101. Zhang F., Zou M., Chen Y., Li J., Wang Y., Qi X., Xue Q. Lanthanide-labeled immunochromatographic strips for the rapid detection of *Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii* // *Biosens Bioelectron.* – 2014. – V. 51. – P. 29-35.
102. Guo H., Sun S. Lanthanide-doped upconverting phosphors for bioassay and therapy // *Nanoscale* – 2012. – V. 4 – No. 21. – P. 6692-6706.
103. Kodaira C.A., Lourenço A.V.S., Felinto M.C.F.C., Sanchez E.M.R., Rios F.J.O., Nunes L.A.O., Gidlund M., Malta O.L., Brito H.F. Biolabeling with nanoparticles based on Y₂O₃:Nd³⁺ and luminescence detection in the near-infrared // *Journal of Luminescence* – 2011. – V. 131 – No. 4. – P. 727-731.
104. Cháfer-Pericás C., Maquieira A., Puchades R. Functionalized inorganic nanoparticles used as labels in solid-phase immunoassays // *Trends in Analytical Chemistry* – 2012. – V. 31. – P. 144-156.
105. Sam Niedbala R., Timothy L.V., Feindt H., Li S., Burton J.L. Multiphoton up-converting phosphors for use in rapid immunoassays // *Proc. SPIE 3913, In-Vitro Diagnostic Instrumentation* – 2000.
106. Mokkapati V.K., Sam Niedbala R., Kardos K., Perez R.J., Guo M., Tanke H.J., Corstjens P.L. Evaluation of UPLink-RSV: prototype rapid antigen test for detection of respiratory syncytial virus infection // *Ann N Y Acad Sci.* – 2007. – V. 1098. – P. 476-485.
107. Zhao P., Wu Y., Zhu Y., Yang X., Jiang X., Xiao J., Zhang Y., Li C. Upconversion fluorescent strip sensor for rapid determination of *Vibrio anguillarum* // *Nanoscale* – 2014. – V. 6. – No. 7. – P. 3804-3809.
108. Corstjens P.L., de Dood C.J., Priest J.W., Tanke H.J., Handali S. Feasibility of a lateral flow test for neurocysticercosis using novel up-converting nanomaterials and a lightweight strip analyzer // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2014. – V. 8. – No. 7. – e2944.
109. Bobosha K., Tjon Kon Fat E.M., van den Eeden S.J. et. al. Field-evaluation of a new lateral flow assay for detection of cellular and humoral immunity against *Mycobacterium leprae* // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2014. – V. 8. – No. 5. – e2845.

110. Niedbala R.S., Feindt H., Kardos K., Vail T., Burton J., Bielska B., Li S., Milunic D., Bourdelle P., Vallejo R. Detection of analytes by immunoassay using up-converting phosphor technology // *Anal Biochem.* – 2001. – V. 293. – No. 1. – P. 22-30.
111. Neng J., Harpster M.H., Wilson W.C., Johnson P.A. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) detection of multiple viral antigens using magnetic capture of SERS-active nanoparticles // *Biosens. Bioelectron.* – 2013. – V. 41. – P. 316.
112. Osterberg F.W., Rizzi G., de la Torre T.Z.G., Stromberg M., Stromme M., Svedlindh P., Hansen M. Measurements of Brownian relaxation of magnetic nanobeads using planar Hall effect bridge sensors // *Biosens. Bioelectron.* – 2013. – V. 40. – No. 1. – P. 147.
113. Kokkinis G., Jamalieh M., Cardoso F., Cardoso S., Keplinger F., Giouroudi I. Magnetic-based biomolecule detection using giant magnetoresistance sensors // *J. Appl. Phys.* – 2015. – V. 117. – No. 17. – P. 17B731.
114. Shi L., Wu F., Wen Y., Zhao F., Xiang J., Ma L. A novel method to detect *Listeria monocytogenes* via superparamagnetic lateral flow immunoassay // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2015. – V. 407. – No. 2. – P. 529.
115. Wang Y., Xu H., Wei M., Gu H., Xu Q., Zhu W. Study of superparamagnetic nanoparticles as labels in the quantitative lateral flow immunoassay // *Materials Science and Engineering* – 2009. – V. 29. – No. 3. – P. 714-718.
116. Workman S., Wells S.K., Pau C.P., Owen S.M., Dong X.F., LaBorde R., Granade T.C. Rapid detection of HIV-1 p24 antigen using magnetic immuno-chromatography (MICT) // *J Virol Methods* – 2009. – V. 160. – No. 1-2. – P. 14-21.
117. Handali, S., Klarman, M., Gaspard, A. N., Dong, X. F., LaBorde, R., Noh, J., Wilkins, P. P. Development and evaluation of a magnetic immunochromatographic test to detect *taenia solium*, which causes taeniasis and neurocysticercosis in humans // *Clinical and Vaccine Immunology.* – 2010. – V. 17. – No. 4. – P. 631-637.
118. Wang D.B., Tian B., Zhang Z.P., Wang X.Y., Fleming J., Bi L.J., Yang R.F., Zhang X.E. Detection of *Bacillus anthracis* spores by super-paramagnetic lateral-flow immunoassays based on "Road Closure" // *Biosens Bioelectron.* – 2015. – V. 67. – P. 608-614.
119. Kriz K., Ibraimi F., Lu M., Hansson L.-O., Kriz D. Detection of C-reactive protein utilizing magnetic permeability detection based immunoassays // *Anal. Chem.* – 2005. – V. 77. – No. 18. – P. 5920.
120. Peck R.B., Schweizer J., Weigl B.H., Somoza C., Silver J., Sellors J.W., Lu P.S. A magnetic immunochromatographic strip test for detection of human papillomavirus 16 E6 // *Clin Chem.* – 2006. – V. 52. – No. 11. – P. 2170-2172.

121. Taton K., Johnson D., Guire P., Lange E., Tondra M., Lateral flow immunoassay using magnetoresistive sensors // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* – 2009. – V. 321. – No. 10. – P. 1679-1682.
122. Granade T.C., Workman S., Wells S.K., Holder A.N., Owen S.M., Pau C.P. Rapid detection and differentiation of antibodies to HIV-1 and HIV-2 using multivalent antigens and magnetic immunochromatography testing // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2010. – V. 17. – No. 6. – P. 1034.
123. Ho J.-A. A. and Wauchope R. D. A Strip Liposome Immunoassay for Aflatoxin B1 // *Anal. Chem.* – 2002. – V. 74. – No. 7. – P. 1493-1496.
124. Shukla S., Leem H., and Kim M. Development of a liposome-based immunochromatographic strip assay for the detection of Salmonella // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – V. 401. – No. 8. – P. 2581-2590.
125. Khreich N., Lamourette P., Boutal H., Devilliers K., Creminon C., and Volland H. Detection of Staphylococcus enterotoxin B using fluorescent immunoliposomes as label for immunochromatographic testing // *Anal. Biochem.* – 2008. – V. 377. – No. 2. – P. 182–188.
126. Lee K.S., Lee W.-Y., and Park J.-K. Disposable thick-film liposome immunosensor for theophylline using immunochromatographic matrix // *Solid State Sensors and Actuators* – 1997. – V. 1. – P. 195-198.
127. Akbarzadeh A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications // *Nanoscale Res. Lett.* – 2013. – V. 8. – No. 1. – P. 102.
128. Qin Z., Chan W.C.W., Boulware D.R., Akkin T., Butler E.K., and Bischof J.C. Significantly Improved Analytical Sensitivity of Lateral Flow Immunoassays by Thermal Contrast // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2012. – V. 51. – No. 18. – P. 4358-4361.
129. Wang Y. et al. Thermal Contrast Amplification Reader Yielding 8-Fold Analytical Improvement for Disease Detection with Lateral Flow Assays // *Anal. Chem.* – 2016. – V. 88. – No. 23. – P. 11774-11782.
130. Wang Y., Ravindranath S., and Irudayaraj J. Separation and detection of multiple pathogens in a food matrix by magnetic SERS nanoprobe // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – V. 399. – No. 3. – P. 1271-1278.
131. Lee M. et al. Highly reproducible immunoassay of cancer markers on a gold-patterned microarray chip using surface-enhanced Raman scattering imaging // *Biosens. Bioelectron.* – 2011. – V. 26. – No. 5. – P. 2135-2141.
132. Zhu G., Hu Y., Gao J., and Zhong L. Highly sensitive detection of clenbuterol using competitive surface-enhanced Raman scattering immunoassay // *Anal. Chim. Acta* – 2011. – V. 697. – No. 1. – P. 61-66.

133. Dufek E. J. et al. Competitive surface-enhanced Raman scattering assay for the 1,25-dihydroxy metabolite of vitamin D3 // *Analyst* – 2010. – V. 135. – No. 11. – P. 2811-2817.
134. Chan C.P.Y. et al. Evidence-based point-of-care diagnostics: current status and emerging technologies // *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto, Calif)* – 2013. – V. 6. – P. 191-211.
135. Xie Y. et al. A novel immunochromatographic assay (ICA) based on surface-enhanced Raman scattering for the sensitive and quantitative determination of clenbuterol // *Anal. Methods* – 2015. – V. 7. – No. 2. – P. 513-520.
136. Lee S., Kim G., and Moon J. Performance improvement of the one-dot lateral flow immunoassay for aflatoxin B1 by using a smartphone-based reading system // *Sensors (Basel)* – 2013. – V. 13. – No. 4. – P. 5109-5116.
137. Fang C., Chen Z., Li L., and Xia J. Barcode lateral flow immunochromatographic strip for prostate acid phosphatase determination // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2011. – V. 56. – No. 5. – P. 1035-1040.
138. Panferov V.G., Safenkova I.V., Zherdev A.V., and Dzantiev B.B. Setting up the cut-off level of a sensitive barcode lateral flow assay with magnetic nanoparticles // *Talanta* – 2017. – V. 164. – P. 69-76.
139. Leung W., Chan C.P., Rainer T.H., Ip M., Cautherley G.W.H., and Renneberg R., “InfectCheck CRP barcode-style lateral flow assay for semi-quantitative detection of C-reactive protein in distinguishing between bacterial and viral infections // *J. Immunol. Methods* – 2008. – V. 336. – No. 1. – P. 30-36.
140. Thygesen K. et al. How to use high-sensitivity cardiac troponins in acute cardiac care // *Eur. Heart J.* – 2012. – V. 33. – No. 18. – P. 2252-2257.
141. Гельфанд Б.П., Бурневич С.З., Гельфанд Е.Б. и др. Биохимические маркеры системной воспалительной реакции: роль прокальцитонина в диагностике сепсиса // *Инфекции в хирургии* – 2007. – V. 5. – No. 1. – P. 19-24.
142. Altmann D.R. et al. Elevated Cardiac Troponin I in Sepsis and Septic Shock: No Evidence for Thrombus Associated Myocardial Necrosis // *PLoS One* – 2010. – V. 5. – No. 2. – P. e9017.
143. Moullec J. M. Le et al. The complete sequence of human preprocalcitonin // *FEBS Lett.* – 1984. – V. 167. – No. 1. – P. 93-97.
144. Becker K.L., Nylen E.S., White J.C., Muller B., and Snider R.H.J. Clinical review 167: Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2004. – V. 89. – No. 4. – P. 1512-1525.

145. Habener J.F. and Schiller A.L. Pathogenesis of Renal Osteodystrophy — A Role for Calcitonin? // *N. Engl. J. Med.* – 1977. – V. 296. – No. 19. – P. 1112-1114.
146. Cate C.C., Pettengill O.S., and Sorenson G.D. Biosynthesis of procalcitonin in small cell carcinoma of the lung // *Cancer Res.* – 1986. – V. 46. – No. 2. – P. 812-818.
147. van Rossum A.M.C., Wulkan R.W., and Oudesluys-Murphy A.M. Procalcitonin as an early marker of infection in neonates and children // *Lancet. Infect. Dis.* – 2004. – V. 4. – No. 10. – P. 620-630.
148. López Sastre J.B., Solís D.P., Serradilla V.R., Colomer B.F., Cotallo G.D.C., and Castrillo G. de H. Evaluation of procalcitonin for diagnosis of neonatal sepsis of vertical transmission // *BMC Pediatr.* – 2007. – V. 7. – P. 9.
149. Vouloumanou E.K., Plessa E., Karageorgopoulos D.E., Mantadakis E., and Falagas M.E. Serum procalcitonin as a diagnostic marker for neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis // *Intensive Care Med.* – 2011. – V. 37. – No. 5. – P. 747-762.
150. Ghillani P.P. et al. Identification and measurement of calcitonin precursors in serum of patients with malignant diseases // *Cancer Res.* – 1989. – V. 49. – No. 23. – P. 6845–6851.
151. Smith M.D. et al. Elevated serum procalcitonin levels in patients with melioidosis // *Clin. Infect. Dis.* – 1995. – V. 20. – No. 3. – P. 641-645.
152. Taranova N.A., Urusov A.E., Sadykhov E.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Bifunctional gold nanoparticles as an agglomeration-enhancing tool for highly sensitive lateral flow tests: a case study with procalcitonin // *Microchim Acta* – 2017.
153. Гендриксон О.Д., Жердев А.В., and Дзантиев Б.Б. Молекулярно импринтированные полимеры и их применение в биохимическом анализе // *Успехи биологической химии.* – 2006. – V. 46. – P. 149– 192.
154. Sener G., Ozgur E., Rad A.Y., Uzun L., Say R., and Denizli A. Rapid real-time detection of procalcitonin using a microcontact imprinted surface plasmon resonance biosensor // *Analyst* – 2013. – V. 138. – No. 21. – P. 6422-6428.
155. Meisner M. PCT, Procalcitonin - a new, innovative infection parameter biochemical and clinical aspects // Berlin: Brahms-Diagnostica – 1996.
156. Fortunato A. A new sensitive automated assay for procalcitonin detection: LIAISON(®) BRAHMS PCT(®) II GEN // *Pract. Lab. Med.* – 2016. – V. 6. – P. 1-7.
157. Jin M. and Khan A.I. Procalcitonin: Uses in the Clinical Laboratory for the Diagnosis of Sepsis // *Lab. Med.* – 2010. – V. 41. – No. 3. – P. 173-177.

158. Ceriotti F., Marino I., Motta A., and Carobene A. Analytical evaluation of the performances of Diazyme and BRAHMS procalcitonin applied to Roche Cobas in comparison with BRAHMS PCT-sensitive Kryptor // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2017. – V. 56. – No. 1. – P. 162-169.
159. Qi X., Huang Y., Lin Z., Xu L., and Yu H. Dual-Quantum-Dots-Labeled Lateral Flow Strip Rapidly Quantifies Procalcitonin and C-reactive Protein // *Nanoscale Res. Lett.* – 2016. – V. 11. – No. 1. – P. 167.
160. Zhao Y., Zhou C., Wu R., Li L., Shen H., and Li L.S. Preparation of multi-shell structured fluorescent composite nanoparticles for ultrasensitive human procalcitonin detection // *RSC Adv.* – 2015. – V. 5. – No. 8. – P. 5988-5995.
161. Shao X.-Y., Wang C.-R., Xie C.-M., Wang X.-G., Liang R.-L., and Xu W.-W. Rapid and Sensitive Lateral Flow Immunoassay Method for Procalcitonin (PCT) Based on Time-Resolved Immunochromatography // *Sensors (Basel)* – 2017. – V. 17. – No. 3. – P. 480.
162. Kumar D., Mutreja I., and Sykes P. Seed mediated synthesis of highly mono-dispersed gold nanoparticles in the presence of hydroquinone // *Nanotechnology* – 2016. – V. 27. – No. 35. – P. 355601.
163. Yuan H., Khoury C.G., Hwang H., Wilson C.M., Gran G.A., and Vo-Dinh T. Gold nanostars: surfactant-free synthesis, 3D modelling, and two-photon photoluminescence imaging // *Nanotechnology* – 2012. – V. 23. – No. 7. – P. 75102.
164. Hermanson G.T. *Bioconjugate Techniques (Third Edition)* // NY Acad. Press – 2013.
165. Safenkova I., Zherdev A., Dzantiev B. Factors influencing the detection limit of the lateral-flow sandwich immunoassay: a case study with potato virus X // *Anal Bioanal Chem.* – 2012. – V. 403. – No. 6. – P. 1595-1605.
166. Fu X., Chu Y., Zhao K., Li J., Deng A. Ultrasensitive detection of the β -adrenergic agonist brombuterol by a SERS-based lateral flow immunochromatographic assay using flower-like gold-silver core-shell nanoparticles // *Microchimica Acta* – 2017. – V. 184. – No. 6. – P. 1711-1719.
167. Xu Q. et al. Template-free synthesis of SERS-active gold nanopopcorn for rapid detection of chlorpyrifos residues // *Sensors Actuators B Chem.* – 2017. – V. 241. – P. 1008-1013.
168. Kim C., Song H.-M., Cai X., Yao J., Wei A., and Wang L.V. In vivo photoacoustic mapping of lymphatic systems with plasmon-resonant nanostars // *J. Mater. Chem.* – 2011. – V. 21. – No. 9 – P. 2841-2844.
169. Van de Broek B. et al. Specific cell targeting with nanobody conjugated branched gold nanoparticles for photothermal therapy // *ACS Nano* – 2011. – V. 5. – No. 6. – P. 4319-4328.

170. Dondapati S.K., Sau T.K., Hrelescu C., Klar T.A., Stefani F.D., and Feldmann J. Label-free biosensing based on single gold nanostars as plasmonic transducers // *ACS Nano* – 2010. – V. 4. – No. 11. – P. 6318-6322.
171. James T. H. The Reduction of Silver Ions by Hydroquinone // *J. Am. Chem. Soc.* – 1939. – V. 61. – No. 3. – P. 648-652.
172. Mitamura K., Shimizu H., Yamazaki M., Ichikawa M., Nagai K., Katada J., Wada A., Kawakami C., Sugaya N. Clinical evaluation of highly sensitive silver amplification immunochromatography systems for rapid diagnosis of influenza // *J Virol Methods* – 2013. – V. 194. – No. 1-2. – P. 123-128.
173. Panferov V.G., Safenkova I.V., Byzova N.A., Varitsev Y.A., Zherdev A.V. and Dzantiev B.B. Silver-enhanced lateral flow immunoassay for highly-sensitive detection of potato leafroll virus // *Food and Agricultural Immunology* – P. 1-3.
174. Yang Q. et al. Quantum dot-based immunochromatography test strip for rapid, quantitative and sensitive detection of alpha fetoprotein // *Biosens. Bioelectron.* – 2011. – V. 30. – No. 1. – P. 145-150.
175. Sapountzi E.A., Tragoulias S.S., Kalogianni D.P., Ioannou P.C., and Christopoulos T.K. Lateral flow devices for nucleic acid analysis exploiting quantum dots as reporters // *Anal. Chim. Acta* – 2015. – V. 864. – P. 48-54.
176. Arruebo M., Valladares M., and González-Fernández Á. Antibody-conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications // *J. Nanomater.* – 2009. – V. 2009. – P. 3721-3724.
177. Liškova M., Voračova I., Kleparnik K., Hezinova V., Příkryl J., Foret F. Conjugation reactions in the preparations of quantum dot-based immunoluminescent probes for analysis of proteins by capillary electrophoresis // *Analytical and Bioanalytical Chemistry* – 2011. – V. 400. No. 2. – P. 369-379.
178. Culha M. Surface-enhanced Raman scattering: an emerging label-free detection and identification technique for proteins // *Appl. Spectrosc.* – 2013. – V. 67. – No. 4. – P. 355–364.
179. Vitol E. A., Zulfiya O., Gary F., and Yury G. Nanoprobes for intracellular and single cell surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) // *J. Raman Spectrosc.* – 2012. – V. 43. – No. 7. – P. 817-827.
180. Kim K., Choi J.-Y., Lee H. B., and Shin K. S. Raman scattering of 4-aminobenzenethiol sandwiched between Ag nanoparticle and macroscopically smooth Au substrate: effects of size of Ag nanoparticles and the excitation wavelength // *J. Chem. Phys.* – 2011. – V. 135. – No. 12. – P. 124705.

181. Njoki P.N. et al. Size Correlation of Optical and Spectroscopic Properties for Gold Nanoparticles // J. Phys. Chem. C – 2007. – V. 111. – No. 40. – P. 14664-14669.
182. Driskell J.D., Lipert R.J., and Porter M.D. Labeled gold nanoparticles immobilized at smooth metallic substrates: systematic investigation of surface plasmon resonance and surface-enhanced Raman scattering // J. Phys. Chem. B – 2006. – V. 110. – No. 35. – P. 17444-17451.
183. Hong S. and Li X. Optimal Size of Gold Nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy under Different Conditions // J. Nanomater. – 2013. – P. 1-9.
184. А. Осипов А.П., Григоренко В.Г. and Кондаков С. Э. Тест-система для полуколичественного иммунохроматографического анализа // Пат. РФ № 2510510.
185. Gorovits B.M., Osipov A.P., and Egorov A. M. New immunoassay technique using antibody immobilized on a membrane and a flow cuvette as reaction vessel // J. Immunol. Methods – 1993. – V. 157. – No. 1-2. – P. 11-17.
186. Montagnana M., Trenti T., Aloe R., Cervellin G., and Lippi G. Human chorionic gonadotropin in pregnancy diagnostics // Clin. Chim. Acta – 2011. – V. 412. – No. 17-18. – P. 1515-1520.