

ПЕРМСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

П. В. Храмцов, М. Б. Раев, С. А. Заморина

СТЕРЕОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ
И НЕИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ
В ИММУНОАНАЛИТИКЕ



Пермь 2020

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

П. В. Храмцов, М. Б. Раев, С. А. Заморина

СТЕРЕОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ И НЕИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ В ИММУНОАНАЛИТИКЕ

*Допущено методическим советом
Пермского государственного национального
исследовательского университета в качестве
учебного пособия для студентов, обучающихся
по направлению подготовки магистров
«Биология»*



Пермь 2020

УДК 612.017;612.018;571.27
ББК 28.591: 20.18я73
Х89

Храмцов П. В.

Х89 Стереоспецифические взаимодействия. Инструментальные и неинструментальные методы в иммуноаналитике [Электронный ресурс] : учебное пособие / П. В. Храмцов, М. Б. Раев, С. А. Заморина ; Пермский государственный национальный исследовательский университет. – Электронные данные. – Пермь, 2020. – 6,25 Мб ; 105 с. – Режим доступа: <http://www.psu.ru/files/docs/science/books/uchebnie-posobiya/hramcov-raev-zamorina-stereospecificheskie-vzaimodejstviya.pdf>. – Заглавие с экрана.

ISBN 978-5-7944-3590-0

В пособии рассмотрены базовые принципы разработки, функционирования и оценки диагностических систем, используемых в биомедицине, сельском хозяйстве, пищевой промышленности и ряде других отраслей. Существенное внимание уделено перспективам применения различных наноматериалов для конструирования тест-систем. Учебное пособие предназначено студентам биологического факультета при изучении ими курса «Стереоспецифические взаимодействия».

Ил. 68. Библиогр. 60 назв.

УДК 612.017;612.018;571.27
ББК 28.591: 20.18я73

*Печатается по решению ученого совета биологического факультета
Пермского государственного национального исследовательского университета*

Рецензенты: лаборатория экологической иммунологии «ИЭГМ УрО РАН», г. Пермь (зав. лабораторией д-р мед. наук **К. В. Шмагель**); профессор кафедры факультетской терапии № 2, профпатологии и клинической лабораторной диагностики Пермского государственного медицинского университета им. академика Е. А. Вагнера, д-р мед. наук **Д. Ю. Соснин**

ISBN 978-5-7944-3590-0

© Храмцов П. В., Раев М. Б., Заморина С. А., 2020
© ПГНИУ, 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. Поиск иголки в стоге сена: лабораторная диагностика, аналитика и стереоспецифические взаимодействия.....	5
ГЛАВА 2. Молекулы, способные к стереоспецифическому взаимодействию: Натуральные, полусинтетические и синтетические.....	9
ГЛАВА 3. Виды анализов, основанные на стереоспецифических взаимодействиях.....	26
ГЛАВА 4. Разнообразие диагностических систем на примере иммуноферментного анализа.....	43
ГЛАВА 5. Аналитические характеристики тест-систем.....	64
ГЛАВА 6. Наноматериалы и их применение в лабораторной диагностике.....	70
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	97
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	98
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	99

ВВЕДЕНИЕ

В учебном пособии изложены базовые принципы разработки, функционирования и оценки диагностических систем, которые используются в биомедицине, сельском хозяйстве, пищевой промышленности и ряде других отраслей. Примерами таких тест-систем являются экспресс-тесты на беременность, продающиеся в любой аптеке, тесты на ВИЧ, гепатиты, сифилис, аллергии, которые делают в клинических лабораториях, а также целый ряд тест-систем, использующихся в ветеринарии, при оценке качества пищевых продуктов, научных исследованиях и т. д. Особенностью этих систем диагностики является то, что они основаны на стереоспецифических взаимодействиях, на узнавании целевых молекул другими молекулами или композитами.

Первые два раздела знакомят читателя с понятием о стереоспецифических взаимодействиях, их использовании для разработки систем диагностики, а также в них изложен материал о спектре ключевых молекул, которые способны к стереоспецифическим взаимодействиям. В следующих двух разделах представлено разнообразие форматов современных систем диагностики, включая их преимущества и недостатки. Пятый раздел посвящен оценке эффективности работы тест-систем, а также факторам, которые могут на нее повлиять. В последнем разделе, который носит название «Наноматериалы и их применение в лабораторной диагностике», мы рассмотрели основные типы наноматериалов, которые являются перспективными с точки зрения их использования в тест-системах. Кратко описаны их физико-химические свойства, делающие эти наночастицы привлекательными для практического здравоохранения. Вместе с тем мы выделили факторы, препятствующие быстрому внедрению наноматериалов и их коммерциализации.

В пособии не только описаны принципы функционирования тест-систем и дана их классификация, но и кратко изложены проблемы, которые стоят перед разработчиками тест-систем на пути их внедрения в практику. Пособие предназначено для студентов, слушающих курс «Стереоспецифические взаимодействия» в Пермском государственном национальном исследовательском университете. Для лучшего усвоения материала необходимо знать основы иммунологии и биохимии, а именно разделы, посвященные гуморальному иммунитету и межмолекулярным взаимодействиям.

ГЛАВА 1. ПОИСК ИГОЛКИ В СТОГЕ СЕНА: ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА, АНАЛИТИКА И СТЕРЕОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Зачем и как выявлять нужные молекулы, клетки и вирусы?

В медицине, биотехнологии, сельском хозяйстве и других отраслях существует необходимость оценивать наличие в различных образцах молекул, клеток, вирусов. Для ответа на обычные вопросы – «Чем болен человек?», «Каков риск развития патологии?», «В норме ли уровень гормона?», «Заражен ли картофель вирусом?», «Производят ли бактерии в реакторе достаточное количество белка?» – требуется взять соответствующий образец – несколько миллилитров крови человека, кусочки тканей растений, пробы из среды культивирования бактерий – и провести анализ. В дальнейшем мы будем называть **аналитом** то вещество (соединение), наличие и/или концентрацию которого необходимо установить.

Как было сказано выше, необходимость определения разнообразных аналитов существует в самых различных отраслях деятельности человека. Мы будем уделять внимание прежде всего области клинической лабораторной диагностики, направленной на выявление заболеваний человека и оценку состояния систем его органов с целью профилактики болезней или мониторинга процесса выздоровления. Иногда, тем не менее, мы будем затрагивать аспекты тех или иных видов анализа, которые используются в областях, не связанных с медициной, например пищевой промышленности, мониторинге состояния окружающей среды или сельского хозяйства.

В чем состоит принцип обнаружения аналита в исследуемых образцах? Большинство соединений, с которыми имеют дело лаборатории, не видны невооруженным глазом. Это клетки, вирусы или молекулы, которые имеют размеры менее нескольких микрометров, а зачастую в диапазоне нескольких нанометров. Например, размер сывороточного альбумина, основного белка крови человека, составляет примерно 5 нм. Такие молекулы нельзя увидеть и подсчитать, а значит, надо использовать какие-то другие способы оценки их концентрации и наличия в образце. Стоит учитывать, что большинство исследуемых образцов в меди-

цинской диагностике – это ткани человека, выделения желез, биоптаты. Кровь, слюна, моча, спинномозговая жидкость, смывы со слизистых – вот с чем имеют дело в лабораториях. Каждая из этих сред представляет собой сложную смесь макромолекул, солей, клеток, пигментов и т. д. Таким образом, задача аналитиков зачастую сводится к количественной оценке содержания вещества в сложных смесях, которые, помимо прочих, включают в себя соединения такой же природы, часто обладающие идентичными физико-химическими свойствами. Как же решить эту задачу?

В большинстве случаев для нахождения нужного объекта в массе других необходимы **отличительные признаки** этого объекта. Возьмем в качестве примера задачу обнаружения патогенной бактерии в образцах носоглоточных смывов. Это типичная задача при диагностике заболеваний дыхательных путей. Как узнать, есть ли среди множества клеток носоглоточного смыва, в том числе бактериальных, интересующий нас патоген? Для этого необходимо выяснить – чем этот бактериальный патоген отличается от других компонентов носоглоточного смыва. От мелких молекул и биополимеров, таких как углеводы и белки, он отличается размером. Но в чем его отличие от других бактерий? Этим отличием могут быть особая среда роста, на которой не могут расти другие бактерии (селективная среда), устойчивость к определенным веществам (как вариант селективной среды), особая отличительная форма или цвет образуемых им при росте на питательной среде колоний, по которым можно однозначно определить возбудителя, что может быть использовано, например, для выявления золотистого стафилококка.

Если говорить про молекулы, то и у них могут быть уникальные особенности, например окраска, как у гемоглобина или билирубина, каталитическая активность у ферментов. Используя спектроскопию или оценивая интенсивность ферментативной реакции, можно сделать вывод о наличии и количестве таких белков. Только далеко не все молекулы имеют такие уникальные особенности, присущие только им и никаким другим. Иногда требуется выявить среди массы одинаковых молекул отдельные группы, например, среди всех антител в организме – те, которые специфичны к ВИЧ или бледной трепонеме, для того чтобы определить, болен человек этими заболеваниями или нет. Иногда требу-

ется оценить соотношение изоформ какого-либо белка, которые отличаются друг от друга лишь некоторыми структурными особенностями. Какие методы можно использовать в этом случае?

Отличия в аминокислотной последовательности белков могут быть выявлены при помощи методов протеомики, в частности масс-спектрометрии, однако такой подход едва ли применим в больших масштабах ввиду трудоемкости, сложности и высокой стоимости оборудования. В случаях, когда речь идет о массовом обследовании сотен и даже тысяч пациентов поликлиники в течение пары дней, нужны кардинально иные подходы. Такие подходы существуют, и, более того, они, по сути своей, созданы или вдохновлены самой природой. Основой их являются **стереоспецифические взаимодействия**.

Что такое стереоспецифические взаимодействия?

Стереоспецифические взаимодействия между молекулами обусловлены структурным и пространственным соответствием. Обычно для иллюстрации таких взаимодействий используют пример замка с ключом.

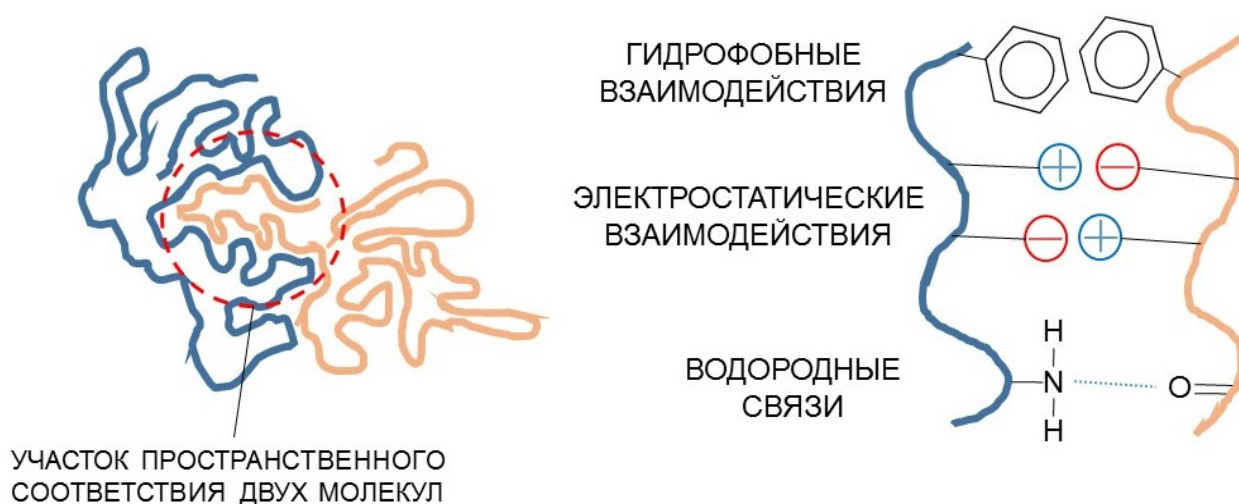


РИСУНОК 1. Пространственное и структурное соответствие двух молекул

Определенные участки двух молекул соответствуют друг другу пространственно, например, имеются соответствующие друг другу углубления и выпячивания на поверхности молекулы. Под структурным соответствием мы понимаем наличие на соответствующих поверхностях дополняющих друг друга функциональных групп (рис. 1), обуславливающих гидрофобные, электростатические и водородные взаимодействия между этими двумя молекулами. Подобные взаимодействия термодинамически выгодны, вследствие чего образуются устойчивые межмолекулярные комплексы. Примерами молекул, способных к стереоспецифическому взаимодействию, огромное количество: это пары гормон-рецептор, фермент-субстрат, антитело-антиген, ДНК-ДНК и многие другие.

С точки зрения анализа наиболее ценно то, что такие взаимодействия могут быть использованы для обнаружения молекул в клинических образцах, поскольку способность стереоспецифически, комплементарно взаимодействовать с другой молекулой – это как раз то самое уникальное отличительное свойство, по которому эту молекулу можно отличить от других. Но у каждой ли молекулы в природе есть такая «пара», с которой они образуют тот самый желанный комплекс? Можно ли найти такую пару, если речь идет не о молекуле, а о бактерии, вирусе или же, наоборот, о чем-то необычайно маленьком, как ионы? Это возможно, если использовать в своих целях комплекс знаний об **иммунной системе** и **эволюции**. В следующей главе мы рассмотрим молекулы, способные к стереоспецифическому взаимодействию и их ключевые свойства.

ГЛАВА 2. МОЛЕКУЛЫ, СПОСОБНЫЕ К СТЕРЕОСПЕЦИФИЧЕСКОМУ ВЗАИМОДЕЙСТВИЮ: НАТУРАЛЬНЫЕ, ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИЕ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ

Моноклональные и поликлональные антитела

Иммунная система высших животных продуцирует антитела в ответ на введение в организм антигенов. Антитела обладают способностью с высокой специфичностью связываться с эпитопами антигенов, реализуя свои защитные функции. Это ключевое свойство антител может быть использовано для разработки различных систем анализа, поскольку есть возможность производить антитела против широкого спектра мишеней, которые являются важными для лабораторной диагностики. Это могут быть белки, гликопротеины, липопротеины, ДНК, низкомолекулярные соединения (стероидные гормоны, пигменты), вирусы и целые клетки. Существенная часть диагностически значимых маркеров относится к перечисленным группам. Как правило, в лабораторной диагностике используются антитела мышей, кроликов, коз, лошадей, крыс, относящиеся к классу IgG.

Выделенные и очищенные антитела могут быть использованы для улавливания и обнаружения целевых антигенов. Для этого достаточно создать такие условия, при которых будет обеспечен контакт между ними. Антитела при этом образуют комплекс с антигеном. Это может происходить как в объеме жидкости, так и в том случае, если антитела или антигены закреплены на какой-либо поверхности.

Отдельный вопрос: а что последует за этим? Как узнать, образовался ли такой комплекс и если да, то сколько их получилось? Как сделать взаимодействие антигена и антитела видимым для человека? В некоторых случаях такие комплексы видны невооруженным глазом, например, если в качестве мишени выступают бактериальные клетки. При их взаимодействии с антителами в физиологическом растворе образуются хорошо различимые глазом пленки или агрегаты. Такой тип анализов называют агглютинационным и используют для идентифика-

ции бактерий, обнаружения антител к бактериям, эритроцитам, а также к антигенам, сорбированным на поверхности крупных частиц. Этот тип анализов будет рассмотрен в главе «

Агглютинационные анализы: агглютинация бактерий, понятие о гомогенном и гетерогенном анализе». Другим подходом является использование **метки** – атома, молекулы или частицы, которые обладают свойствами, позволяющими обнаружить их присутствие и оценить количество визуально либо при помощи специального прибора. Примером такой метки являются окрашенные частицы латекса, которые используются в тестах на беременность (рис. 2).

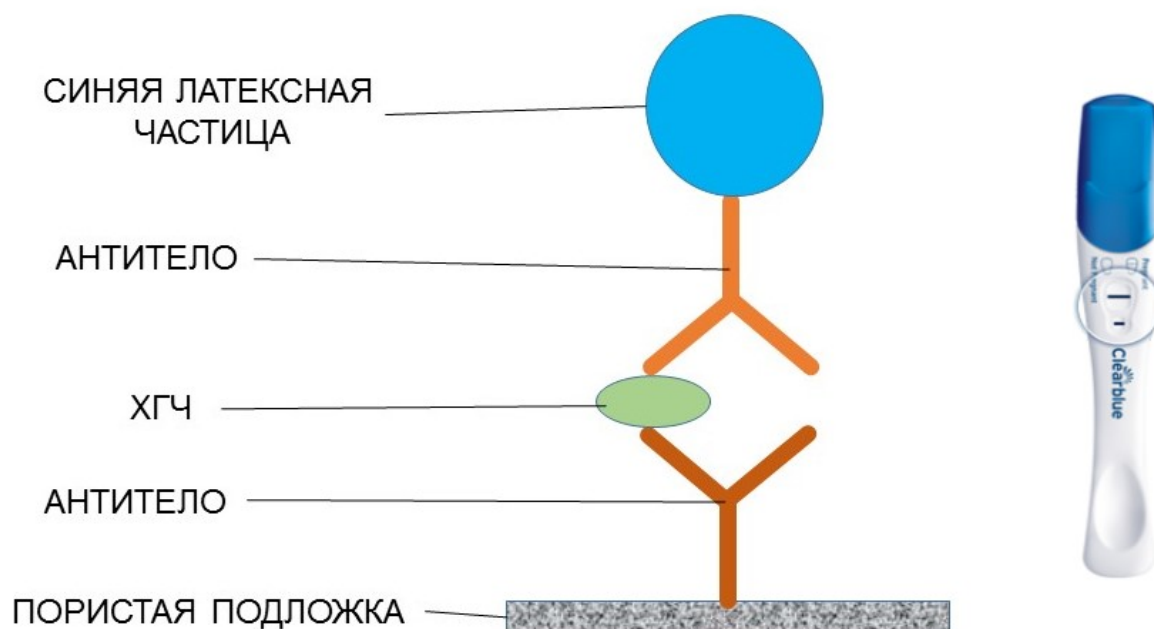


РИСУНОК 2. Комплекс, образующийся на поверхности тест-полоски в ходе теста на беременность. Одно из антител ковалентно прикреплено к ярко окрашенной частице. Справа тест-полоска в пластиковом корпусе с двумя четко различимыми синими полосами в тестовой и контрольной зонах (обведено кружком), ХГЧ – хорионический гонадотропин

Принцип теста заключается в улавливании гормона хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) из образца мочи на поверхности пористой мембраны (см. главу «**Форматы ИФА: дот-иммуноблот (иммуноблот), иммунохроматография, иммунофильтрация**»). Одно из антител закреплено на самой мембране, оно улавливает антиген (ХГЧ), второе прикреплено ковалентно к синей латексной частице. При наличии гор-

мона в образце второе антитело, а вместе с ним и окрашенная частица, свяжутся с ХГЧ, что и приведет к формированию на поверхности мембраны синей полосы. Не будет ХГЧ – не будет и синей полосы. Такие полосы можно увидеть невооруженным взглядом, кроме того, существуют специальные портативные сканеры, которые могут позволить количественно оценить яркость окрашивания синей полосы.

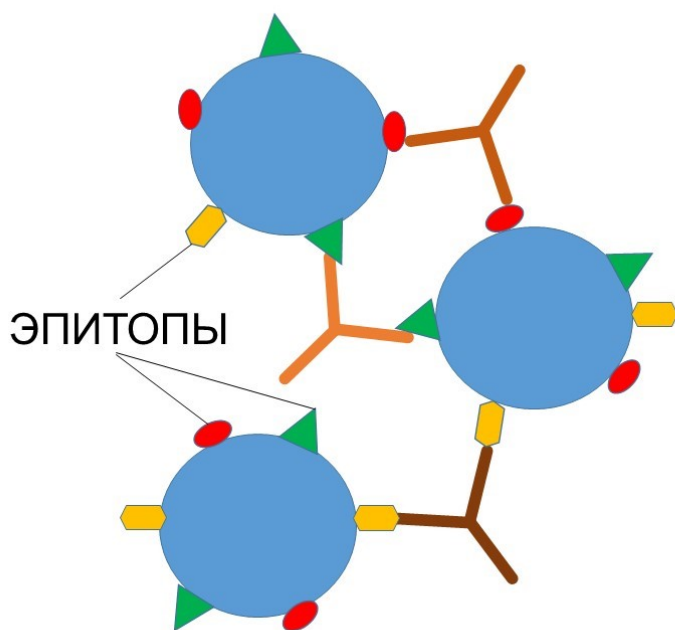


РИСУНОК 3. Агглютинация крупных частиц поликлональными антителами

В настоящее время в большинстве диагностических систем используются моноклональные антитела, чему способствует разработка технологий их массового производства и, как следствие, коммерческая доступность. Их применение позволяет существенно улучшить воспроизводимость и точность анализов ввиду того, что все молекулы обладают идентичной структурой и свойствами. Применение поликлональных антител может быть оправдано в некоторых ситуациях, в частности, при проведении агглютинационных тестов, когда разнообразие паратопов позволяет более эффективно «склеивать» между собой крупные частицы – бактерии, микрочастицы латексов, эритроциты (рис. 3).

Помимо антител, в диагностических системах применяются их фрагменты (рис. 4). Фрагменты антител получают расщеплением отдельных химических связей, пептидных или дисульфидных, при помо-

щи ферментов (пепсина, папаина) или низкомолекулярных химических веществ (цистамина, дитиотреитола, бета-меркаптоэтанола). Фрагменты антител отличаются небольшими размерами, но при этом имеют такую же аффинность, как и интактные антитела. Преимущество их использования состоит в том, что они не взаимодействуют неспецифически с различными факторами сыворотки крови (например, компонентами комплемента) и некоторыми клеточными рецепторами ввиду отсутствия Fc-фрагмента, который и выполняет рецепторную функцию в большинстве случаев. Это позволяет снизить фоновый сигнал, который может быть следствием подобных взаимодействий. В некоторых видах анализа, например основанных на Фёрстеровском резонансном переносе энергии, малый размер аффинных соединений критически важен, поскольку позволяет сократить дистанцию переноса энергии и увеличить интенсивность флуоресценции.

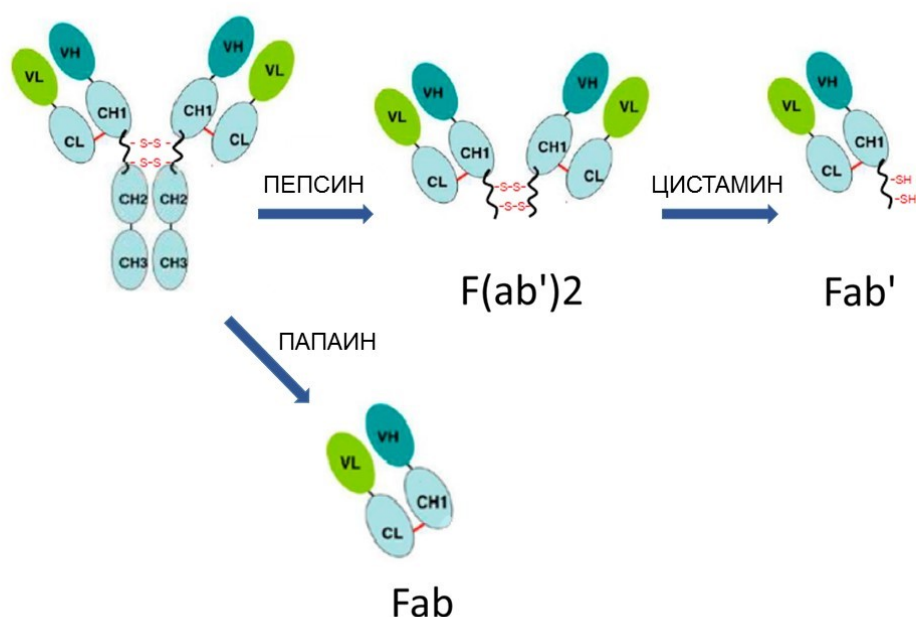


РИСУНОК 4. Фрагменты антител (VH – переменный фрагмент тяжелой цепи, VL – переменный фрагмент легкой цепи, CH_x – константный фрагмент тяжелой цепи, CL – константный фрагмент легкой цепи)

Помимо фрагментов, полученных расщеплением антител, весьма удобно получать рекомбинантные белки, которые содержат необходимые участки антител. Для многих задач клинической лабораторной диагностики, а также терапевтических целей присутствие Fc-фрагмента ан-

тител нежелательно. Иногда от антитела требуется лишь собственно связывание антигена, а для выполнения этой задачи достаточно сохранения лишь тех его участков, которые в этом связывании и принимают участие. Методами генной инженерии можно получить культуры клеток, производящие рекомбинантные фрагменты антител. Одними из них являются одноцепочечные вариабельные фрагменты (ScFv). Они представляют собой полипептидную цепочку, включающую в себя вариабельные фрагменты тяжелой и легкой цепи иммуноглобулинов (рис 5).

Такие полипептидные цепи синтезируют, используя последовательность аминокислот интактного антитела. Однако в нее при необходимости можно вводить точечные изменения, заменяя отдельные аминокислоты в рамочных участках или областях, определяющих комплементарность, для достижения большей аффинности к целевому антигену или снижения перекрестной реактивности к нежелательным антигенам.

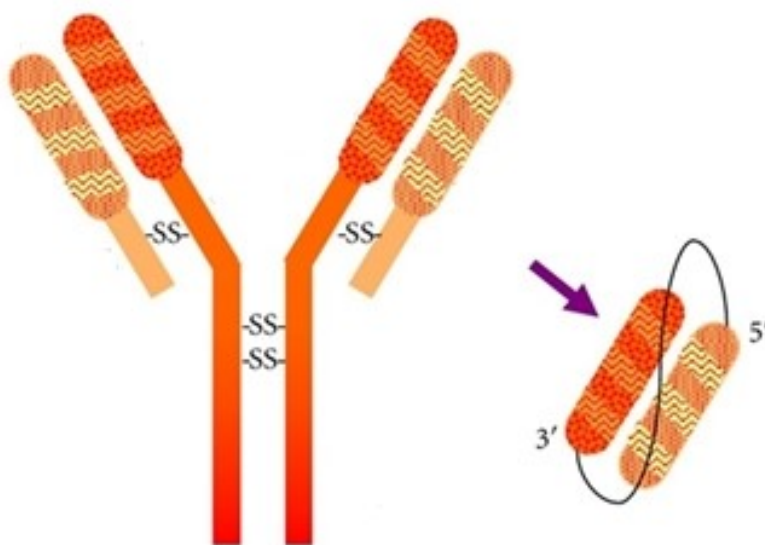


РИСУНОК 6. Одноцепочечный вариабельный фрагмент антител

ДНК, РНК, аптамеры

Одним из наиболее известных примеров стереоспецифических взаимодействий является взаимодействие между цепочками нуклеотидов ДНК и РНК.

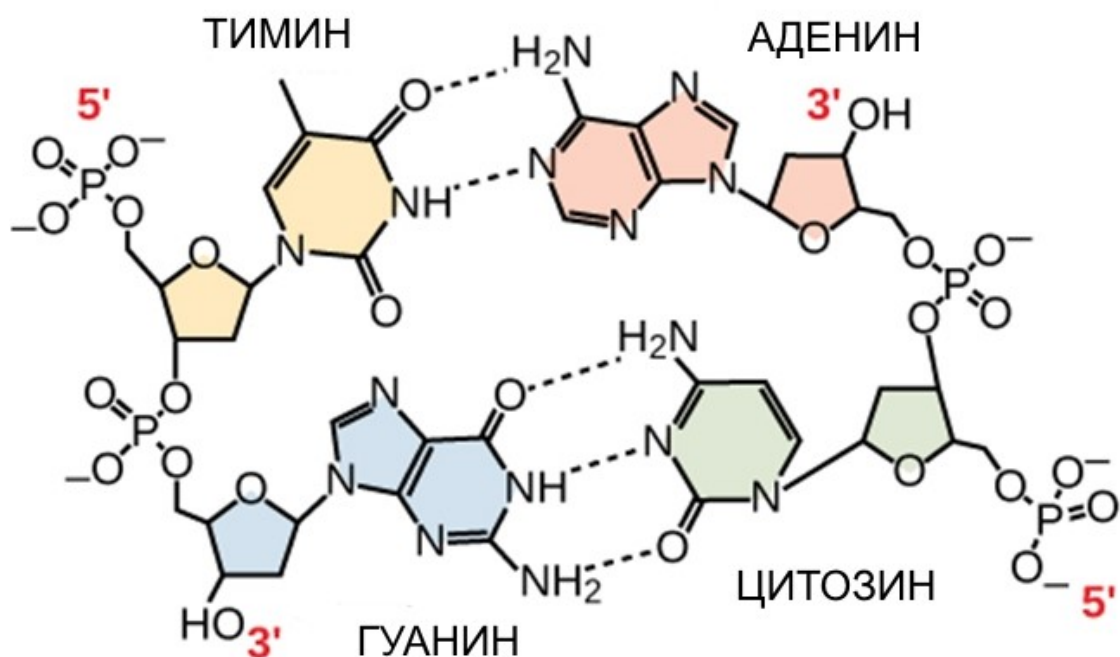


РИСУНОК 7. Водородные связи между азотистыми основаниями нуклеотидов

Цепочки ДНК и РНК взаимодействуют между собой главным образом за счет водородных связей (рис. 7). Комплементарность нуклеотидов используется и в области лабораторной диагностики для обнаружения фрагментов нуклеотидных цепей патогенов (бактерий, вирусов), а также для усиления сигнала при помощи полимеразной цепной реакции или методов изотермической амплификации ДНК.

Особые свойства нуклеиновых кислот, а также специфика методов их синтеза и детекции позволяют создавать на их основе искусственные олигонуклеотидные конструкции, способные к стереоспецифическому взаимодействию с различными мишенями. Такие конструкции называются **аптамерами**.

Аптамер – это одноцепочечный ДНК- или РНК-олигонуклеотид, который способен к стереоспецифическому взаимодействию с молекулой- или клеткой-мишенью. Почему вдруг олигонуклеотиды начинают взаимодействовать с мишенями и откуда они берутся? Для начала вспомним клонально-селекционную теорию. Согласно ей многообразие существующих в организме В-клеточных рецепторов (а стало быть, и антител) обусловлено случайной компоновкой фрагментов ДНК, кодирующих эти рецепторы, а также случайными точечными мутациями этих фрагментов. Одним словом, организм производит огромное разнообра-

зие рецепторов, рассчитывая на то, что при попадании в организм антигена, некоторые из них будут способны с этим антигеном связаться. Кроме того, в ходе созревания аффинности рецепторов при иммунном ответе между В-клетками, несущими разные рецепторы к одному антигену, происходит «борьба за существование»: выживают те, чей рецептор обладает большей аффинностью. Комплекс этих факторов приводит к тому, что плазматические клетки синтезируют пул высокоаффинных антител.

Этот же эволюционный принцип можно воспроизвести и в лабораторной пробирке. Одним из ярких примеров является фаговый дисплей, используемый для создания рекомбинантных антител. По схожему принципу устроено и производство аптамеров. Суть метода состоит в следующем (рис. 8). Синтезируется огромная библиотека ДНК-олигонуклеотидов размером, как правило, в несколько десятков оснований. Часть олигонуклеотидной цепи одинакова для всех последовательностей (используется для посадки праймера в ходе ПЦР-амплификации), другая часть является уникальной для каждой отдельной последовательности. Размер библиотеки может составлять триллионы и более индивидуальных последовательностей.

Смесь олигонуклеотидов инкубируют с мишенью таким образом, чтобы можно было отделить связавшиеся с ней олигонуклеотиды от не связавшихся (например, путем иммобилизации мишени на каком-либо носителе). Среди огромного числа олигонуклеотидов найдутся те, которые будут иметь способность взаимодействовать с мишенью, остальные будут удалены. Связавшиеся последовательности затем отделяют от мишени, амплифицируют при помощи ПЦР и вновь инкубируют с мишенью. После каждого такого цикла оставаться связанными с мишенью, а соответственно «выживать», а не быть удаленными, смогут лишь те последовательности, которые способны обеспечивать большую аффинность взаимодействия с мишенью в сравнении с другими олигонуклеотидами. После нескольких таких циклов отбора связанными с мишенью будут лишь несколько десятков последовательностей с наибольшей аффинностью. Их последовательность будет определена при помощи секвенирования. Именно так реализуется эволюционный принцип применительно к олигонуклеотидам, чем обусловлено название метода – *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment* – систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении (SELEX).

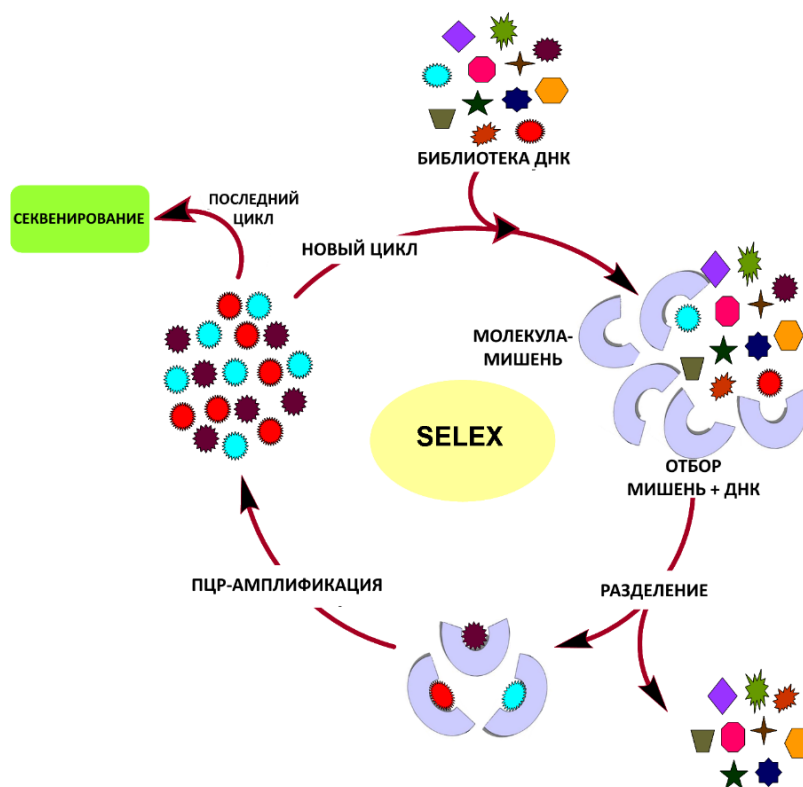


РИСУНОК 8. Систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении (SELEX)

Отбор ограниченного числа последовательностей не является окончанием процедуры создания аптамеров. В дальнейшем производится оптимизация и совершенствование выделенных олигонуклеотидов, что отчасти напоминает созревание аффинности антител [Wang, 2019]. Для этого синтезируются олигонуклеотиды, несущие единичные отличия в нуклеотидной последовательности, оценивается влияние таких «мутаций» на их аффинность, оценивается влияние различных участков последовательности на связывание с мишенью. В структуру могут вводиться неканоничные нуклеотиды, химически модифицированные нуклеотиды, что снижает чувствительность олигонуклеотидов к разрушительному действию нуклеаз. Модифицированные нуклеотиды увеличивают разнообразие олигонуклеотидов, повышая способность их вторичной и третичной структуры «адаптироваться» к структуре мишени, что создает дополнительные условия для увеличения аффинности. Для оценки влияния различных точечных замен олигонуклеотидов на взаимодействие с мишенью иногда используют методы компьютерного моделирования, что упрощает и удешевляет экспериментальную часть работы по созданию аптамеров.

Дополнительной опцией является негативная селекция олигонуклеотидов, при которой из пула последовательностей-кандидатов удаляются те, которые взаимодействуют с нежелательной мишенью. Так, например, если разработчик хочет получить олигонуклеотид, способный связываться с определенным рецептором опухолевой клетки, но не способный взаимодействовать с рецептором здоровых клеток, он может проинкубировать кандидатные последовательности с носителем, на котором закреплен рецептор здоровых клеток. При этом все связавшиеся последовательности следует отбросить, а несвязавшиеся оставить для дальнейшей оптимизации. Это напоминает этап негативной селекции Т- и В-клеток, специфичных к аутоантигенам.

Установлено, что взаимодействие аптамеров с молекулами-мишенями обусловлено тем же набором химических связей, которые участвуют в образовании комплексов «антиген – антитело», – водородных, гидрофобных, электростатических [Ren, 2017; Vu, 2018]. Особенностью аптамеров является сильный отрицательный заряд, а также большое количество гидрофобных азотистых оснований. Структура аптамеров менее разнообразна в сравнении с белками, что обусловлено меньшим числом и разнообразием нуклеотидов по сравнению с аминокислотами [Nasegawa, 2016]. Существуют различные виды вторичной структуры аптамеров – шпильки, псевдоузлы и др. (рис. 9). Самой необычной, пожалуй, является структура G-квадруплексов, которые стабилизированы водородными связями между четырьмя гуанинами, находящимися в одной плоскости. Для стабилизации G-квадруплексов требуются катионы металлов.

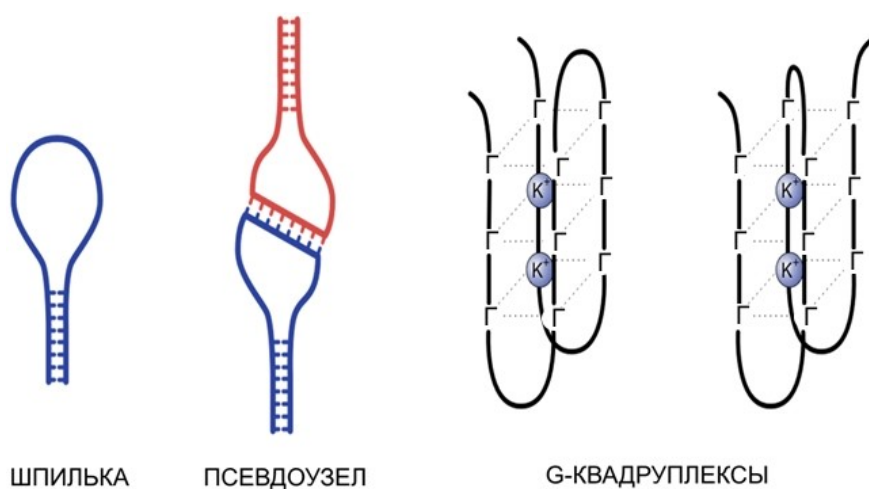


РИСУНОК 9. Различные типы вторичной структуры олигонуклеотидов

В качестве примера можно отметить два аптамера, которые наиболее часто используются в разработке новых методов анализа в качестве моделей, – аптамеры, специфичные к тромбину. Они содержат 15 и 29 нуклеотидов (рис. 10), каждый имеет в своем составе по две тетрады гуанинов. Эти аптамеры способны одновременно связываться с молекулой тромбина, не мешая друг другу («Форматы ИФА: прямой, непрямой, сэндвич-анализ, анализ с двойным антигеном, анализ с улавливанием антител»).

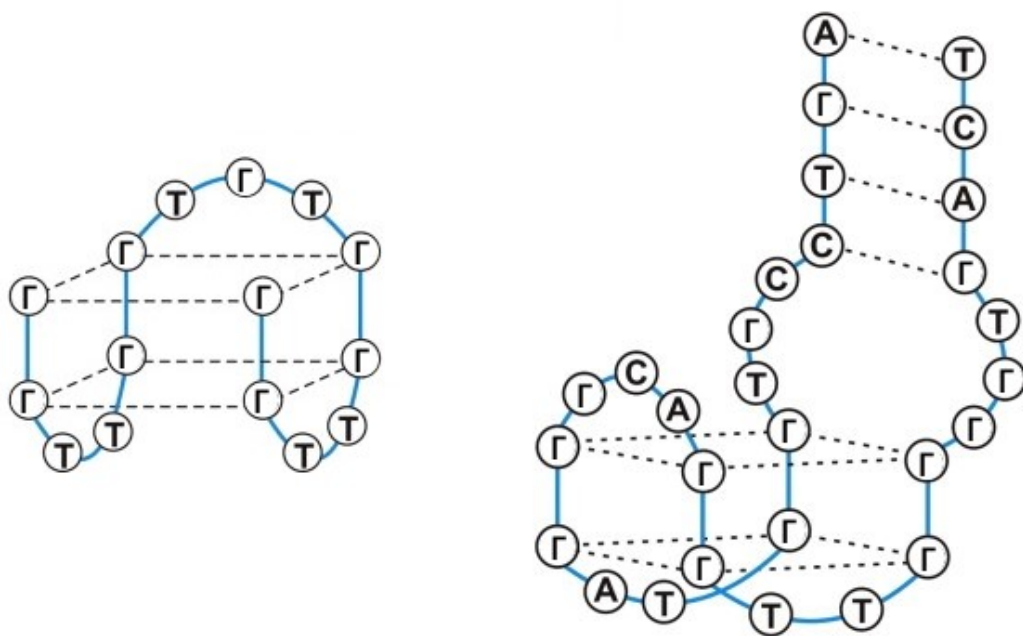


РИСУНОК 10. Вторичная структура двух аптамеров, специфичных к тромбину [Deng, 2014]

Какие у аптамеров есть преимущества и особенности? Аптамеры являются более стабильными, чем антитела, они выдерживают нагревание и восстанавливают свою структуру при охлаждении. Стоит отметить при этом, что присутствие ДНКаз и РНКаз может привести к деградации аптамеров. Для удаления этих ферментов используют физико-химические методы, например прокалывание посуды и различные ингибиторы. Аптамеры можно синтезировать в существенных количествах химическим путем без использования живых организмов, и технологии их крупномасштабного синтеза совершенствуются. Это обуславливает более низкую себестоимость производства, лучшую воспроизводимость от партии к партии в сравнении с антителами. Аптамеры можно модифицировать флуоресцентными красителями и другими низкомолекулярными метками (биотин, дигоксигенин) непосредственно в ходе их

синтеза [Trausch, 2017]. Кроме того, аптамеры могут быть получены к токсичным и неиммуногенным мишеням, например низкомолекулярным соединениям, углеводам, липидам и даже ионам.

Молекулярно импринтированные полимеры

Молекулярно импринтированные полимеры (МИП) – это полимеры, которые обладают способностью к стереоспецифическому распознаванию мишеней. Они являются еще одним шагом на пути к созданию полностью искусственных аналогов антител, которые с одной стороны способны взаимодействовать с целевыми молекулами, а с другой не требуют использования биомолекул и живых организмов. Цель перехода к полностью химическим распознающим элементам – снижение стоимости, упрощение масштабирования, ускорение синтеза, расширение числа потенциальных мишеней.

По сути своей МИП – это полимерные аналоги антител. Но почему вдруг полимер становится способным связывать различные мишени? Все дело в самой процедуре его синтеза (рис. 11). Типичная процедура синтеза полимера представляет собой сшивку молекул-мономеров. Если в процессе формирования полимера добавить к смеси мономеров низкомолекулярное соединение (например, антибиотик, витамин и т. п.), то он будет заключен внутрь этого полимера. Если это соединение удалить из толщи полимера, например при помощи подходящего растворителя, то в полимере останутся полости, которые по своей форме будут являться как бы слепами, отпечатками удаленной молекулы.

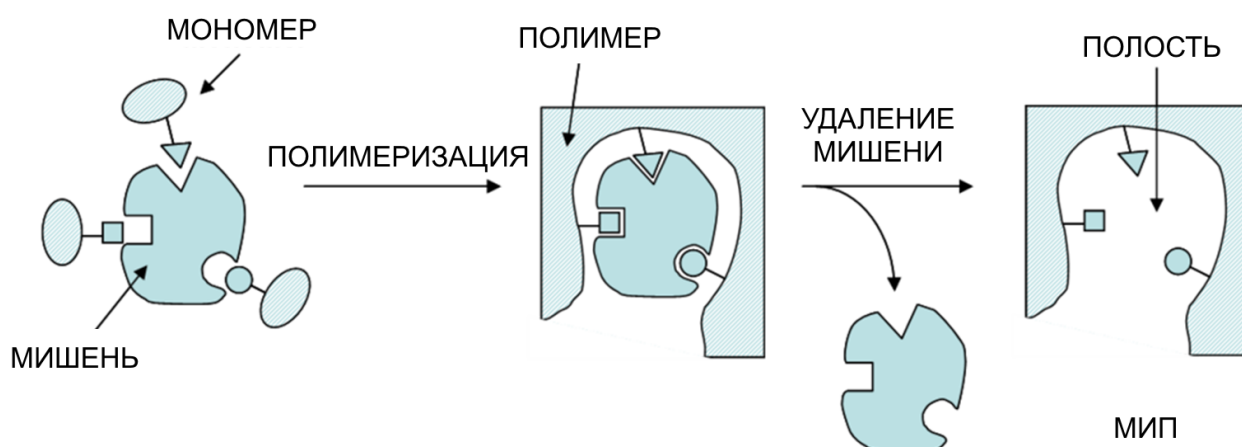


РИСУНОК 11. Принцип синтеза МИП

Ключевая особенность синтеза МИП как раз-таки и состоит в формировании описанных полостей. Поскольку такие полости являются своеобразными «отпечатками» импринтированных молекул, то и сродство к таким молекулам у этих полостей (а значит, и у полимера в целом) будет выше, в сравнении со сродством к другим молекулам. Это сравнимо с тем, как застывают отпечатки ног на бетоне. Человек, ступивший на сырой бетон, с легкостью сможет ступить в свой же уже высохший след. Другой человек, у которого больше размер ноги, другая форма обуви, если и сделает это, то с большим трудом.

Наиболее часто в качестве мишеней при создании МИП используются низкомолекулярные вещества (витамины, стероидные гормоны, сахара). Синтез МИП для обнаружения белковых молекул затруднен по ряду причин:

1. Изменение структуры белков в полимерной массе по сравнению с нативным состоянием, что приводит к образованию полостей, которые не могут связать нативный белок.

2. Большой размер белковых молекул является препятствием для их диффузии в толщу полимера, затрудняя вымывание в ходе синтеза и связывание в процессе эксплуатации МИП.

3. Большинство МИП – гидрофобные полимеры, для синтеза которых требуются условия (органические растворители, присутствие некоторых молекул), которые разрушают белки, вызывают их денатурацию [Ansari, 2019].

Существуют различные способы преодоления перечисленных трудностей. Отметим лишь один из них – импринтинг эпитопов (рис. 12). По аналогии с антителами, которые распознают лишь ограниченный участок антигена (паратоп), создаются МИП, способные распознавать лишь часть белковой молекулы. Для этого используется небольшой фрагмент полипептидной цепи целевого белка-мишени. Этот фрагмент может быть синтезирован химическим путем благодаря тому, что разработаны специальные приборы для синтеза олигопептидов и существуют фирмы, которые синтезируют такие пептиды на заказ. При синтезе МИП не целый белок, а лишь его фрагмент используется в качестве шаблона. После удаления пептида МИП становится способным связывать целый белок.

Основные особенности МИП:

1. Физико-химическая стабильность.
2. Низкая стоимость.
3. Большое разнообразие потенциальных мишеней.
4. Возможность адаптировать материал полимера под конкретные задачи.
5. Возможность синтеза больших партий.
6. Участки связывания мишени формируются случайно, а значит, свойства МИП могут варьировать от партии к партии.

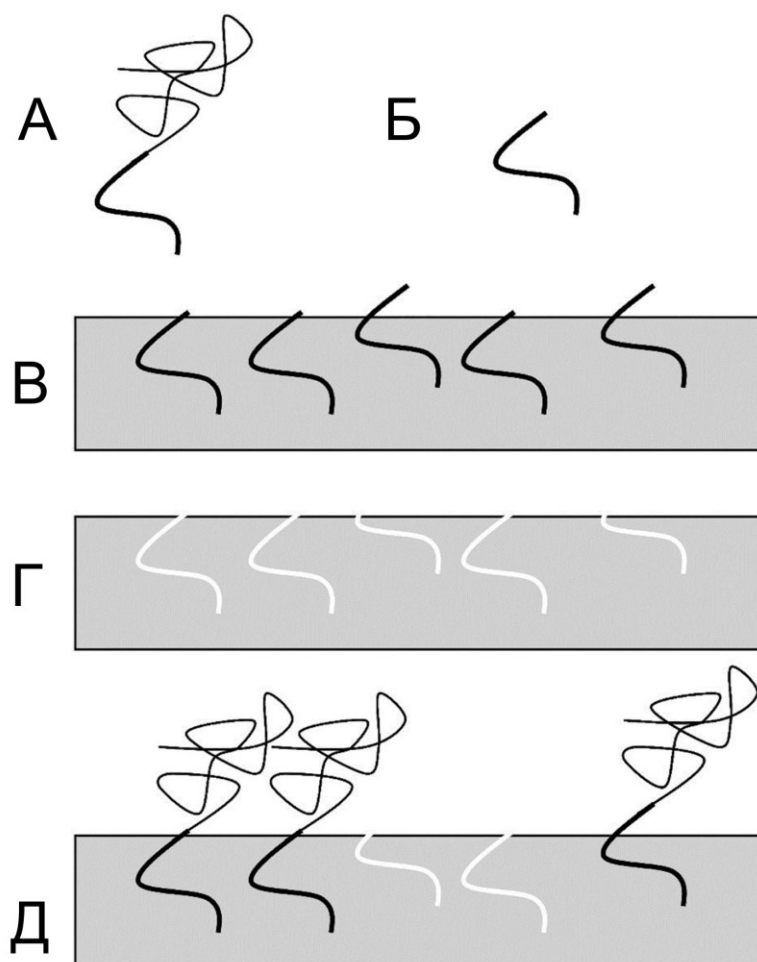


РИСУНОК 12. Импринтинг эпитопов. А – белок-мишень, Б – пептидный фрагмент белка-мишени, В – импринтинг, Г – удаление шаблонов, Д – взаимодействие МИП и белка-мишени [адаптировано из Ansari, 2019]

Бактериальные белки: авидин, стрептавидин, нейтравидин, белки A, G, L

Авидин – это гликопротеин из белка куриных яиц с молекулярной массой 66 кДа, который обладает способностью с высокой аффинностью связывать биотин (витамин Н). Эта связь является одним из самых прочных нековалентных взаимодействий в природе. Она не разрушается полностью даже при воздействии высоких температур, кислот, щелочей и детергентов. Витамин Н представляет собой низкомолекулярное соединение, которое можно условно разделить на 2 части – уреидное кольцо и остаток валериановой кислоты (рис. 13). Часть, содержащая гетероциклы, взаимодействует с авидином, в то время как кислотный остаток может быть подвергнут химической модификации без снижения аффинности по отношению к авидину.

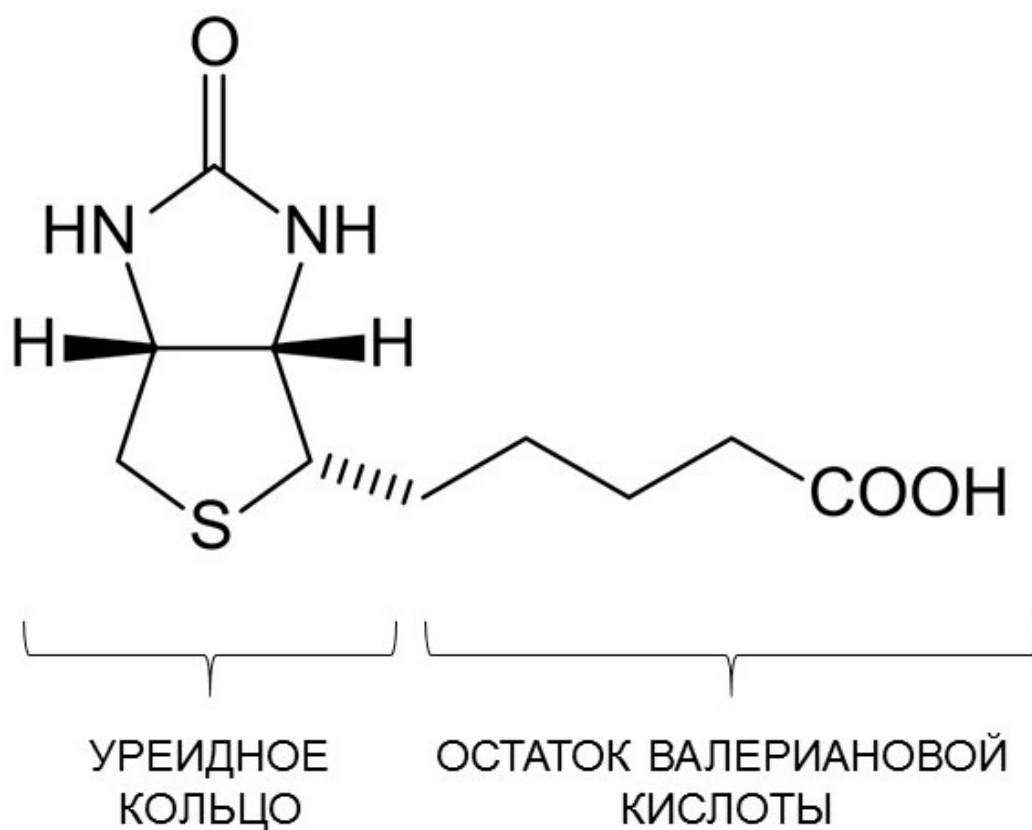


РИСУНОК 13. Структура биотина

Каждая молекула авидина может связать четыре молекулы биотина (по одному на каждую из 4 субъединиц). Комплексы авидина и биотина могут использоваться для создания сложных белоксодержащих конструкций, полимеров, усиления сигнала в иммуноанализах и других целей. Однако в практике чаще используются другие биотинсвязывающие белки – нейтравидин и стрептавидин. Причина этого кроется в некоторых фундаментальных недостатках авидина, а именно высокой основности белка и наличии большого количества углеводных остатков, которые обуславливают его неспецифические взаимодействия с различными молекулами.

Нейтравидин представляет собой химически дегликозилированный вариант авидина, его масса составляет около 60 кДа. Стрептавидин – это белок, выделенный из бактерий *Streptomyces avidinii*, с молекулярной массой около 52 кДа. Как и авидин, он имеет тетрамерную структуру и связывает 4 молекулы биотина, однако по аминокислотному составу эти белки сильно отличаются. Несмотря на это, его аффинность по отношению к биотину столь же высока, но при этом стрептавидин не несет углеводных остатков. Далее мы будем рассматривать то, как используется уникальная способность авидина и его аналогов связывать биотин на примере стрептавидина.

Как уже было сказано выше, остаток валериановой кислоты биотина не принимает участия во взаимодействии со стрептавидином, следовательно, он может быть подвергнут химической модификации. Эта особенность позволяет использовать биотин в качестве низкомолекулярной метки.

При помощи биотина в иммуноанализе можно усиливать сигнал, который генерируется разнообразными метками. Наиболее часто это используют в сэндвич-анализе («**Форматы ИФА: прямой, непрямой, сэндвич-анализ, анализ с двойным антигеном, анализ с улавливанием антител**»). Одни антитела из пары ковалентно конъюгируют с биотином. К одной молекуле антител может быть прикреплено несколько молекул биотина. Затем добавляют раствор стрептавидина, к которому ковалентно прикреплена метка (флуоресцентная, ферментная или любая другая). В качестве альтернативы используют антитела, которые напрямую мечены такой же меткой (рис. 14). При использовании биотинилирован-

ных антител сигнал будет выше, чем при использовании альтернативного подхода. Молекула стрептавидина может быть использована как связующее звено между двумя биотинилированными молекулами, например антитела и ферментной метки. Такие сложные молекулярные комплексы также находят применение в иммуноанализе. Биотин может быть введен в состав аптамеров непосредственно в процессе их синтеза, что позволяет использовать комплексы стрептавидина с различными метками для детекции таких аптамеров.

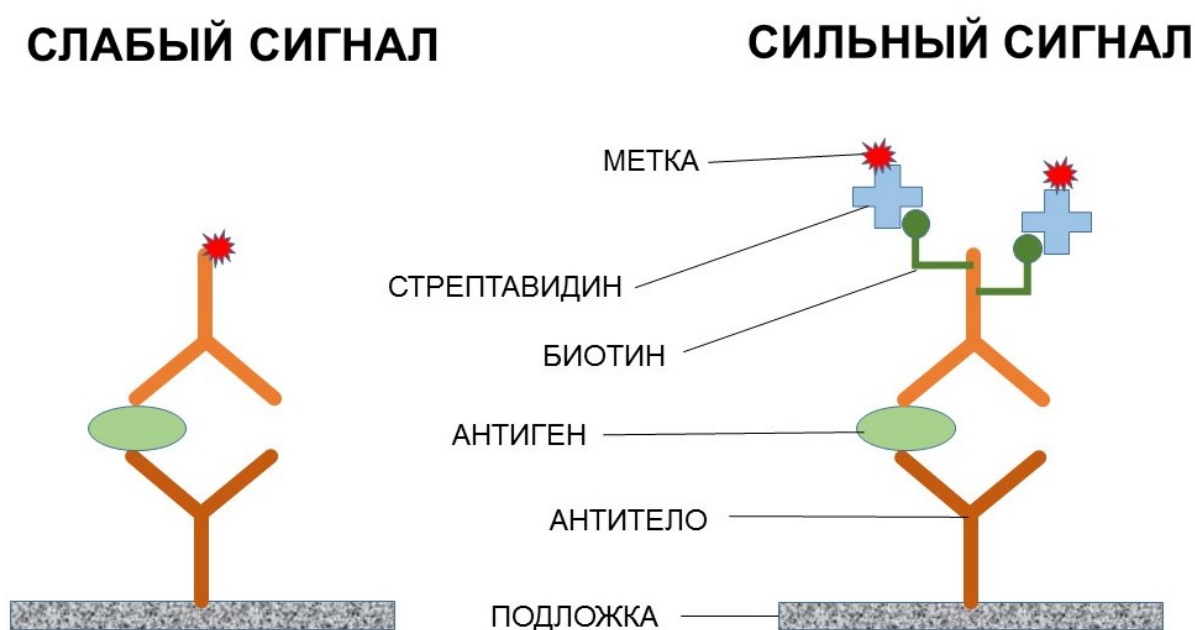


РИСУНОК 14. Использование биотинилированных антител для усиления сигнала в иммуноанализе

Помимо аналогов авидина, существуют другие бактериальные белки с еще одним весьма привлекательным свойством, а именно способностью связывать иммуноглобулины человека и ряда высших животных. К ним относятся белки А, G и L.

Белок А продуцирует золотистый стафилококк *Staphylococcus aureus*. Белок G выделяют из стрептококков группы G. Бактерии *Peptostreptococcus magnus* способны производить белок L (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1

Сравнение свойств Ig-связывающих белков. Жирным шрифтом выделены участки приоритетного связывания [Choe, 2016]

Белок	Масса	Мишень
Белок А	42 кДа	Fc , Fab
Белок G	30 кДа	Fc , Fab, ScFv
Белок L	76–106 кДа	Fab , ScFv

Белки А, G и L связываются с различными участками молекул иммуноглобулинов (рис. 15). Белки А и G взаимодействуют прежде всего с Fc-фрагментами антител, белок L – с каппа-цепью.

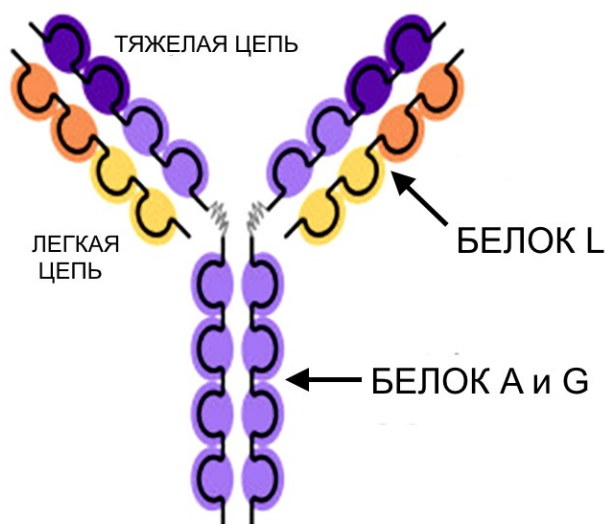


РИСУНОК 15. Области связывания белков А, G и L с иммуноглобулинами

Существуют различные рекомбинантные аналоги Ig-связывающих белков, которые обладают существенными преимуществами по сравнению со своими предшественниками – большей аффинностью, стабильностью, способностью избирательно связываться только с определенным участком иммуноглобулинов и т. д.

ГЛАВА 3. ВИДЫ АНАЛИЗОВ, ОСНОВАННЫЕ НА СТЕРЕОСПЕЦИФИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ

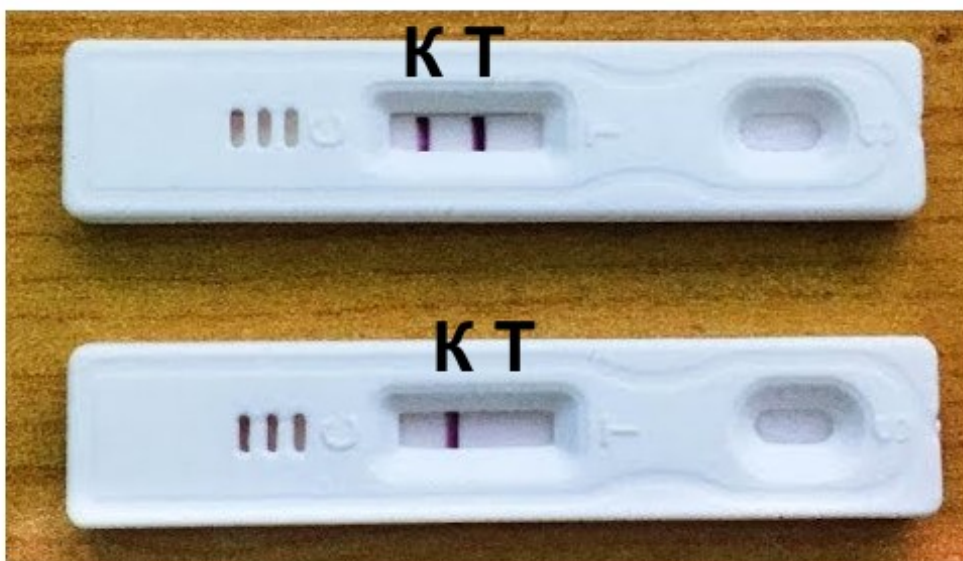
Качественные, количественные и полуколичественные анализы

Анализы, основанные на стереоспецифических взаимодействиях, невероятно разнообразны и многогранны. Они используются в самых различных областях – ветеринарии, сельском хозяйстве, пищевой промышленности, медицине, на фармацевтических и биотехнологических производствах. Существует множество вариантов таких анализов, отличающихся по своему принципу, длительности, способу постановки. Они могут быть реализованы в виде тест-полосок, миниатюрных чипов, громоздких тест-наборов, требующих множества манипуляций. Некоторые из них более точные, некоторые менее, некоторые дают результат за считанные минуты, другие за несколько часов или даже суток. Мы не будем рассматривать полную классификацию анализов в этом пособии, поскольку она достаточно громоздка. Вместо этого мы поступим по-другому: классификацию анализов по различным признакам мы изучим на конкретных примерах, наиболее удобных для этой цели.

Тем не менее классифицировать анализы по одному из признаков мы посчитали нужным в самом начале раздела. Этот признак – результат анализа. По своему результату анализы делятся на качественные, количественные и полуколичественные.

В ходе анализа иногда требуется лишь выяснить, присутствует ли целевое вещество или организм (например, патогенные бактерии, грибки или вирусы) в тестируемом образце в неопределенной концентрации. Такие анализы называют качественными. Их результатом является ответ «да, присутствует» либо «нет, отсутствует». Типичным примером такого анализа является тест на беременность (рис. 16). Он состоит в том, чтобы оценить, превышает ли уровень гормона хорионического гонадотропина человека в моче уровень в 0,025 международных единиц на миллилитр (25 мМЕ/мл). Если уровень гормона выше, то на тест-полоске появится полоса в тестовой зоне, если ее нет – значит тест отрицательный.

ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ ТЕСТ



ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ ТЕСТ

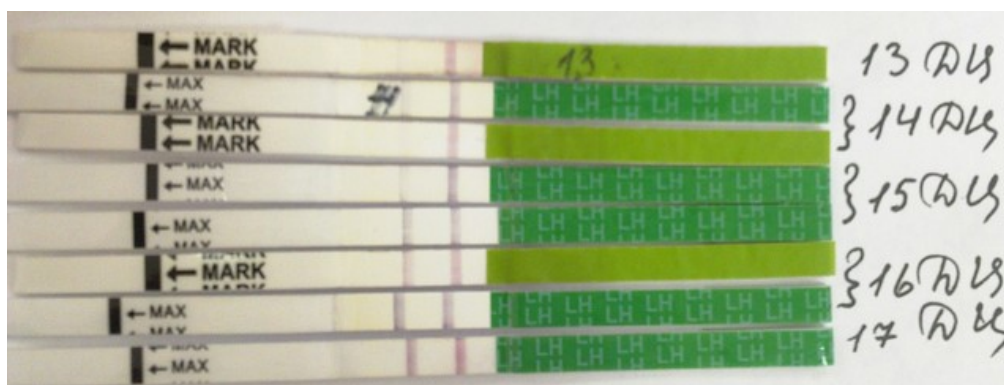
РИСУНОК 16. Тесты на беременность. К – контрольная зона, Т – тестовая зона

В тех случаях, когда необходимо узнать точное количество аналита в образце, пользуются количественными анализами. Как правило, в количественных анализах присутствуют калибровочные образцы, содержащие известные концентрации аналита. Каждый из таких калибраторов тестируется параллельно с неизвестными образцами, а затем сигнал, который генерируют неизвестные образцы, сравнивается с сигналом, который генерируют калибраторы. Для количественной оценки требуется построение графика (рис. 17), отражающего зависимость между концентрацией аналита и сигналом, полученным в анализе, – флуоресценцией, окрашиванием раствора, интенсивностью окрашивания цветных полосок и т. д.



РИСУНОК 17. Общий вид типичной калибровочной кривой в иммуноанализе, Y – сигнал, полученный при анализе образца, X – концентрация аналита в образце, соответствующая сигналу

Еще одним вариантом являются полуколичественные анализы. В этих анализах результат выражается в виде условных единиц («мало», «много», «очень много»). Отличным примером такого теста является тест на овуляцию, который используют при планировании беременности. Этот тест направлен на выявление пика концентрации лютеинизирующего гормона в моче в течение менструального цикла. Пик концентрации лютеинизирующего гормона свидетельствует об овуляции. Тесты на овуляцию принципиально реализованы так же, как и тесты на беременность. Разница состоит в том, что при проведении теста на беременность степень окрашивания полоски не имеет значения, важен сам факт наличия окрашивания. При тесте на овуляцию возрастание концентрации гормона в моче приводит к тому, что все больше его молекул связывается с антителами, сорбированными на пористую подложку (рис. 18). Таким образом, количество вторых антител, меченных окрашенными частицами, которые связались с гормоном, тоже увеличивается («Диагностические реагенты, в которых наночастицы используются как носители метки и распознающих молекул»). Это приводит к постепенному возрастанию интенсивности окрашивания в тестовой зоне, которое достигает максимума при овуляции.



Т К

РИСУНОК 18. Увеличение интенсивности окрашивания тестовой зоны тест-полоски в ходе менструального цикла (с 13-го по 17-й день цикла (ДЦ)). Т – тестовая зона, К – контрольная зона

Полуколичественные тесты позволяют производить примерную визуальную оценку количества аналита в образце. В некоторых случаях для большего удобства и точности к тесту прилагаются эталонные образцы, сравнивая результат теста с которыми, можно более правильно оценить результат (рис. 19).

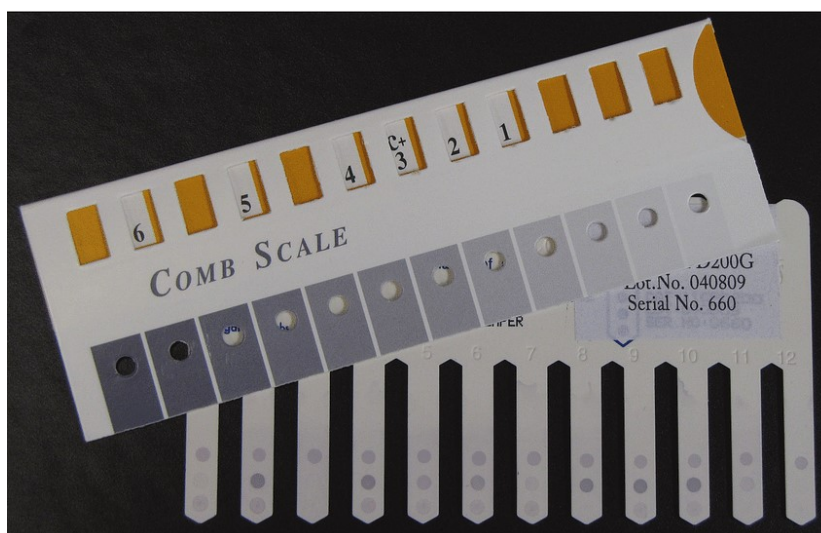


РИСУНОК 19. Гребенка для диагностики некоторых заболеваний кошек. Каждый зубец гребенки является тест-полоской для анализа одного образца. Наличие и интенсивность окрашивания точек позволяют оценить наличие или отсутствие заболевания. К гребенке приложен эталон, позволяющий более точно оценить окрашивание точек

В некоторых случаях для повышения объективности качественных и полуколичественных тестов можно использовать измерительные приборы, например фотометры, сканеры, смартфоны. Такие приборы позволяют быстро оценить интенсивность окрашивания раствора или тест-полоски и выдать результат в виде числового значения. Преимуществом их является большая точность анализа, независимость от исполнителя, но при этом сам процесс анализа усложняется и удлиняется. Кроме того, измерительный прибор и программа для обработки данных могут иметь достаточно высокую стоимость. Именно стремление сделать тест-системы **неинструментальными** заставляет разработчиков использовать цветные эталонные образцы и другие способы упрощения количественной детекции. Еще одним преимуществом неинструментальных анализов является их независимость от работоспособности прибора. Измерительное оборудование может выйти из строя, лишиться источника питания.

Количественные тесты являются **инструментальными**, поскольку уровень аналитического сигнала нужно выразить в виде чисел, чтобы построить калибровочную кривую и вывести уравнение, которое ее описывает. В дальнейшем это уравнение используется для расчёта концентрации аналита в образце. Инструментальные анализы требуют наличия прибора (рис. 20) и, как правило, проводятся в специализированных лабораториях (клинические лаборатории в медицинских центрах, лаборатории на производстве). Обычно в лабораториях имеется комплекс приборов, который позволяет автоматизировать и упростить не только процесс собственно оценки сигнала в анализе, но и промежуточных этапов – подготовки образцов, промывок, дозирования, титрования. Существуют целые аппаратные комплексы, которые требуют минимального участия исполнителя анализа. Такие меры позволяют обеспечить высокую пропускную способность (количество анализов в единицу времени), точность и воспроизводимость (меньшая зависимость от умений и особенностей работы исполнителя). Последнее всегда стоит принимать во внимание, поскольку даже самый лучший и оптимизированный анализ может дать разные результаты с одними и теми же образцами, когда его выполняют разные люди.



РИСУНОК 20. Спектрофотометр, предназначенный для количественной оценки результатов иммуноанализа, основанного на цветной реакции. Реакция протекала в лунках пластикового планшета, в лунках можно заметить синий продукт, концентрацию которого оценивает прибор. Концентрация синего продукта отражает интенсивность реакции, а значит позволяет судить о концентрации аналита

Нечувствительность анализов к таким факторам, как индивидуальные особенности образцов, колебания температуры и освещенности помещения, особенности работы оператора, является очень важной. Разработка и оптимизация метода производятся в условиях строгого контроля и четкого следования всем необходимым процедурам, начиная от подготовки посуды, заканчивая непосредственно измерениями. Когда этот же анализ начинает применяться массово, особенности организации работы в каждой отдельной лаборатории могут существенно отличаться от тех, в рамках которых этот анализ был разработан. Даже в клинических лабораториях не всегда строго исполняются все рекомендации, касающиеся проведения анализа, и сложно представить, что такое положение вещей когда-либо изменится.

Агглютинационные анализы: агглютинация бактерий, понятие о гомогенном и гетерогенном анализе

Одним из способов диагностики заболеваний, вызванных бактериями, является обнаружение в крови антител, специфичных к этим бактериям. Как правило, диагностическим критерием является нарастание концентрации антител, свидетельствующее о развивающемся иммунном ответе. Задача обнаружения антител, специфичных к антигенам бактерий, возникает и при оценке поствакцинального иммунитета у человека. Такую оценку проводят при мониторинге эффективности вакцин, а также в эпидемических очагах для выявления лиц с недостаточным уровнем защиты.

Если сыворотку или плазму крови человека, содержащую антитела к определенной бактерии, смешать с взвесью этих бактерий, то множество бактерий окажутся «склеенными» между собой благодаря тому, что разные паратопы одного и того же антитела будут взаимодействовать с эпитопами, находящимися на поверхности разных бактерий (рис. 21). При этом чем выше валентность антител, тем более эффективным будет такое склеивание. Сам процесс склеивания называют агглютинацией.

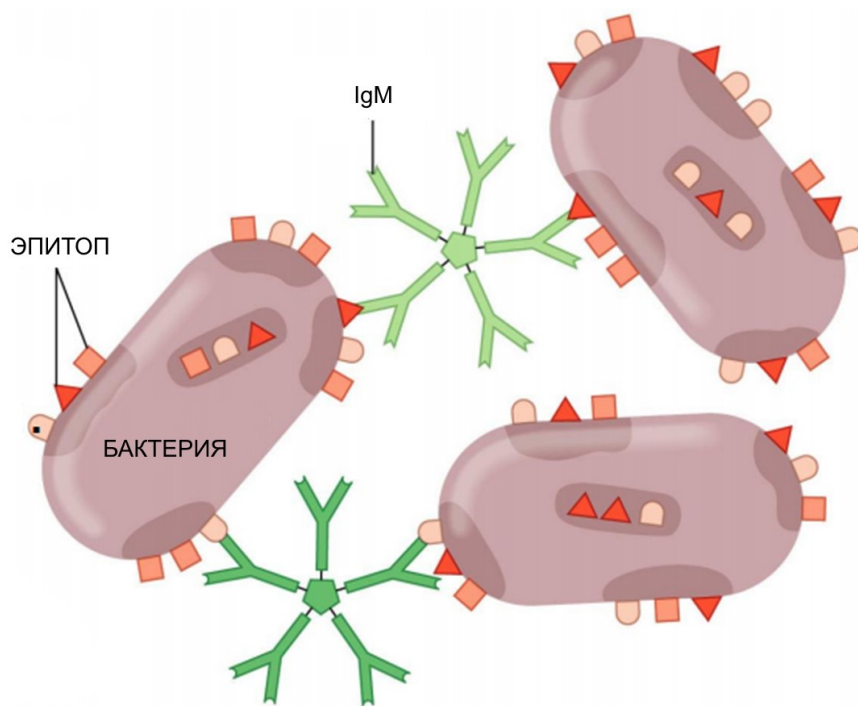


РИСУНОК 21. Агглютинация бактерий иммуноглобулинами класса М

Как феномен агглютинации используется в диагностике? Агглютированные бактерии образуют пленку, которая остается плавать на поверхности раствора, либо слипаются в хлопья, которые быстро выпадают в осадок, в то время как одиночные бактерии медленно оседают на дно (рис. 22). Для оседания бактерий требуется обычно около суток.



РИСУНОК 22. Агглютинация бактерий сывороткой крови в различных разведениях. В пробирках с большой концентрацией антител быстро сформировались хлопья из слипшихся бактерий. В остальных видна мутная взвесь свободно плавающих бактерий. Через некоторое время эти бактерии тоже осядут на дно пробирки

Агглютинационный анализ можно реализовать не только в качественном, но и полуколичественном варианте. Полуколичественный анализ используют для того, чтобы приблизительно оценить содержание антител в сыворотке. Для этого готовят серию разведений (титрование) исследуемого образца сыворотки или плазмы крови. Обычно разведение в такой серии кратно двум, т. е. 1:2; 1:4 и т. д. К разведенным образцам добавляют одинаковое количество бактериальных клеток. В некоторых образцах концентрация антител после разведения становится

настолько низкой, что их становится недостаточно для агглютинации. Чем выше концентрация антител в исходном образце, тем большее разведение требуется, чтобы достичь столь малой их концентрации. Наименьшее разведение образца, при котором реакция еще является положительной, называют **титром** сыворотки (см. рис. 22). Понятие титра используется в других типах анализа в схожем смысле. Если говорят, что «это сыворотка с высоким титром антител», значит, требуется очень большое ее разведение (в сравнении с другими сыворотками), чтобы достичь отрицательного результата в анализе.

Агглютинационные тесты используют не только для выявления антител к ним, но и для обратной цели – идентификации бактерий. Некоторые патогенные бактерии отличаются от непатогенных форм в том числе и структурой поверхностных антигенов (компонентов клеточной стенки, липополисахарида и т. д.). Одним из таких патогенных микроорганизмов является *Escherichia coli* O157:H7, цифры и буквы в ее названии означают так называемый серотип – способность реагировать с определенными антителами, т. е. наличие на этих клетках определенных антигенов. При помощи иммунологических методов, а именно агглютинационных тестов, можно выявить такие патогенные микроорганизмы, используя соответствующие антитела.

По своей сути агглютинационный тест относится к так называемым **гомогенным анализам**, т. е. тем, которые протекают в растворе и в которых для генерации специфического сигнала достаточно простого смешивания компонентов. Смешивание может приводить к появлению различных сигналов – изменению мутности раствора, появлению осадка или его отсутствию (как в реакции агглютинации), изменению флуоресценции или активности особых ферментов. Существуют также и **гетерогенные анализы**, постановка которых требует удаления некоторых компонентов реакционной смеси. В этом случае распознающие элементы прикрепляют к какому-либо твердому носителю, который можно промыть с целью удаления ненужных компонентов реакционной смеси. Типичным примером является наиболее популярный в клинической лабораторной диагностике иммуноферментный анализ, в котором в качестве носителя используются стенки пробирок или пластиковых лунок, в которых и проводится анализ. В ходе анализа в пробирки или лунки по-

очередно вносятся необходимые реагенты, которые затем удаляются, а сами лунки промываются специальными промывочными растворами.

Наличие промывок обусловлено спецификой анализа. Гомогенные анализы сконструированы так, чтобы специфический сигнал проявлялся только при наличии аналита в образце, даже несмотря на присутствие в нем посторонних веществ (рис. 23).

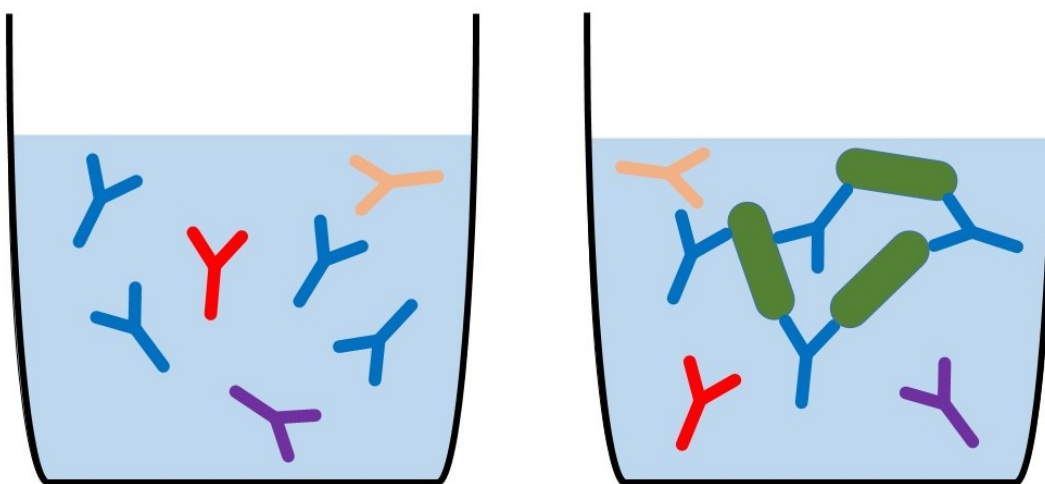


РИСУНОК 23. Агглютинация бактерий как пример гомогенного анализа. В образце присутствуют как антитела против бактерий (синие), так и против других антигенов (цветные). Добавление бактерий способствует протеканию агглютинации и приводит к генерации сигнала (изменение мутности раствора, образование хлопьев, пленок)

Гетерогенные анализы основаны на том, что для генерации специфического сигнала используется **метка** (фермент, флуоресцентная молекула, радионуклид), конъюгированная с распознающей молекулой, специфичной к аналиту. Если просто добавить такой **конъюгат** в реакционную среду, метка будет генерировать сигнал (например, катализировать цветную реакцию или флуоресцировать), даже если аналита нет в образце. Именно поэтому к ней «пришивают» распознающую молекулу – чтобы метка связывалась лишь с аналитом, но никакими другими молекулами, а сам конъюгат добавляют в избытке, чтобы он связался с как можно большим числом молекул аналита. Избыток конъюгата удаляют при помощи промывки. Чтобы при промывке не удалить сам аналит, его нужно каким-то образом закрепить на твердом носителе. Обычно для

этой цели также используют стереоспецифические взаимодействия: к носителю «пришивают» другую распознающую молекулу, которая взаимодействует только с аналитом (см. главу «Принцип иммуноферментного анализа на примере выявления онкомаркера простатспецифического антигена» и рис. 24).

Гомогенные и гетерогенные анализы имеют свои **недостатки и преимущества**. Гомогенные анализы являются более простыми в плане постановки, поскольку требуют лишь смешивания реагентов с образцами. Тем не менее их чувствительность и специфичность (см. «ГЛАВА 5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТ-СИСТЕМ») меньше, чем у гетерогенных анализов, поскольку в последних многочисленные отмывки способствуют удалению веществ, которые могли бы повлиять на результат анализа.

Таким образом, формат анализа должен соответствовать задачам, для решения которых он создается. В тех условиях, где многочисленные манипуляции нежелательны, но при этом нет требования к высокой чувствительности и специфичности, гомогенные анализы показывают себя с лучшей стороны. Это могут быть широкомасштабные скрининговые исследования для выявления больных, при которых сложные тесты неприемлемы (классический пример – экспресс-тест на сифилис с кардиолипиновым антигеном). Гетерогенные анализы чаще используются как подтверждающие тесты, от которых требуются высокая чувствительность и специфичность. Тем не менее некоторые гетерогенные анализы также являются простыми в применении. Так, иммунохроматографический тест на беременность является, по своей сути, гетерогенным анализом, а жидкость, наносимая на тест-полоску, не только обеспечивает движение пробы по тест-полоске, но и удаление избытка детектирующего реагента с аналитической зоны теста в толщу впитывающего материала.

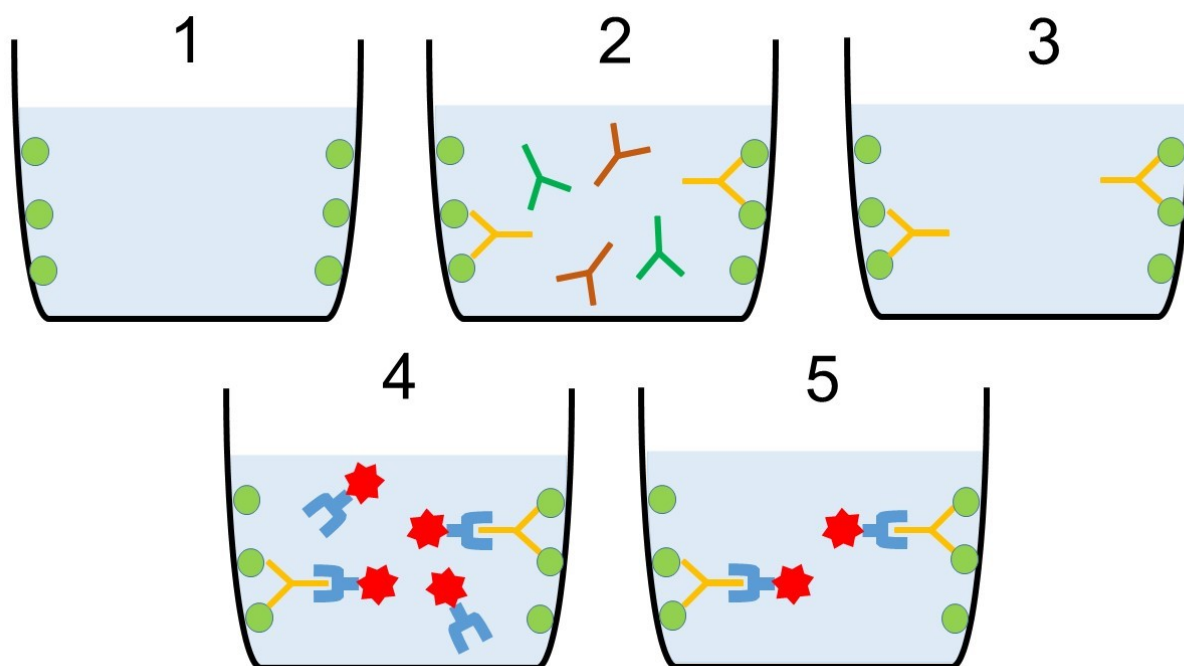


РИСУНОК 24. Иммунофлуоресцентный анализ антител как пример гетерогенного анализа. В качестве носителя выступают стенки лунок пластикового планшета, на которые сорбирован антиген (1). В лунки добавляют образец, содержащий антитела, в том числе и антитела против исследуемого антигена (2), эти антитела и являются аналитом. Не связавшиеся с антигеном антитела удаляются при промывке, в лунке остаются лишь антитела, которые связались с антигеном (3). Таким образом происходит закрепление аналита на носителе посредством стереоспецифических взаимодействий. В лунки добавляется избыток конъюгата G белка стрептококка с флуоресцирующей молекулой, т. е. меткой (4). Вне зависимости от того, присутствовали ли целевые антитела в образце или нет, жидкость в лунке будет флуоресцировать. Само по себе добавление конъюгата не позволяет оценить содержание аналита в образце. Для этой цели вновь нужно разделение связавшихся и несвязавшихся молекул, т. е. промывка, которая отделит носитель с прикрепившимися флуоресцирующими комплексами от свободных комплексов (5). Если в итоге жидкость в лунке флуоресцирует, значит, на поверхности носителя (стенок лунки) есть молекулы конъюгата, а они там могут быть лишь при наличии в образце искомых антител

Непрямая агглютинация эритроцитов, торможение агглютинации эритроцитов и агглютинация цветных латексных частиц

Агглютинация бактерий, как и другие гомогенные анализы, является простым (хотя и не самым оперативным) методом. Однако область ее применения по понятным причинам ограничена лишь детекцией бактерий, антител к бактериям или каких-то других вещества, которые могут взаимодействовать с бактериями. Сам же принцип анализа, основанный на склеивании крупных, видимых глазу частиц, является весьма привлекательным ввиду своей наглядности. Так почему бы не использовать вместо бактерий окрашенные частицы микрометрового размера? Это возможно, но как они пригодятся в анализе, ведь на них нет никаких антигенов? Ответ весьма прост: к частицам можно химически присоединить любые молекулы, в том числе и антигены. Такие частицы, несущие антигены, можно использовать для выявления антител против этих антигенов. Эта идея не просто была воплощена в жизнь, но и породила целый ряд методов анализа.

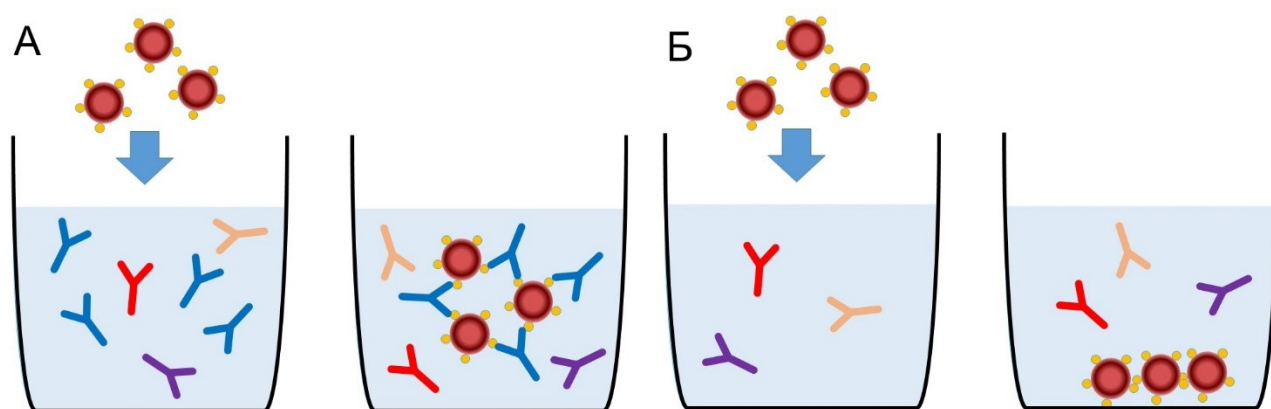


РИСУНОК 25. Детекция антител при помощи пассивной гемагглютинации с использованием эритроцитов, конъюгированных с антигеном. А – добавление эритроцитов в образец, содержащий целевые антитела (окрашены синим). Происходит агглютинация эритроцитов. Б – добавление эритроцитов в образец, не содержащий целевых антител. Эритроциты оседают на дно лунки под действием силы тяжести

В качестве окрашенных частиц, к которым пришивают антигены (или антитела!), иногда используются эритроциты, в частности эритроциты барана. Эритроциты удобнее всего получать от крупных животных, из которых можно получить много крови, причем многократно. Важно, чтобы эритроциты не несли на своей поверхности таких белковых молекул, которые могут повлиять на результат анализа. Эритроциты с «пришитыми» антителами или антигенами можно использовать для выявления как антигенов, так и антител (рис. 25, 26). Принцип точно такой же, как и в классической реакции агглютинации бактерий. Называются такие анализы **непрямой, или пассивной, гемагглютинацией**. Непрямая она, поскольку сшивание эритроцитов обусловлено не молекулами, которые присущи этим клеткам, а молекулами, искусственно к ним «пришитыми».

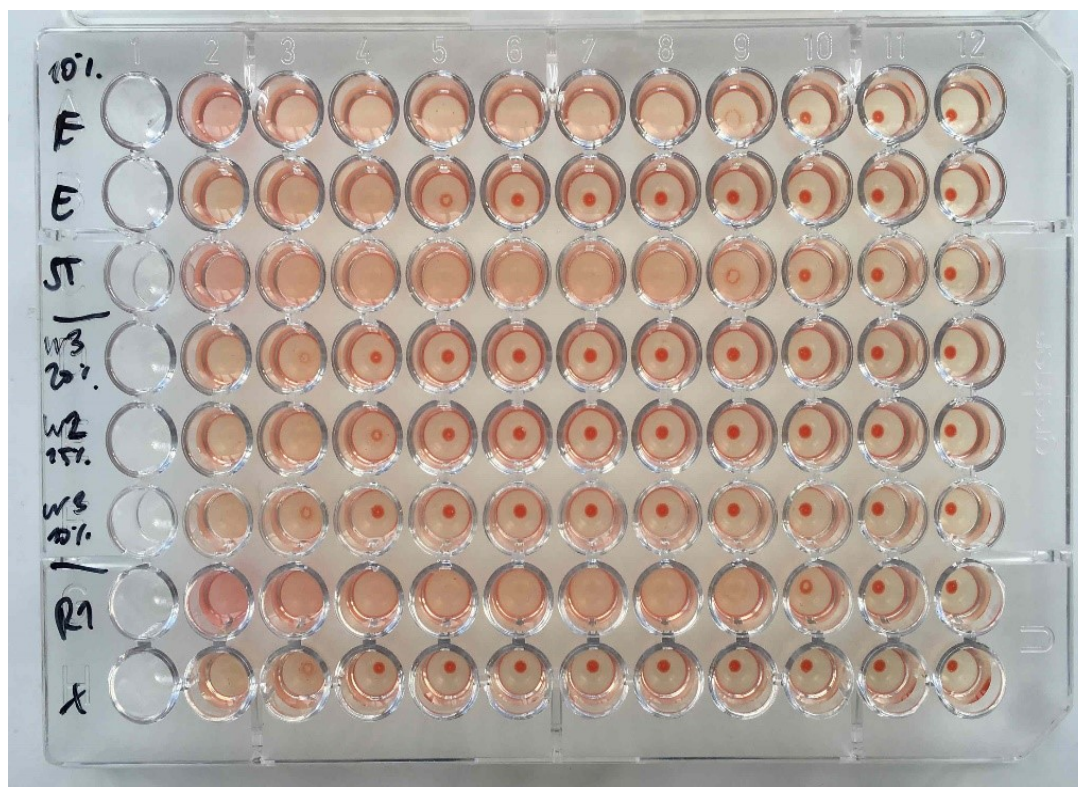


РИСУНОК 26. Пассивная гемагглютинация в полистирольном планшете. В лунках с отрицательным результатом виден осадок эритроцитов в виде красной точки. В лунках, где произошла агглютинация эритроцитов, наблюдается равномерная окраска, поскольку склеенные эритроциты плавают в виде взвеси

Существует и реакция **прямой гемагглютинации**, когда агрегация эритроцитов происходит за счет взаимодействия анализита с эритроцитарными антигенами или мембраной эритроцита. Примером прямой гемагглютинации является определение групп крови при помощи антител, специфичных к эритроцитарным антигенам системы АВО. Еще один пример – обнаружение вирусов, несущих в своем составе молекулы-гемагглютинины, способные взаимодействовать с поверхностью эритроцитов и вызывать их склеивание (от чего и происходит их название). Гемагглютинины имеются, например, у вирусов гриппа и кори (в названии штамма вируса гриппа A/California/07/2009 (H1N1) «H1» обозначает серотип гемагглютиниана). Детекция вирусов является одним из этапов контроля качества вакцинных препаратов. Добавление вируса приводит к слипанию эритроцитов. При этом, если вирус предварительно проинкубировать с образцом сыворотки крови, содержащей антитела к нему, то уровень гемагглютинации снизится или же ее попросту не произойдет ввиду блокирования гемагглютининов антителами. Такой подход называют **торможением гемагглютинации** и используют для решения двух задач – выявления антител к вирусу (например, для оценки иммунитета после введения вакцины) или оценки концентрации вируса и его идентификации (рис. 27).

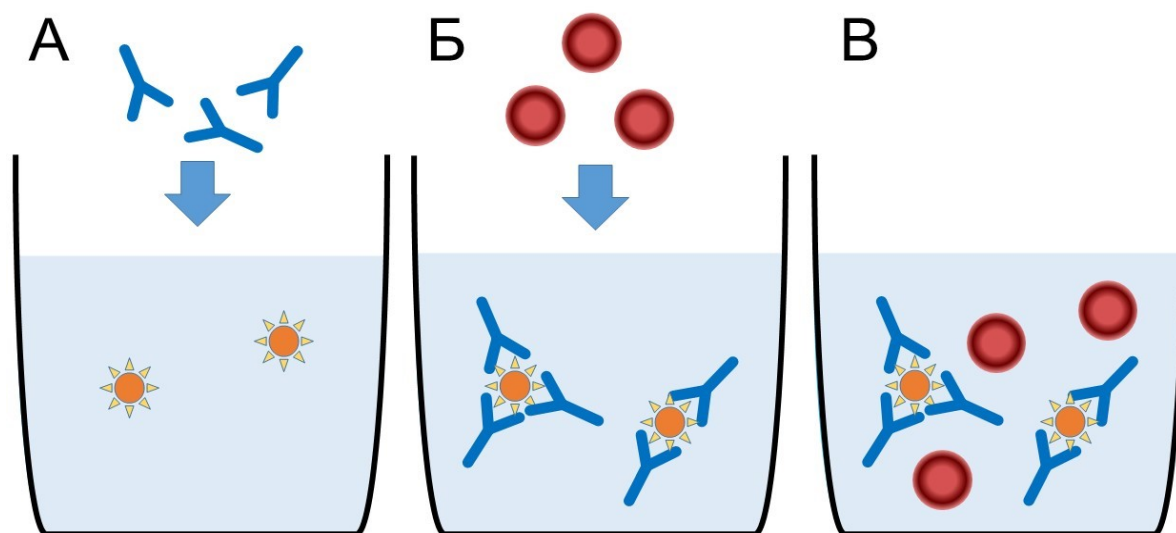


РИСУНОК 27. Реакция торможения гемагглютинации. А – антитела, специфичные к вирусу, добавляют к раствору, содержащему вирус. Б – эритроциты добавляют к полученной ранее смеси.

В – агглютинации эритроцитов вирусом не происходит, поскольку гемагглютинины вируса блокированы антителами

Применение эритроцитов в качестве окрашенных частиц имеет ряд неудобств: необходимость их выделения из животных, вариабельность от партии к партии, наличие на поверхности различных биомолекул, которые могут приводить к неспецифическим взаимодействиям в ходе анализа, а значит, к появлению ложноположительных или ложноотрицательных результатов. Гораздо более эффективно использовать химически синтезированные частицы, которые могут заменить собой эритроциты. В качестве таких частиц используются латексные микросферы. Они имеют следующие преимущества: регулируемые размеры, отсутствие необходимости использовать животных для синтеза, возможность введения различных функциональных групп, удобных для ковалентной «пришивки» антигена/антитела, возможность их нагрузки окрашенным веществом или флуоресцирующим красителем. Принцип анализов с латексными частицами такой же, как и в случае эритроцитов.

Как и реакция агглютинации бактерий, анализы с использованием эритроцитов и окрашенных микрочастиц могут быть как качественными, так и полуколичественными. Более того, если оценивать степень склеивания частиц при помощи специальных приборов, например нефелометра, то анализ будет количественным. Тем не менее применение приборов частично идет вразрез с самой идеей гомогенных анализов как простых тестов. Наиболее ярко преимущества анализов такого типа проявляются как раз в неинструментальном варианте.

Качественный анализ обычно сводится к оценке того, произошла агглютинация наночастиц или нет. Стоит отметить, что это не такая уж простая задача. Отрицательный результат от положительного отличить несложно. В случае агглютинации эритроцитов при отрицательном анализе на дне пробирки образуется осадок из эритроцитов, осевших под действием силы тяжести, а при положительном на поверхности жидкости плавают пленка из слипшихся эритроцитов. В случае агглютинации латекса положительный результат выражается в образовании видимых агрегатов, в то время как при отрицательном они отсутствуют. Однако в случае невысоких концентраций аналита вполне возможен промежуточный результат: часть частиц оседает, часть плавают в виде пленки, соотношение между ними может варьировать. В этом случае положительным результатом считают агглютинацию определенной выраженности,

а в инструкциях к наборам приводятся длинные словесные описания того, как это выглядит. Разумеется, это делает оценку таких промежуточных результатов субъективной, вследствие чего результат анализа сильно варьирует от одного оператора к другому.

Полуколичественный вариант тестов сводится к определению титра антител/антигена. Под ним подразумевается такое разведение аналита, ниже которого агглютинации уже не наблюдается. По описанной выше причине титр определяется также субъективно.

ГЛАВА 4. РАЗНООБРАЗИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СИСТЕМ НА ПРИМЕРЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Иммуноферментный анализ (ИФА) является наиболее популярным методом современной клинической лабораторной диагностики. Основой метода является использование в качестве метки не окрашенной частицы, а фермента, который катализирует образование цветного или люминесцентного продукта. По интенсивности окрашивания раствора судят о концентрации анализита в образце.

Принцип иммуноферментного анализа на примере выявления онкомаркера простатспецифического антигена

Ввиду многообразия форматов и вариаций ИФА сначала мы рассмотрим его принцип на конкретном примере, а уже затем перейдем к подробному обсуждению отдельных компонентов и особенностей этого типа анализа. «Выставочным образцом» послужит количественный тест на простатспецифический антиген (ПСА). Простатспецифический антиген, также известный как калликреин-3, является гликопротеином с молекулярной массой 34 кДА, который продуцируется предстательной железой. Количественная детекция ПСА в крови мужчин используется при ранней диагностике рака предстательной железы. Пороговым значением, которое сигнализирует о риске развития заболевания, является концентрация 4 нг/мл.



РИСУНОК 28. Разборный полистирольный планшет для ИФА

Для выявления ПСА обычно используют сыворотку или плазму крови пациента. По своему формату ИФА на ПСА относится к так называемому сэндвич-анализу. Почему такое странное название? Все дело кроется в принципе обнаружения ПСА. Сам анализ проводится в 96-луночных иммунологических планшетах, изготовленных из прозрачного полистирола (рис. 28). Каждая лунка такого планшета вмещает порядка 300 мкл жидкости и имеет плоское прозрачное дно, что необходимо для количественной оценки сигнала. На дно и стенки лунок сорбируют моноклональные антитела, специфичные к определенному эпитопу ПСА. Сорбция антител производится главным образом за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий. Твердая фаза с сорбированными антителами именуется **иммуносорбентом**.

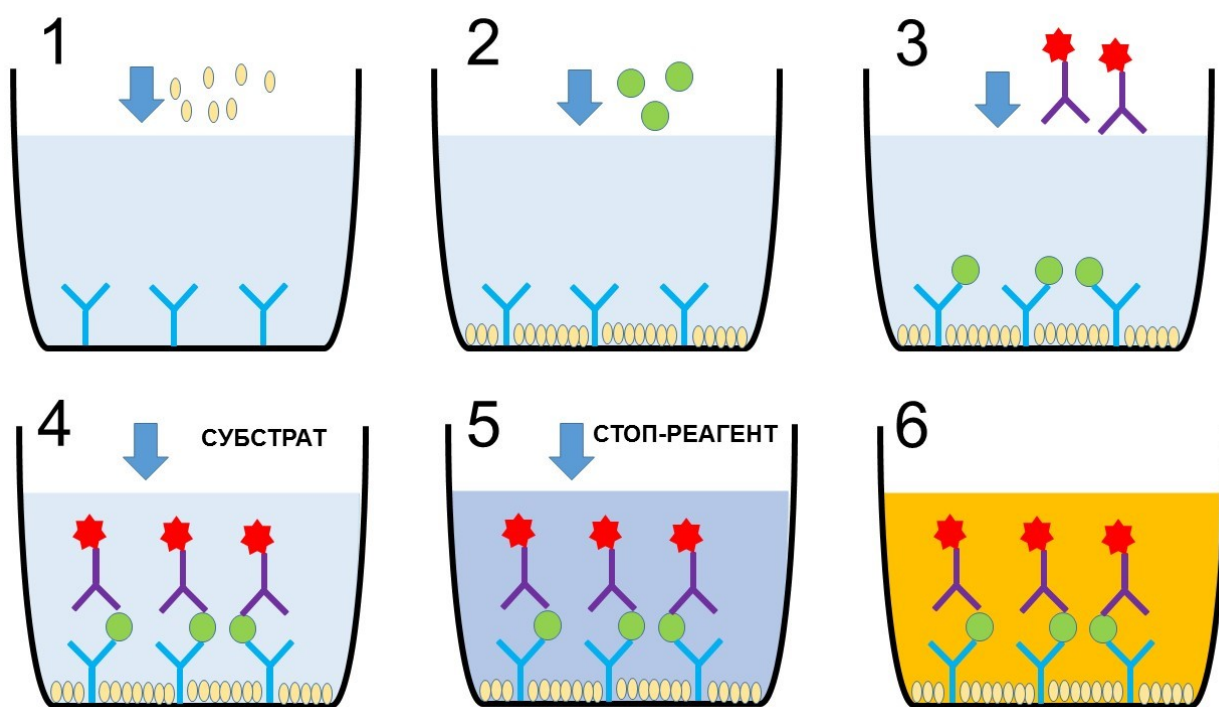


РИСУНОК 29. Принципиальная схема ИФА в формате сэндвич-анализа. 1 – добавление блокирующего реагента в лунки планшета с сорбированными на их поверхности антителами, 2 – внесение образца, взаимодействие анализа с улавливающими антителами, 3 – добавление конъюгата, антител, меченных пероксидазой хрена, 4 – добавление субстрата, 5 – остановка ферментативной реакции при помощи стоп-реагента, 6 – считывание результатов. В готовых тест-наборах поверхность лунок уже заблокирована, анализ начинается со 2-й стадии

На следующем этапе лунки промывают, а затем в них добавляют так называемый блокирующий буфер. Он, как правило, содержит какой-либо инертный белок (альбумин, желатин, казеин). Этот белок должен связаться теми участками поверхности лунки, которые не заняты антителами, чтоб на них в ходе анализа не сорбировались белки из образца или ферментный конъюгат, поскольку это может привести к появлению неспецифических взаимодействий. Таким образом, этот инертный белок «блокирует» свободные участки иммуносорбента (рис. 29, 2). В дальнейшем мы не будем упоминать процедуру блокирования при описании других тест-систем, тем не менее она является необходимой практически в каждом случае. Более того, инертный белок зачастую добавляют в растворы, которые используют для разведения образца и ферментного конъюгата.

После блокирования лунки промывают и добавляют в них образец – разведенную или даже цельную сыворотку или плазму крови. Разведение является предпочтительным, поскольку в крови содержится множество веществ, которые могут повлиять на результат анализа, если присутствуют в большой концентрации. Иногда, однако, разводить образец нельзя, поскольку концентрация аналита в нем столь мала, что при разведении анализ будет просто не способен выявить его. После добавления образца ПСА взаимодействует с моноклональными антителами, сорбированными на подложке. Очередная промывка удаляет все компоненты образца, не связавшиеся с антителами. В идеальной ситуации в лунке остается лишь ПСА, «зацепившийся» за подложечные антитела (рис. 29, 4).

Следующий этап анализа состоит в добавлении **конъюгата** – моноклональных антител против ПСА, ковалентно «сшитых» (конъюгированных) с ферментом (в данном случае пероксидаза из корней хрена). Вторые моноклональные антитела специфичны к другому эпитопу ПСА. Пары подложечных и конъюгатных антител подбирают таким образом, что они не мешают друг другу связываться с ПСА. После взаимодействия с конъюгатом ПСА оказывается как бы «заключен» между двумя антителами. Этим и обусловлено название анализов такого типа сэндвич-анализами (рис. 29, 5). В ходе очередной промывки из лунок удаляется избыток конъюгата.

В лунки планшетов добавляют субстрат (в данном случае это перекись водорода и тетраметилбензидин, ТМБ), который пероксидаза хрена конвертирует в цветной продукт. Эта реакция является основой анализа. В ходе реакции происходит восстановление перекиси водорода за счет электронов, которые отдает ТМБ (рис. 30). Раствор ТМБ в лунках приобретает синий цвет спустя некоторое время после добавления. Реакцию останавливают внесением в лунки кислоты (чаще серной), что приводит к окончательному окислению частично окисленных молекул ТМБ, вследствие чего раствор приобретает желтую окраску. Интенсивность окраски напрямую зависит от количества фермента в лунке. При этом количество фермента тем больше, чем больше ПСА в образце. Таким образом, оценивая интенсивность окрашивания раствора, можно судить о концентрации ПСА в образце. Для этого нужно лишь построить калибровочный график зависимости сигнала анализа от концентрации ПСА и с помощью этого графика определить концентрацию ПСА в образцах.

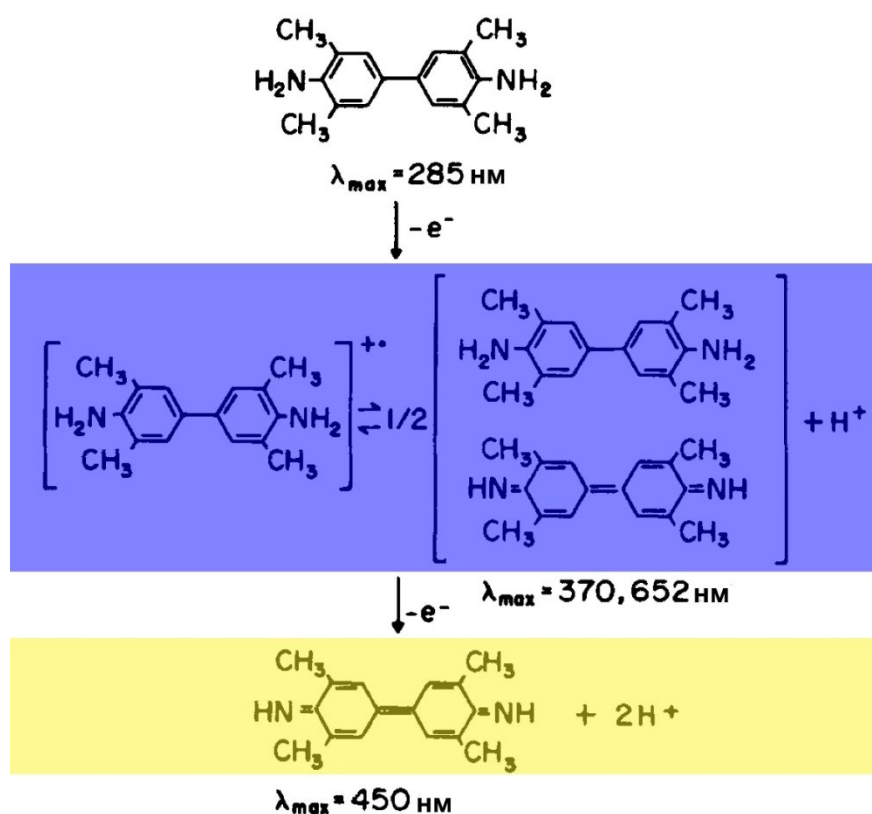


РИСУНОК 30. Окисление ТМБ под действием пероксидазы хрена. Первый этап: образование комплексов молекул субстрата и окисленного продукта (синий цвет). Второй этап: полное окисление субстрата (желтый цвет).
С изменениями из [Josephy et al., 1982]

Оценку интенсивности окрашивания можно произвести визуально, что, разумеется, субъективно и неточно. В связи с этим интенсивность окрашивания раствора оценивают при помощи спектрофотометра, измеряя поглощение на определённой длине волны, характерной для данного субстрата (для ТМБ – 450 нм). Поскольку раствор находится не в кюветах, как у обычных спектрофотометров, а помещен в лунки, то и спектрофотометр используют особый, планшетный. Луч света в них проходит сквозь лунки снизу-вверх, что и объясняет требования к наличию плоского прозрачного дна лунок.

Преимуществами ИФА являются высокая аналитическая чувствительность (см. главу «**Чувствительность и специфичность**»), обусловленная высокой каталитической активностью ферментов и аффинностью антител, высокая специфичность, связанная с наличием многократных отмывок (для твердофазного ИФА), возможность автоматизации анализа, благодаря проведению анализа в планшетах и наличию соответствующего оборудования для промывки, дозирования образцов и считывания результатов. Существуют целые автоматизированные станции, позволяющие лабораториям проводить тысячи анализов в течении рабочего дня. Такие станции востребованы в крупных медицинских центрах, в которых обрабатываются образцы, поступающие из крупных городов или целых регионов.

Форматы ИФА: прямой, непрямой, сэндвич-анализ, анализ с двойным антигеном, анализ с улавливанием антител

Мы рассмотрели принцип иммуноферментного анализа на примере классического сэндвич-анализа, однако это не единственный возможный формат ИФА. Под форматом мы будем понимать организацию взаимодействия специфичных друг к другу компонентов анализа (распознающих молекул, аналита), а также физическое воплощение анализа: помимо традиционного ИФА в полистирольных планшетах этот анализ может быть проведен самым различным образом – в пробирках, на тест-полосках, в микрофлюидных системах и т. д. Все рассмотренные форматы применимы не только в ИФА, но в анализах, где используются неферментные метки – флуоресцентные, радиоактивные, магнитные. Все рассматриваемые нами форматы анализа могут быть использованы

и в смежных областях, например в иммуногистохимии, детекции циркулирующих опухолевых клеток [Cheng, 2012], проточной цитометрии.

Отметим, что здесь приводится классификация форматов иммуноанализов в весьма упрощенном виде, которая затрагивает лишь ключевые их типы. Реальное их разнообразие намного шире и далеко выходит за рамки данного пособия. Кроме того, разные авторы классифицируют анализы по-разному, что может приводить к кажущимся противоречиям между различными источниками информации. Более глубокая классификация форматов ИФА представлена в книге [Егоров, 1991].

Наиболее простой формат ИФА – **прямой анализ**. При прямом анализе иммуносорбент представляет собой твердую фазу с сорбированными антителами или антигеном. Именно эти сорбированные молекулы и являются аналитом. Для их детекции в лунки добавляют меченные ферментом антитела или антиген. Такой тип анализа используется в исследовательских целях, а также для быстрой детекции аналита, когда не требуется высокой аналитической чувствительности и специфичности анализа (см. «**Чувствительность и специфичность**»). Он может быть использован на производстве, когда требуется быстро оценить присутствие какого-то продукта в сложной смеси, например, рекомбинантного белка в культуральной среде. В этом случае культуральную среду просто наносят на твердую фазу, ее компоненты сорбируются, а затем добавляют антитела против рекомбинантного белка. Ввиду того что сорбируется не чистый рекомбинантный белок, а сложная смесь, существует вероятность неспецифических взаимодействий между конъюгатом и компонентами культуральной среды. Кроме этого, сорбция антигена может приводить к тому, что он меняет свою конформацию и теряет ряд эпитопов, что снижает аналитическую чувствительность анализа. Анализ такого типа удобно проводить в формате дот-иммуноанализа (см. «**Форматы ИФА: дот-иммуноанализ (иммуноблот), иммунохроматография, иммунофильтрация**») на тест-полосках из пористых мембран, поскольку белок на них сорбируется намного быстрее, чем на стенки лунок планшетов, да и самого белка нужно куда меньше.

Непрямой анализ. Непрямой анализ используется для обнаружения антител к целевому антигену. Области его применения: оценка успешности иммунизации животных, оценка эффективности вакцина-

ции, определение причины возникновения аллергии, контроль качества при производстве моноклональных антител и т. д.

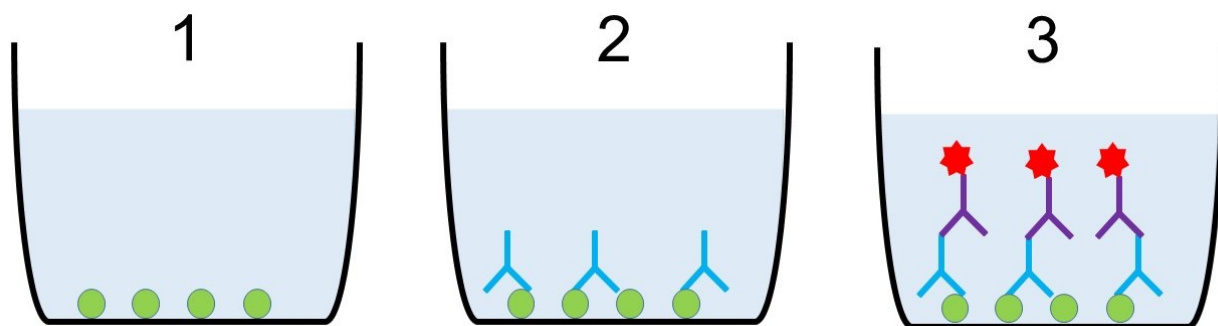


РИСУНОК 31. Непрямой ИФА. 1 – иммуносорбент с антигеном, 2 – добавление образца, содержащего антитела, 3 – добавление конъюгата (антивидовые антитела+фермент)

Иммуносорбент представляет собой твердую фазу с сорбированным на нее антигеном (рис. 31). В лунки добавляют исследуемый образец, например сыворотку или плазму крови, содержащую антитела против этого антигена. Связавшиеся с антигеном антитела можно детектировать, используя разные конъюгаты, например конъюгаты фермента с белками А или G, аптамерами против антител, а также **антивидовыми** антителами. Антивидовыми называют антитела, специфичные к иммуноглобулинам разных видов животных (человека, крыс, мышей, коз и т. д.). Антивидовые антитела еще называют вторичными антителами (secondary antibodies). Такие антитела могут быть специфичны к определенным изотипам иммуноглобулинов, подклассам, а также различным их участкам, например легким или тяжелым цепям.

Сэндвич-анализ, или двухсайтовый анализ, был подробно рассмотрен нами ранее. Здесь мы отметим одну из особых его модификаций, которая широко применяется в коммерческих тест-наборах. Она состоит в том, что в качестве конъюгата используется не комплекс «антитело – фермент», а комплекс «стрептавидин – фермент». В этом случае те моноклональные антитела из пары, которые используются для детекции аналита, являются биотинилированными. После их добавления присутствует дополнительная отмывка, призванная удалить их избыток, а затем добавляется конъюгат стрептавида с ферментом. Этот подход используется для усиления сигнала [Kendall, 1983], поскольку антитело несет несколько биотинов, что позволяет связаться с этим антителом несколькими молекулами конъюгата.

Биотинилирование, если хорошо оптимизировано, не оказывает негативного эффекта на аффинность антител. За усиление чувствительности приходится заплатить дополнительным этапом анализа, что увеличивает его длительность, снижает пропускную способность лаборатории (количество анализов в день), увеличивает нагрузку на лаборантов.

Анализ с «двойным антигеном» («антигенный сэндвич», double-antigen assay) используется для обнаружения антител. Его особенностью является то, что в качестве конъюгата используется комплекс антигена и фермента. Детекция аналита (антител) производится за счет взаимодействия сорбированного на твердую фазу антигена с одним паратопом антитела, а антигена, входящего в состав конъюгата, – с другим паратопом (рис. 32). Преимуществами такого анализа является универсальность, т. е. возможность использования для детекции антител, полученных от животных любого вида, а также имитация условий *in vivo*, в которых антитела взаимодействуют не с сорбированными, а со свободно плавающими антигенами [Kristiansen, 1997]. Помимо этого, стоит отметить дополнительный эффект увеличения аналитической специфичности анализа (см. «**Чувствительность и специфичность**»), поскольку происходит «двойная верификация» антитела при помощи двух разных молекул одного антигена, что теоретически снижает вероятность детекции неспецифически связавшихся с иммуносорбентом антител, в сравнении с непрямым анализом. Подобный формат аналитической системы также называют анализом с двойным контролем специфичности.

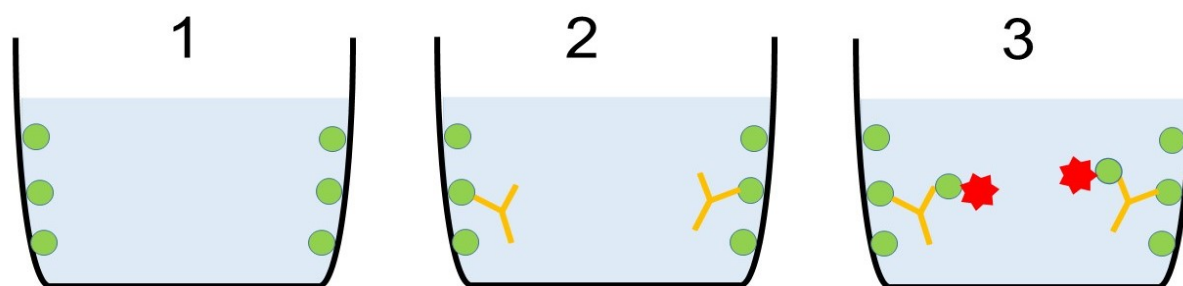


РИСУНОК 32. ИФА с «двойным антигеном». 1 – иммуносорбент с антигеном, 2 – добавление образца, содержащего антитела, 3 – добавление конъюгата (антиген+фермент)

Анализ с улавливанием антител – еще один формат ИФА, позволяющий детектировать антитела. Используется, как правило, для детекции IgM. Иммуносорбент представляет собой твердую фазу с сорби-

рованными анти-IgM антителами (рис. 33). После добавления образца происходит улавливание из образца IgM разной специфичности. Для детекции используется конъюгат антигена с ферментом. Применение такого подхода для выявления IgM вместо непрямого анализа позволяет избежать влияния ревматоидного фактора, который связан с IgM и приводит к появлению ложноположительных результатов в непрямом анализе. Кроме того, при непрямом анализе многие молекулы-антигены будут связаны с многочисленными антителами класса IgG, которые будут препятствовать связыванию IgM, что снизит аналитическую чувствительность анализа [Sakata, 1985].

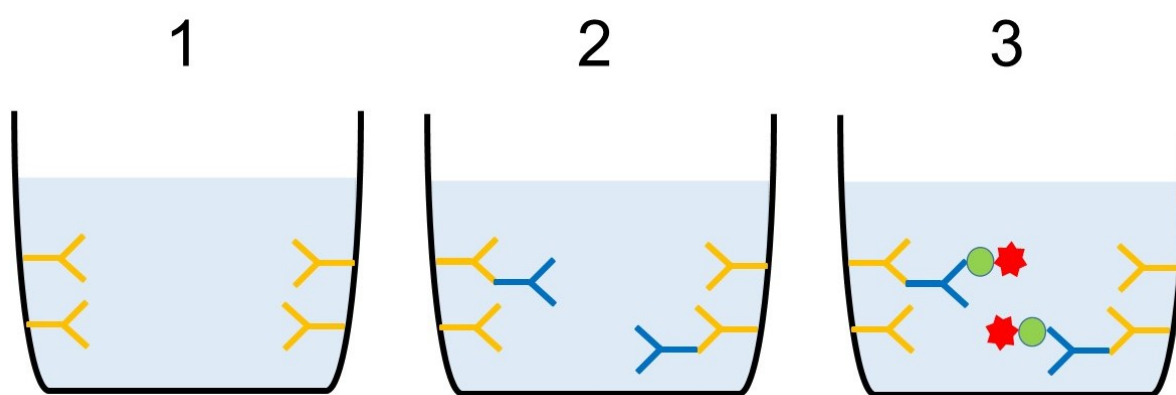


РИСУНОК 33. ИФА с улавливанием антител. 1 – иммуносорбент с антивидовыми антителами, 2 – добавление образца, содержащего антитела, 3 – добавление конъюгата (антиген+фермент)

Конкурентный ИФА используется, как правило, для обнаружения низкомолекулярных аналитов, которые ввиду малого размера не могут быть обнаружены при помощи сэндвич-анализа. К аналитам такого типа относятся стероидные гормоны, токсины, антибиотики. В этом случае используют следующий подход: на твердую фазу сорбируют антитела против низкомолекулярного аналита, затем добавляют образец, смешанный с конъюгатом, который представляет собой молекулы аналита, меченные ферментом (рис. 34). Происходит конкуренция меченого и немеченого аналита за ограниченное число связывающих центров антител. Чем больше в образце аналита, тем меньше метки свяжутся с иммуносорбентом, тем ниже будет сигнал. Конкурентный анализ имеет ряд недостатков. Во-первых, это меньшая аналитическая чувствительность. Кроме того, при низкой концентрации аналита невозможно

сильно развести образец, и присутствующие в нем молекулы могут повлиять на аналитическую специфичность анализа.

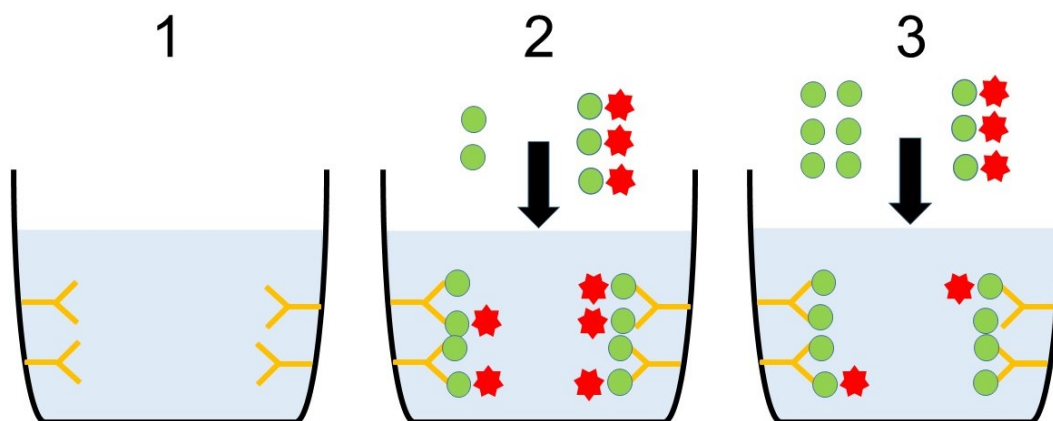


РИСУНОК 34. Конкурентный ИФА. 1 – иммуносорбент, 2 – добавление образца с низкой концентрацией аналита и конъюгата, 3 – добавление образца с высокой концентрацией аналита и конъюгата

Форматы ИФА: дот-иммуноанализ (иммуноблот), иммунохроматография, иммунофильтрация

Иммуноферментный анализ может быть воплощен в различных физических формах. Первые анализы проводились в пробирках, на стенки которых сорбировали антитела или антигены, при этом использовались большие объемы образцов и прочих реагентов. На настоящий момент разработаны более экономичные и удобные форматы анализа, которые позволяют за короткое время исследовать десятки и сотни образцов, разработаны специальные приборы, облегчающие работу операторов и снижающие вероятность ошибок. Про формат планшетного анализа уже было сказано выше. В этом разделе речь пойдет о менее распространенных форматах анализа, которые имеют свои специфические области применения. Многие из них зачастую используются не для иммуноферментного анализа, а для анализа с применением микро- или наночастиц, генерирующих различные типы сигнала – цвет (колориметрические тесты), флуоресценцию, магнетизм, тепло, акустические волны и др. Тем не менее они будут представлены как форматы ИФА для сохранения последовательности повествования. Эти форматы анализа многочисленны. Мы рассмотрим лишь некоторые из них – дот-иммуноанализ, иммунохроматографию, иммунофильтрацию. Тест-системы на основе микрофлюидных устройств, микрофлюидных бу-

мажных систем, электро-, опто- или пьезосенсоров, а также других сложных подходов в данном пособии не рассматриваются.

Дот-иммуноанализ (дот-блот, иммуноблот) представляет собой подход к анализу, при котором в качестве твердой фазы используются полоски, диски или даже листы пористой мембраны. На поверхность таких тест-полосок сорбируют антитела или антигены. Область сорбции представляет собой точки или полоски. Самый простой способ – взять тест-полоску и нанести на нее каплю раствора, содержащую нужное вещество. Мембраны изготовлены из материала, который эффективно связывает белки (или ДНК), как правило, это нитроцеллюлоза или другие производные целлюлозы (рис. 35). После нанесения белка на мембрану ее высушивают, что обычно не требует много времени. В дальнейшем мембраны обрабатывают так же, как и лунки планшетов при обычном ИФА, – блокируют, промывают и т. д. Для обработки тест-полосок используют специальные емкости, в которые наливают необходимые жидкости. Емкости помещают на качающиеся платформы для эффективного перемешивания раствора и равномерного контакта компонентов анализа с поверхностью тест-полоски.

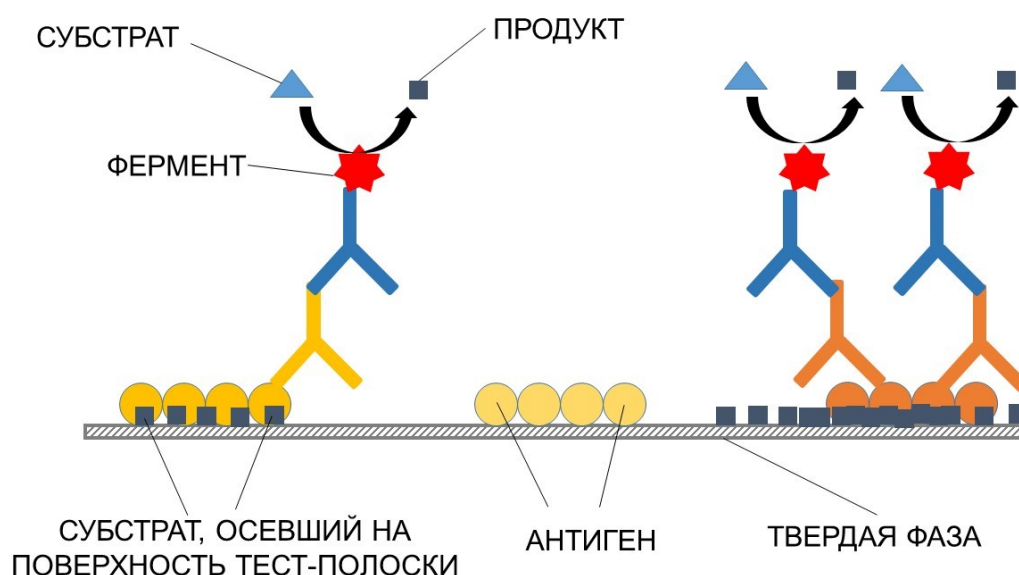


РИСУНОК 35. Непрямой дот-иммуноанализ, фермент превращает субстрат в окрашенный нерастворимый продукт, который выпадает в осадок на поверхности тест-полоски

Особенностью анализа является то, что результат оценивается по наличию на тест-полоске окрашенных пятен в тех местах, куда были

сорбированы антитела/антигены, а также по интенсивности окрашивания этих пятен. В связи с этим используется особый тип субстратов, превращающихся под действием фермента в нерастворимый окрашенный продукт, который сразу же после образования оседает на поверхность тест-полоски и формирует это самое окрашивание. Примером такого субстрата является диаминобензидин.

Иммуноблот имеет ряд особенностей. Тест-полоски можно делать разной формы и размеров, а при помощи одной тест-полоски можно выявлять множество анализов в одном и том же образце (**мультиплексность**). Это очень удобно, поскольку позволяет, например, эффективно осуществлять дифференциальную диагностику заболеваний со сходной этиологией, выявлять антитела против целых панелей аллергенов, что существенно ускоряет постановку диагноза (рис. 36). Разумеется, тест-полоски менее удобны в обращении, чем ИФА-планшеты, в связи с чем пропускная способность ИФА намного выше. Существует ряд ситуаций, где иммуноблот имеет преимущества перед традиционным ИФА. Иммуноблот является незаменимым подтверждающим тестом при диагностике опасных заболеваний, таких как ВИЧ. Благодаря особенностям иммуноблота при помощи одной тест-полоски у пациента можно детектировать как антитела к ключевым антигенам этого вируса, так и сами антигены. Одновременная детекция многочисленных анализов снижает вероятность постановки ошибочного диагноза, повышая таким образом диагностическую специфичность и чувствительность анализа (см. «**Чувствительность и специфичность**»). Тест-полоски можно сохранять для последующего использования как физическое доказательство проведения анализа.

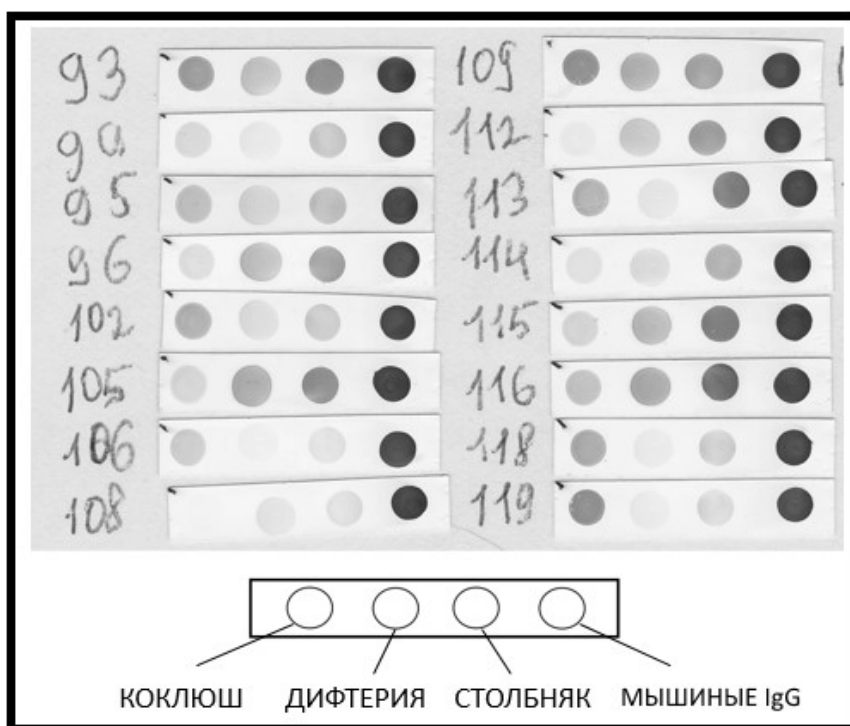


РИСУНОК 36. Дот-иммуноанализ для одновременного выявления анти-тел к коклюшу, дифтерии и столбняку (мышинные IgG – положительный контроль), внешний вид тест-полосок после проведения анализа

Дот-иммуноанализ является не только качественным и полуколичественным методом, но и количественным. Количественную оценку результатов можно осуществлять при помощи приборов и программ, позволяющих оценивать интенсивность сигнала и сравнивать ее с калибровочными образцами. В исследовательских целях для этого используют бытовые сканеры и смартфоны, в медицинских центрах – сертифицированные сканеры и программные пакеты.

Иммунохроматография (ИХ) является форматом **экспресс-анализов**, которые предназначены для быстрого получения результата в условиях минимального приборного оснащения или даже в полевых условиях. Во многих случаях такой формат используется, когда необходимо, чтоб анализ проводил неспециалист. Еще одной причиной применения иммунохроматографии является минимальная задержка между постановкой анализа и получением результатов. Это обуславливает основные сферы применения ИХ-тестов – самодиагностику (тесты на беременность), быстрое тестирование состояния человека в экстренных ситуациях или в условиях недостатка оборудования и/или времени (тесты на наркотики и алкоголь в полиции, выявление заболевших в очагах

эпидемии), выявление болезней животных и растений фермерами, оценка содержания различных веществ в пищевых продуктах (афлатоксина, антибиотиков) на производстве как промежуточный этап контроля качества, предотвращение заболеваний у животных в различных экосистемах. Например, был разработан тест для определения грибкового заболевания, поражающего лягушек (рис. 37).

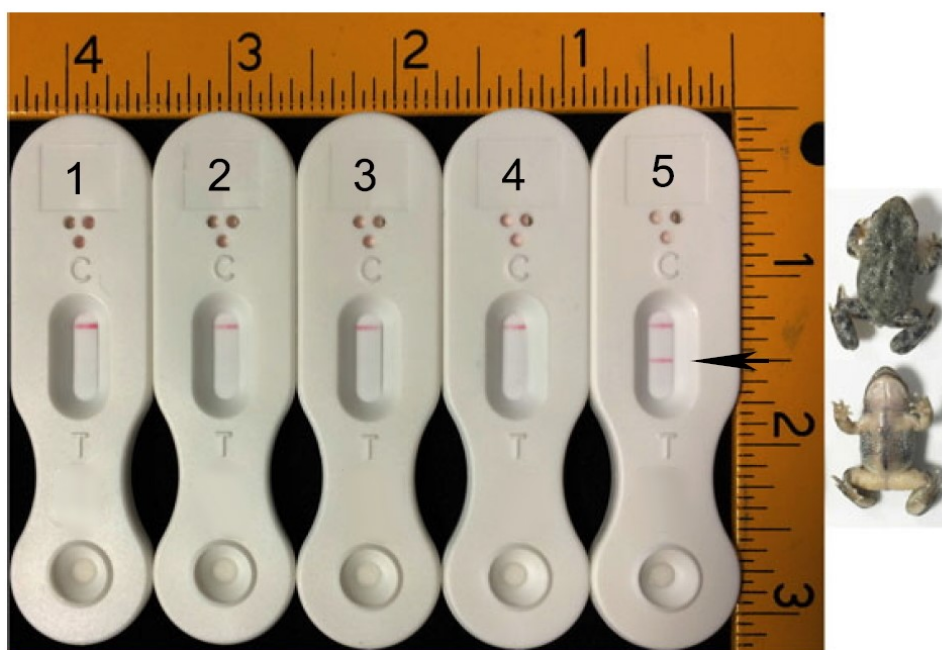


РИСУНОК 37. ИХ-тесты для выявления антигена грибка, вызывающего заболевание лягушек *Alytes obstetricans*, с изменениями из [Dillon et al., 2017]

Иммунохроматографический тест (рис. 38) представляет собой тест-полоску, состоящую из нескольких составных элементов, которые являются кусочками мембран различного состава и пористости, налегающими друг на друга и закрепленными на пластиковой основе. Движение жидкости по полоске обусловлено капиллярными силами, избыток жидкости скапливается во впитывающем элементе на одном из концов тест-полоски. Исследуемый образец наносится на соответствующую зону тест-полоски. В некоторых случаях дополнительно наносится несколько капель жидкости для разведения. Если в качестве образца используется цельная кровь, то в зоне нанесения образца применяется особая мембрана, позволяющая отделить эритроциты, мешающие анализу.

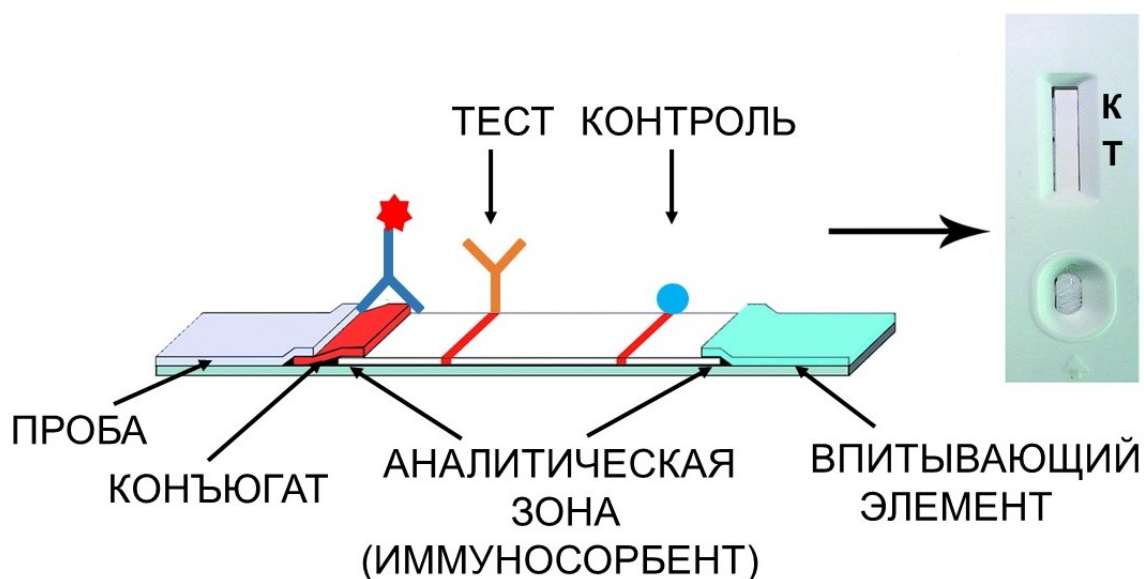


РИСУНОК 38. Схема устройства ИХ тест-полоски: К – контрольная зона, Т – тестовая зона

Образец, содержащий аналит, движется за счет капиллярных сил в зону конъюгатной подложки – крупнопористой мембраны, пропитанной молекулами конъюгата. Высушенные внутри конъюгатной подложки детектирующие комплексы сохраняют свою активность долгое время. Захваченный потоком образца конъюгат начинает мигрировать по тест-полоске, одновременно взаимодействуя с аналитом. Далее эта смесь достигает аналитической зоны тест-полоски, которая представляет собой мембрану, хорошо связывающую белок, похожую на ту, что используется в иммуноблоттинге, однако имеющую больший размер пор.

На поверхности мембраны в аналитической зоне тест-полоски сорбированы молекулы, которые захватывают аналит. Это могут быть антигены, захватывающие антитела, которые являются аналитом (при непрямом анализе), или моноклональные антитела, захватывающие антиген (при сэндвич-анализе). В том участке мембраны, где сорбированы улавливающие молекулы, происходит сборка всего иммунного комплекса – улавливающих молекул, аналита и конъюгата. В случае конкурентного анализа (например, при анализе на антибиотики) конъюгатом служат меченные молекулы аналита.

На поверхности этой же мембраны присутствует еще одна зона – контрольная. В ней обычно сорбированы молекулы аналита, способные связываться с конъюгатом. Эта зона присутствует для того, чтобы оце-

нить способность конъюгата связывать аналит. Зачем это нужно? Отрицательный результат в анализе может быть обусловлен как отсутствием аналита в образце, так и тем, что конъюгат пришел в негодность или анализ был в целом выполнен некорректно. Если конъюгат при хранении испортился, то ни один образец не даст положительного результата. Для выявления нарушений в работе теста и добавляется контрольная зона. При корректной постановке анализа и хорошем качестве конъюгата в контрольной зоне будет появляться окрашивание, обусловленное взаимодействием аналита и конъюгата. При отсутствии сигнала в контрольной зоне результат теста является недействительным (рис. 39).

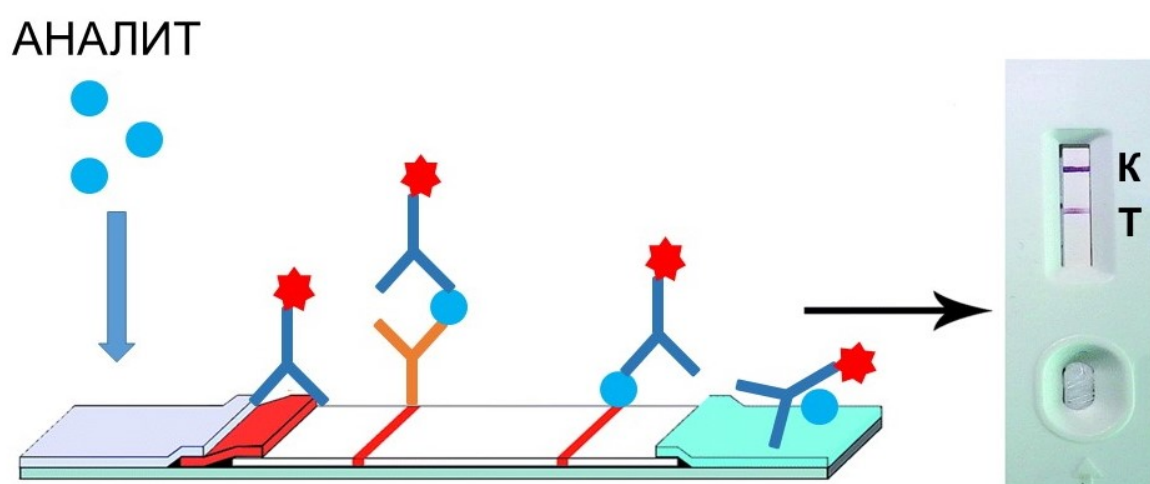


РИСУНОК 39. Формирование сигнала на ИХ тест-полоске при добавлении образца, содержащего аналит. К – контрольная зона, Т – тестовая зона

Если в качестве метки использовался фермент, то тест-полоску необходимо погрузить в раствор субстрата для генерации цветного сигнала либо нанести этот субстрат на поверхность тест-полоски. Это, однако, идет вразрез с самой концепцией ИХ как простого и оперативного теста с минимумом операций. Поэтому в качестве метки чаще используются окрашенные частицы (цветные латексные, золотые, углеродные), позволяющие оценить результат анализа визуально.

Как и в случае дот-иммуноанализом, возможен количественный вариант ИХ. Для этого тест-полоски помещают в специальные сертифицированные сканеры, которые позволяют оценить интенсивность окрашивания (рис. 40). В исследовательских целях или экстренных ситуациях для этого могут быть использованы смартфоны.

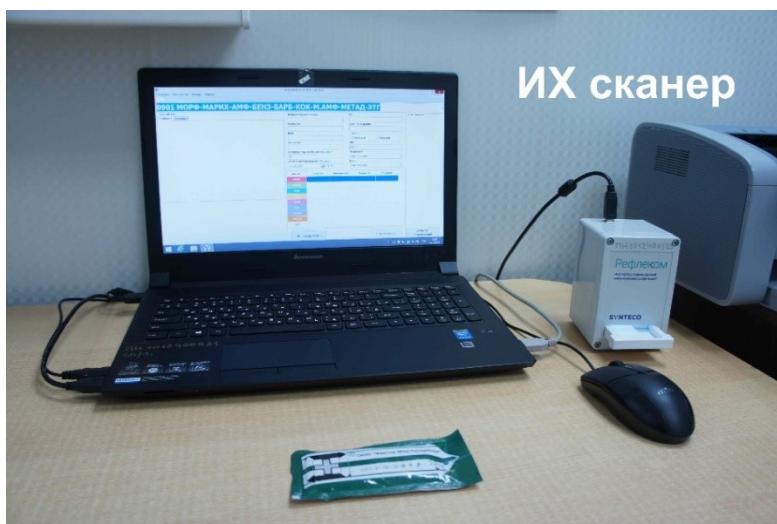
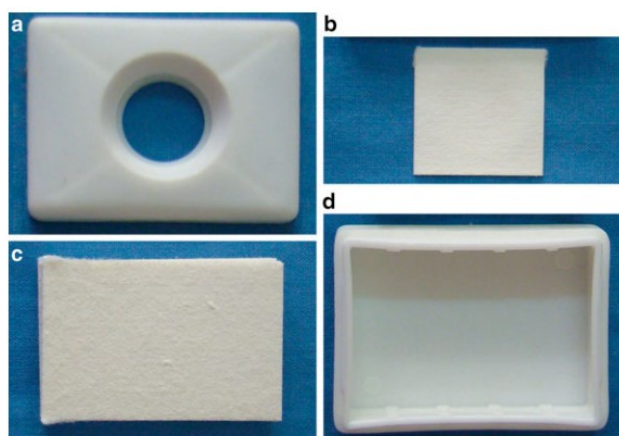


РИСУНОК 40. ИХ-сканер, подключенный к ноутбуку

Иммунофильтрация является еще одним методом экспресс-диагностики. Её принцип заключается в миграции компонентов анализа сквозь пористую мембрану, на поверхности которой и происходит взаимодействие аналита и конъюгата. Тест-системы организованы следующим образом. Внутри пластикового корпуса находится впитывающий материал, на поверхности которого лежит мембрана, плотно прилегающая к нему (рис. 41). В пластиковом корпусе есть отверстие, через которое на мембрану наносится образец, промывающие растворы, а также раствор конъюгата.



**РИСУНОК 41. Иммунофильтрационная ячейка в разобранном состоянии:
a, d – верхняя и нижняя часть пластикового корпуса,
b – мембрана, c – впитывающий материал**

Принципиально анализ сходен с планшетным ИФА и иммуноблотом: на поверхность мембраны последовательно наносятся образец, содержащий аналит, промывочные растворы, конъюгат, субстрат (рис. 42).

Разница состоит в том, что избыток реагентов не нужно выливать или удалять каким-то иным образом. Жидкость просто проходит сквозь мембрану и остается внутри впитывающего материала. Таким образом в ходе анализа нужно лишь последовательно добавлять требуемые растворы.

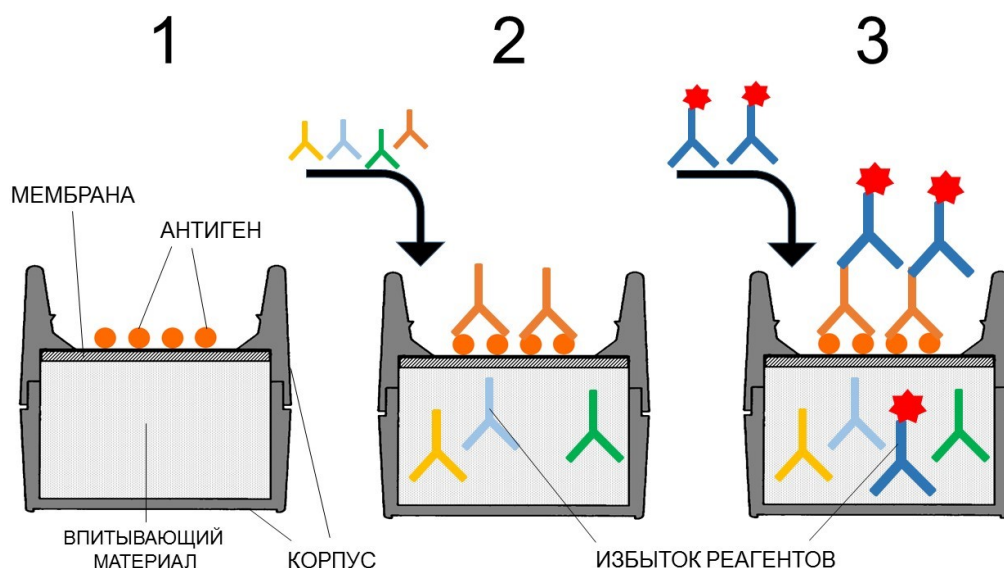


РИСУНОК 42. Иммунофильтрация, непрямой анализ. 1 – готовый к анализу иммуносорбент, 2 – нанесение образца с антителами, 3 – добавление конъюгата

Как и в случае с ИХ, в иммунофильтрации активно используются конъюгаты окрашенных частиц. Однако иммунофильтрация – по своей концепции все же лабораторный экспресс-анализ, она мало подходит для самотестирования, поскольку требует добавления определенного количества растворов, что может составить некоторые трудности для неспециалиста. В связи с этим применение ферментной метки в иммунофильтрации более уместно и удобно (рис. 43).

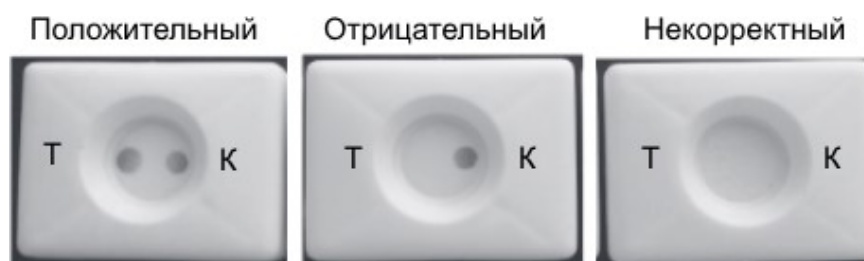


РИСУНОК 43. Внешний вид иммунофильтрационного теста, предназначенного для выявления одного анализата. Т – тестовая зона, К – контрольная зона; из [Sreedevi, 2011] с изменениями

Иммунофильтрация проигрывает в простоте и оперативности анализа ИХ, однако имеет и некоторые преимущества. Иммунофильтрация, как правило, имеет чуть большую аналитическую чувствительность (см. далее), более удобна для одновременного выявления нескольких аналитов (мультиплексность), кроме того, она не чувствительна к **хук-эффекту** [Ross, 2019]. Что такое хук-эффект? Так называют падение сигнала при очень высокой концентрации аналита в образце. В случае иммунохроматографии при большом количестве аналита все молекулы конъюгата могут быть связаны с аналитом, как и все улавливающие молекулы на мембране (рис. 44). Это может помешать формированию иммунных комплексов, а следовательно, приведет к ложноотрицательному результату [Rey, 2017]. Дополнительно отметим, что хук-эффект является проблемой гомогенных анализов наподобие агглютинации бактерий. Причина этого в следующем: при избытке аналита (например, антител) вероятность того, что одно антитело взаимодействует с несколькими бактериями, снижается, что приводит к уменьшению агглютинации.

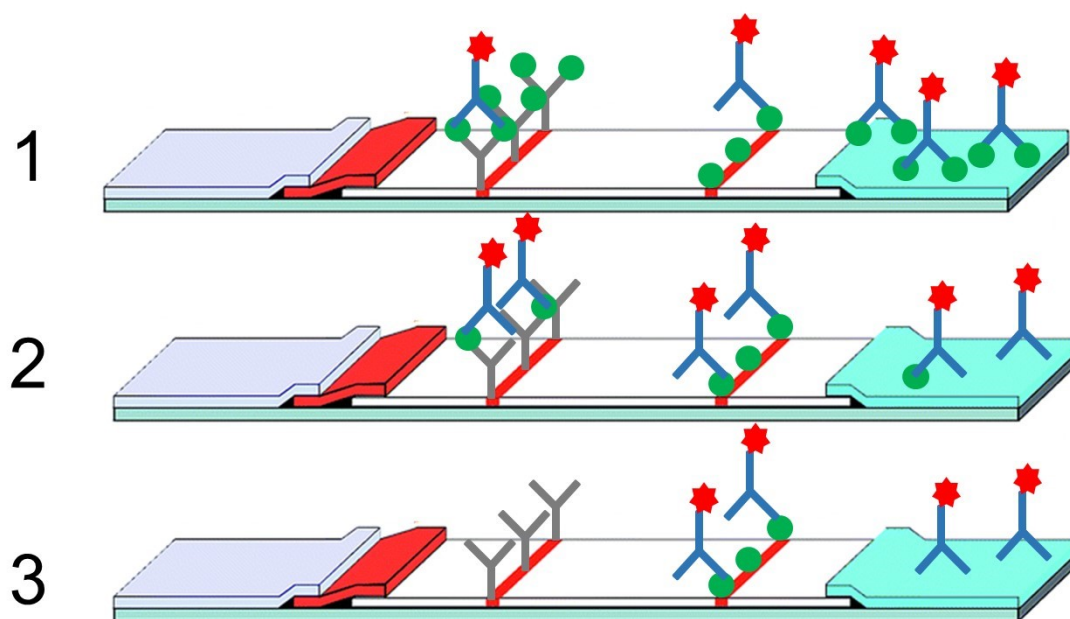


РИСУНОК 44. 1 – избыток аналита, в тестовой зоне мало меченых анти-тел (хук-эффект), 2 – много аналита, высокий сигнал, 3 – нет аналита, отсутствие сигнала

Мы уже упоминали, что при помощи ИХ и иммунофильтрации можно одновременно детектировать несколько аналитов. В иммунохроматографии для этой цели на мембрану наносят улавливающие молекулы в различных ее участках, однако их число ограничено размерами

тест-полоски. Иногда создают системы, включающие в себя несколько тест-полосок, имеющих общую зону нанесения образца. В случае иммунофильтрации на мембрану наносят улавливающие молекулы точками, пятнами, размер которых может быть очень мал, что увеличивает емкость теста в отношении количества детектируемых аналитов. Разработка мультиплексных анализов более сложна, поскольку необходимо подобрать такие единые условия анализа, которые будут оптимальными для выявления каждого из аналитов (рис. 45).

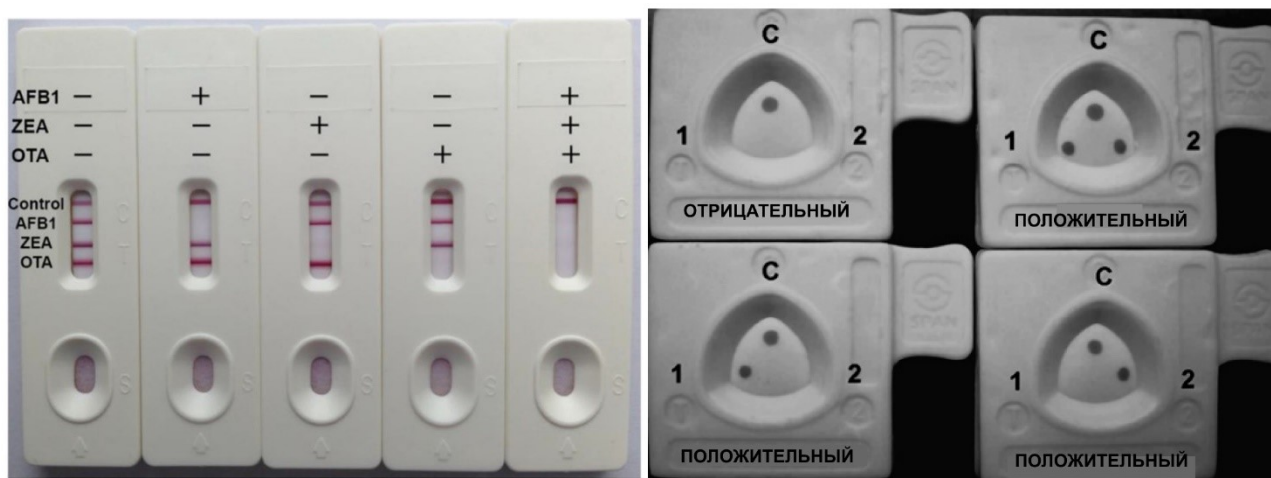


РИСУНОК 45. Слева – мультиплексные ИХ-тесты для выявления трех микотоксинов – афлатоксина В1 (AFB1), зеараленона (ZEA), охратоксина А (OTA) (конкурентный анализ, метка – золотые наночастицы) [Chen, 2016]; справа – мультиплексный иммунофильтрационный тест для выявления антител к белковым (1) и липидным (2) антигенам возбудителя сифилиса (с – контроль) [Castro, 2010]

Какой формат анализа самый лучший?

У каждого формата анализа есть определенная **ниша**, в которой его преимущества наиболее полезны, а недостатки не столь критичны. Это важно понимать при разработке и изучении диагностических систем. В определенных ситуациях требуется высокая аналитическая чувствительность, например для обнаружения онкомаркеров на ранних стадиях заболевания, когда они присутствуют в очень малых концентрациях. В некоторых ситуациях более важна оперативность метода, когда, скажем, требуется быстро оценить показатели здоровья человека в экс-

тренной ситуации, чтобы решить вопросы о возможности его транспортировки и об ее экстренности. Иногда важна мультиплексность: например, при дифференциальной диагностике заболеваний со схожими симптомами. Диагностические системы используются не только в медицине, но и ветеринарии, сельском хозяйстве, пищевой промышленности, криминалистике. В этих областях существуют свои специфические требования. Огромную роль играет стоимость анализа: всякий фермер хочет быть уверен, что его животные здоровы, но далеко не каждый фермер может позволить себе иметь лабораторию и специалиста, который будет проводить сложные и дорогие анализы.

ГЛАВА 5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТ-СИСТЕМ

Много было сказано о принципах работы тест-системы, о разнообразии их форматов. Когда дело доходит до практического применения тест-систем или их разработки, необходимо понимать, какими характеристиками должна обладать тест-система, чтобы быть пригодной для решения поставленных задач. Какие есть параметры, по которым можно оценить ее эффективность? Глава посвящена рассмотрению данных характеристик. Обратим внимание, что в пособии для наименования аналитических характеристик тест-систем используется терминология, предложенная Saah и Hoover [Saah, 1997], а также ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002.

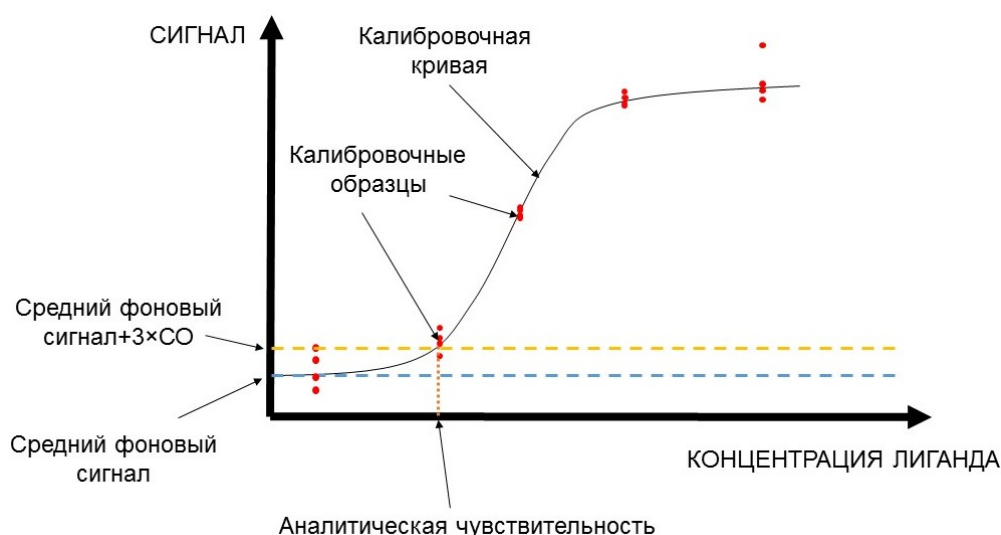
Чувствительность и специфичность

Чувствительность и специфичность – два термина, которые наиболее часто употребляются в отношении тест-систем. Каждый из этих терминов имеет два основных значения, которые часто путают. В связи с этим мы будем различать **аналитическую чувствительность, аналитическую специфичность, диагностическую чувствительность и диагностическую специфичность.**

Под аналитической чувствительностью мы понимаем минимальную концентрацию аналита, которую может детектировать тест-система. Исследуемый образец может содержать либо не содержать целевой аналит. Если исследуется образец, в котором нет аналита, то он может давать некоторый слабый фоновый сигнал. Конкретная концентрация аналита, которая дает сигнал, достоверно отличимый от фонового, как раз и соответствует аналитической чувствительности. В качестве синонимов используются термины «нижний предел детекции», «минимальная детектируемая концентрация». В большинстве исследовательских работ, посвященных разработке систем диагностики, именно аналитическую чувствительность называют просто «чувствительностью», это является своеобразным профессиональным жаргонизмом.

Если говорить более конкретно, то аналитическую чувствительность определяют обычно следующим образом. Тестируют несколько

образцов, не содержащих аналит, каждый из них дает определенный фоновый сигнал. К среднему уровню этого фонового сигнала прибавляют 3 стандартных отклонения. По калибровочной кривой оценивают, какой концентрации аналита соответствует уровень сигнала $\text{среднее} + 3$ стандартных отклонения. Именно эта величина концентрации аналита и соответствует минимальной, достоверно отличимой от фона концентрации, которую выявляет данный анализ (рис. 46). Из этого следует определённый вывод: если результат анализа свидетельствует об отсутствии аналита в образце, это не значит, что аналита в образце нет. Это значит лишь, что содержание аналита ниже аналитической чувствительности метода.



**РИСУНОК 46. Расчет аналитической чувствительности теста,
СО – стандартное отклонение**

Термин «**диагностическая чувствительность**» используется, когда говорят о способности теста выявлять пациентов (организмы, партии препаратов и т. д.) с определенным состоянием, которое связано с концентрацией детектируемого аналита в образце. Допустим, есть 100 больных с подтвержденным диагнозом (например, на основании четких клинических признаков). От этих 100 больных получают 100 образцов, которые отдают на анализ. Анализ призван выяснить, присутствует ли в этих образцах аналит, свидетельствующий о протекании заболевания. Примером может служить детекция антигенов ВИЧ в образцах плазмы крови. Если в образце есть антиген, то человек точно болен ВИЧ. Из 100

образцов в 97 случаях тест показал положительный результат, в трех – отрицательный. Таким образом, диагностическая чувствительность теста будет равна 97%.

Почему диагностическая специфичность может быть не 100%? Может быть, тесту просто не хватает аналитической чувствительности? Иногда это действительно так: исследуемый аналит присутствует в образце, но его концентрация слишком мала, чтобы тест мог ее обнаружить, и это становится причиной отрицательного результата. Во многих случаях причиной могут быть другие факторы. Выше уже шла речь о хук-эффекте, когда чрезмерно высокая концентрация аналита приводит к снижению аналитического сигнала. Хук-эффект является одной из причин снижения диагностической чувствительности теста. Причинами могут быть присутствие каких-либо примесей, снижающих сигнал. Так, в анализах, основанных на использовании системы биотин-стрептавидин, присутствие в образце биотина (а это самый обычный витамин!) и недостаточное его удаление может привести к тому, что этот свободный биотин будет взаимодействовать со стрептавидином, входящим в состав конъюгата. По этой причине конъюгат не будет связываться с биотинилированными антителами и, соответственно, генерации сигнала тоже не будет. Еще одной причиной могут быть систематические нарушения постановки анализа, хранения тест-набора, подготовки проб (перегревание, избыточное замораживание). Эти ошибки могут быть частично обусловлены и самим форматом анализа, например, если он сложен и требует большой аккуратности и мастерства. Чем больше процедур предусматривает анализ, тем больше вероятность случайных ошибок, приводящих к ложноотрицательным результатам.

В некоторых случаях диагностически отрицательный результат – это не отсутствие аналита в образце, а его содержание ниже определенного порога. Такие пороги, например, существуют для ИФА на простатспецифический антиген (4 нг/мл), реакции агглютинации на антитела к коклюшу (1:160 – защитный титр после вакцинации). Содержание многих токсинов, антибиотиков, красителей, бактерий в пищевых продуктах также строго регламентировано. В этих случаях отклонение от допустимого порога в ту или иную сторону считается положительным результатом. Аналитическая чувствительность тестов при этом, как правило,

намного ниже установленного порогового значения. В связи с этим недостаточная диагностическая чувствительность теста связана с индивидуальными особенностями образцов, особенностями самой процедуры анализа, подготовки образцов, транспортировки и хранения тест-набора, квалификацией персонала и т. д.

Аналитическая специфичность (или селективность) характеризует способность тест-системы выявлять только определенный аналит, но не другие вещества или объекты. Наиболее важна способность теста дифференцировать аналиты, схожие между собой со структурной точки зрения, в частности выявлять только определенный белок из широкого семейства похожих друг на друга белков. Для этого требуется тщательный подбор антител или других распознающих реагентов. Кросс-реактивность (перекрестная реактивность) может привести к ложноположительным результатам, когда аналита в образце нет либо его меньше порогового уровня, но анализ выдает обратный результат. Не только структурное сходство молекул может быть причиной ложноположительных результатов. Присутствие в образцах ревматоидного фактора, появление новых эпитопов, вызванное денатурацией антигена при его сорбции на твердую фазу, гетерофильные антитела и другие причины могут привести к ошибочным результатам.

Диагностическая специфичность показывает, какой процент образцов из числа отрицательных будет определен как ложноположительный. Допустим, 100 образцов взято у здоровых людей, из них 96 образцов отрицательные (концентрация аналита ниже порогового уровня), а 4 – положительные (концентрация аналита выше порогового уровня). В этом случае диагностическая специфичность метода будет 96%. Причиной появления ложноположительных результатов могут быть как перекрестные реакции (недостаточная аналитическая специфичность), так и особенности постановки анализа, например, контаминация образцов следовыми количествами положительных образцов, которые были протестированы в той же лаборатории. Последнее зачастую случается при постановке ПЦР, ввиду ее высочайшей аналитической чувствительности. Даже минимальные отклонения от стандартной процедуры, недостаточное соблюдение мер предосторожности могут привести к загрязнению образцов и появлению ложноположительных реакций.

Вариабельность биологических образцов очень велика, а их состав чрезвычайно сложен, поэтому практически невозможно проанализировать все возможные примеси и устранить причины перекрестных реакций заранее. При исследовании селективности метода обычно тестируются вещества, сходные по структуре, или те, которые с большой вероятностью будут присутствовать в образцах (гемоглобин, билирубин, липиды). В инструкциях к тест-наборам обычно приводятся данные о возможном влиянии таких веществ на результат анализа. Тем не менее огромное количество молекул в биологических образцах может приводить к образованию комплексов (например, сорбция антибиотиков, красителей на белках), несущих эпитопы, случайным образом совпадающие с эпитопами аналита.

Точность результатов анализа: правильность и прецизионность

Залогом высокого уровня диагностической чувствительности и специфичности метода анализа являются не только высокие уровни аналитической чувствительности и специфичности, но и его высокая **точность**. Точность обычно понимают в двух аспектах – как способность правильно определить концентрацию аналита и как степень разброса результатов при анализе одного и того же образца. Отсюда следуют два термина – **правильность** и **прецизионность** (рис. 47).

Под правильностью (trueness) понимают степень близости среднего значения, полученного на основании большой серии результатов измерений, к принятому опорному значению. Под опорным значением понимают либо концентрацию аналита, измеренную при помощи референсного метода («золотого стандарта»), либо полученную путем добавления известного количества аналита в образец (spike-recovery test), не содержащий этого аналита (или содержащий в концентрации, существенно меньшей аналитической чувствительности анализа). Как правило, при разработке тест-системы отклонение определяемой концентрации аналита от его номинального значения не должно превышать 20%.

Прецизионность (precision): степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в конкретных регламентированных условиях. По сути, это мера разброса результата анализа, обусловленная как случайными причинами (например, неизбежными мел-

кими неточностями при разведении и дозировании образцов и реагентов), характерными для любого анализа, так и особенностью процедуры именно исследуемого метода.

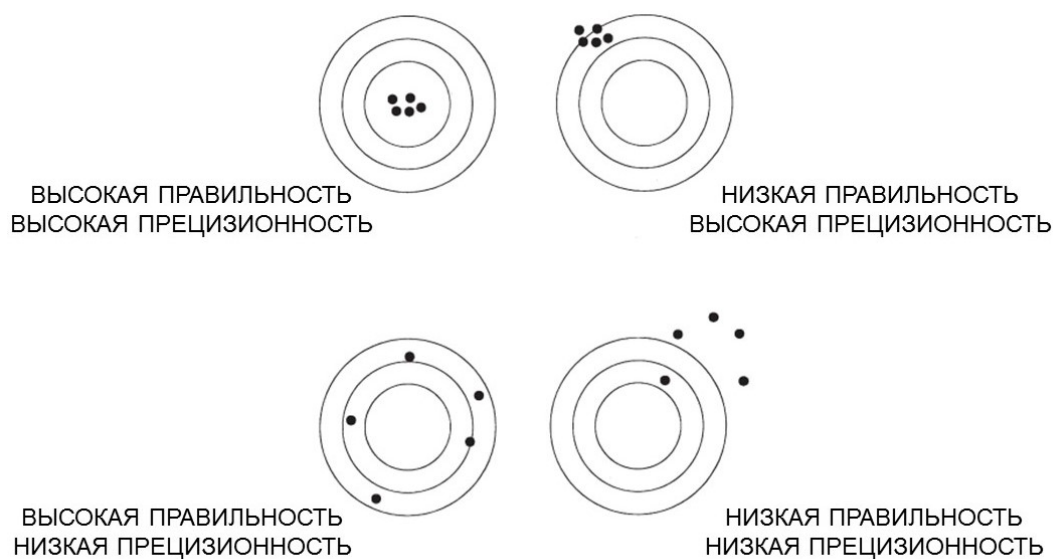


РИСУНОК 47. Точность метода

ГЛАВА 6. НАНОМАТЕРИАЛЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Наноматериалы широко используются в современной биоаналитике благодаря целому ряду выдающихся физико-химических свойств – разнообразию цветов, способности к флуоресценции, магнитным и каталитическим свойствам. В настоящем пособии мы обсудим особенности и применение наиболее значимых наноматериалов, укажем их отличительные черты и преимущества, которые позволяют улучшать аналитические и процедурные характеристики тест-систем.

Что такое наночастицы?

На настоящий момент не существует четкого определения понятий «наночастица» и «наноматериал». Ниже представлены некоторые определения этих терминов, а также обсуждаются сложности введения их строгого и недвусмысленного определения.

Согласно ГОСТ ISO/TS 80004-1-2014 «Нанотехнологии. Часть 1. Основные термины и определения», основанном на соответствующем стандарте, который был утвержден Международной организацией по стандартизации (ISO), под наноматериалом понимается «твердый или жидкий материал, полностью или частично состоящий из структурных элементов, размер которых хотя бы по одному измерению находится в нанодиапазоне». В свою очередь, нанодиапазоном называют диапазон линейных размеров приблизительно от 1 до 100 нм. При этом существует два важных примечания. Первое из них говорит о том, что верхняя граница нанодиапазона является не точной, а приблизительной. Связано это с тем, что у объектов с большими размерами, как правило, не проявляются уникальные свойства нанобъектов. Во втором замечании говорится о том, что нижняя граница введена для исключения из списка наноматериалов отдельных атомов или их групп. Таким образом, четкой размерной границы, которая отделяла бы наночастицы от «ненаночастиц», не существует.

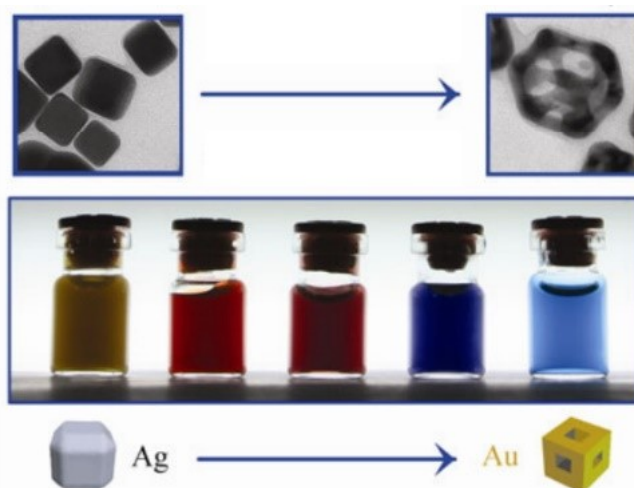


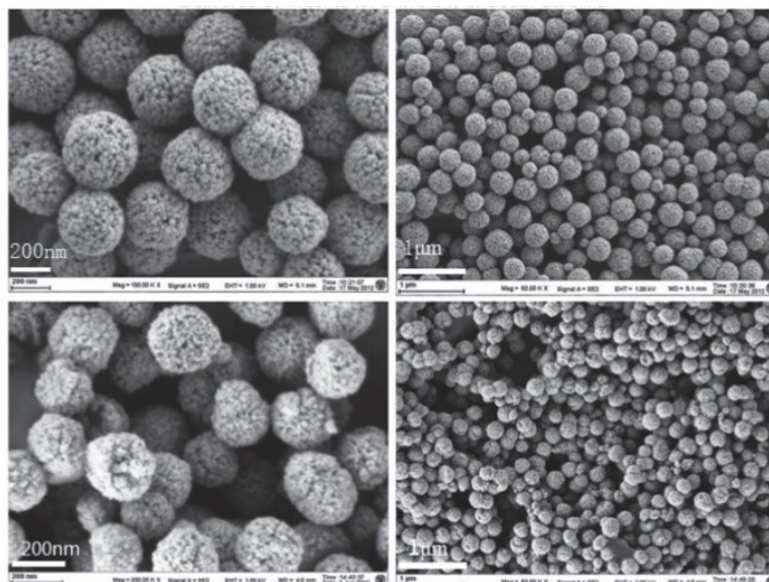
РИСУНОК 48. Наночастицы из серебра и композитов «золото+серебро», имеющие форму кубов и клеток (ПЭМ-фотография). Цвет суспензий наночастиц зависит от формы и химического состава, из [Panfilova, 2012] с изм.

Различные международные регулирующие организации вводят собственные определения термина «наночастица». Так, согласно Агентству по охране окружающей среды США (US EPA), «наноматериалы обладают уникальными свойствами, которые отличаются от свойств, которыми обладает то же химическое вещество в виде частиц большего размера». Согласно Управлению по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (US FDA), к наноматериалам относятся «материалы, имеющие размеры от 1 до 100 нм хотя бы в одном измерении, причем свойства этих материалов зависят от их размеров». Согласно Европейской комиссии, наноматериалы – это «изготовленный или натуральный материал, который содержит несвязанные, агрегированные или агломерированные частицы, для 50% из которых внешние размеры находятся в диапазоне от 1 до 100 нм». Согласно Британскому институту стандартов, «наночастицы – это частицы, чьи внешние размеры находятся в диапазоне от 1 до 1000 нм» [Jeevanandam, 2018].

Можно заметить, что некоторые из приведенных определений указывают на необходимость наличия у наноматериалов уникальных свойств. Именно благодаря уникальным свойствам, появляющимся у материалов, которые имеют субмикронные размеры, наноматериалы и привлекают такое огромное внимание, именно благодаря этим свойствам они и обладают огромным потенциалом для применения в различных областях производства, медицины, сельского хозяйства и т. д.

Однако различные наноматериалы обладают различными свойствами, которые в разной степени зависят от их размеров и формы (сфера, нанотрубки, нанопластины, нанопалочки и т. д.), более того, далеко не всегда эту зависимость можно правильно оценить. Даже размеры наночастиц далеко не так просто измерить [Miernicki, 2019].

Коротко рассмотрим некоторые наиболее популярные методы характеристики размеров наночастиц. Просвечивающая (ПЭМ), сканирующая (СЭМ) и атомно-силовая (АСМ) микроскопия наиболее часто используются для оценки размеров сухих или высушенных наночастиц. Метод измерения динамического светорассеяния (DLS) является наиболее популярным при оценке размера наночастиц в суспензиях. Другие методы характеристики размеров и иных свойств наночастиц рассмотрены в обзоре [Modena, 2019]. Просвечивающая и сканирующая электронная микроскопия основаны на облучении образца тонким пучком электронов. При использовании ПЭМ в камеру микроскопа помещается очень тонкий образец (до 100–200 нм), часть электронов проходит через образец, часть не проходит, это определяется структурой и материалом образца (рис. 48). Прошедшие сквозь образец электроны попадают на детектор, на основе чего формируется изображение. Сканирующая электронная микроскопия (рис. 49) основана на улавливании отраженных образцом электронов, а также электронов, которые были «выбиты» из электронных оболочек атомов образца. Энергия электронов, направляемых на образец в ходе СЭМ, ниже, чем при ПЭМ, что позволяет оценить поверхность анализируемого образца. Разрешение ПЭМ может достигать 50–100 пм, для СЭМ этот показатель составляет 2–3 нм, конкретные значения могут варьировать в зависимости от прибора, условий анализа и природы образца. Принцип АСМ основан на сканировании поверхности образца наноразмерным зондом. Взаимодействие зонда с образцом, обусловленное силами Ван-дер-Ваальса и прочими силами, приводит к отклонениям зонда, изменению частоты, амплитуды или фазы его колебаний, что может быть измерено при помощи оптических или иных систем.



**РИСУНОК 49. СЭМ-фотография наночастиц оксида железа
[Tang, 2013]**

Измерение динамического светорассеяния – это метод оценки распределения наночастиц по размерам в суспензии. В основе метода лежит регистрация рассеянного наночастицами света, на основании чего рассчитывается коэффициент их диффузии. Используя уравнение Эйнштейна – Стокса, можно вычислить размер наночастиц. Метод позволяет оценивать размеры (гидродинамический диаметр) тысяч наночастиц в течение нескольких минут. Чувствительность метода достигает нескольких нанометров, однако его разрешающая способность невелика, кроме того, наночастицы большого размера более эффективно рассеивают свет, ввиду чего возможна переоценка размеров популяции наночастиц в образце [Bhattacharjee, 2016].

Методы оценки размеров наночастиц многочисленны и не ограничиваются приведенными выше, однако можно с полной уверенностью утверждать, что не существует универсального подхода к измерению размеров наноматериалов. На результаты измерений могут влиять самые разные факторы, например пробоподготовка. Высушивание суспензий наночастиц перед микроскопическими исследованиями зачастую сопровождаются их агрегацией, и далеко не всегда можно однозначно различить отдельные наночастицы на полученных изображениях. Некоторые наночастицы склонны к обратимой агрегации, особенно при длительном хранении. Кратковременная обработка ультразвуком таких образцов может оказать существенное влияние на результаты измерения.

Далеко не все наночастицы имеют правильную форму, что затрудняет оценку их размера, поскольку в некоторых случаях говорить о диаметре или длине попросту некорректно. Существуют различные подходы к оценке размеров наночастиц неправильной формы (например, нанозвезд, нанопластин), однако выбор того или иного подхода в конкретном случае субъективен, поскольку зачастую зависит от решения экспериментатора. Важно отметить, что подавляющее большинство препаратов наночастиц не являются монодисперсными, т. е. содержат наночастицы разных размеров, а также их агрегаты. В связи с этим правильнее говорить не о размере наночастиц, а об их распределении по размерам, т. е. определенном диапазоне (рис. 50). При этом, как правило, частицы одного размера присутствуют в большем количестве, чем более крупные или более мелкие частицы.

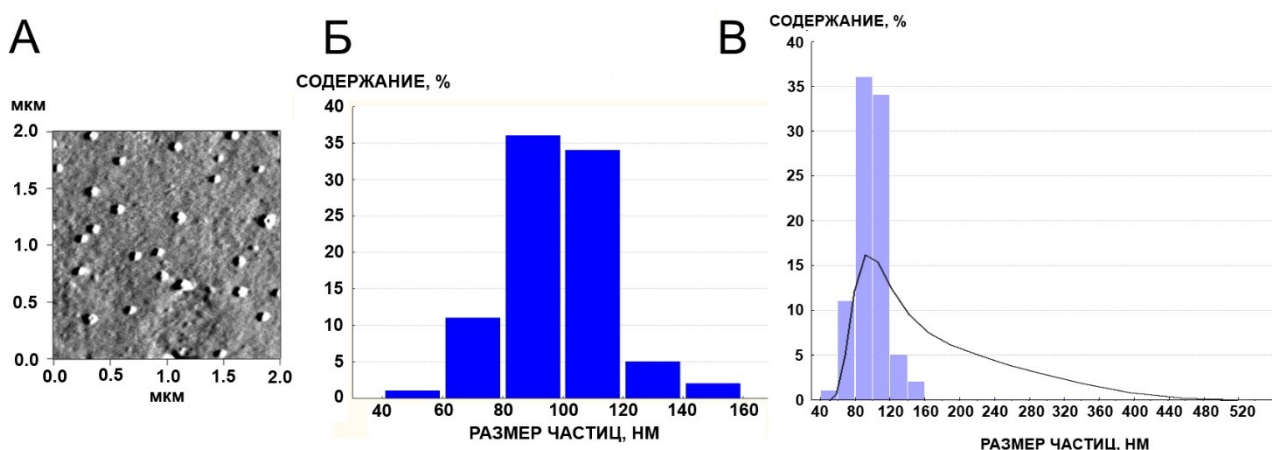


РИСУНОК 50. А – АСМ-изображение наночастиц аморфного углерода, конъюгированных с G-белком; Б – распределение наночастиц по размеру, подсчитанное на основе данных АСМ; В – распределение этих же наночастиц по размеру методом DLS (график) в сравнении с результатами АСМ (гистограмма). Результаты, полученные с использованием двух разных методов, различаются

Относительную субъективность понятия «размер» наночастиц иллюстрируют сравнительные результаты межлабораторных исследований размеров одного и того же образца наночастиц. В частности, в отсутствие строго стандартизированной методики даже при измерении водных суспензий монодисперсных частиц могут быть получены отли-

чающиеся результаты. Еще более тяжело достичь воспроизводимых результатов, когда анализируются полидисперсные образцы [Langevin, 2018]. Таким образом, тип измерительного прибора, природа образца, способ его подготовки к анализу могут повлиять на результат измерений. По этим причинам далеко не всегда на практике можно однозначно определить, является ли материал именно наноматериалом, особенно если брать в качестве критерия размеры.

В рамках данного пособия мы будем называть наночастицами те частицы, чьи внешние размеры находятся в диапазоне от 1 до 1000 нм. Столь широкий диапазон обусловлен тем, что в большинстве современных научных работ термин «наночастица» применяется к объектам размеров 200, 300 и более нанометров. Для того чтобы было проще разобратся с многообразием существующих наноматериалов, мы разделим их на группы по природе материала, из которого они изготовлены [Jeevanandam, 2018]:

1. Наноматериалы из неорганических веществ (например, золотые и серебряные наночастицы, наночастицы оксидов металлов, кремния и др.).
2. Наноматериалы из органических веществ (например, полимеры и биополимеры).
3. Углеродные наноматериалы (графен и его производные, фуллерены, нанотрубки, наночастицы аморфного углерода, углеродные наноточки).
4. Композитные наноматериалы (имеют сложную структуру, например, наночастицы железа, инкапсулированные в органический матрикс).

Далее мы рассмотрим отдельные типы наночастиц, используемых для создания тест-систем. Они будут выделены в группы по своему составу или функциям.

Золотые наночастицы

Золотые наночастицы относительно просто синтезировать (обычно методом восстановления солей золота лимонной кислотой), они стабильны и биосовместимы (рис. 51). Цвет золотых наночастиц зависит от их размеров: суспензии наночастицы размером до 100 нм имеют розовый цвет, более крупные частицы и агрегаты придают суспензиям синий и желтый цвет [Farka, 2017]. Золотые наночастицы используются в твердофазных и гомогенных колориметрических анализах. Наиболее широко золотые наночастицы применяются в иммунохроматографических тестах. Конъюгатную подложку иммунохроматографических тестов пропитывают суспензией золотых наночастиц, конъюгированных с антианалитом (как правило, это моноклональные антитела). После нанесения образца на тест-полоску происходит их миграция по длине аналитической зоны мембраны и взаимодействие с аналитом, что приводит к образованию видимых глазу полосок, имеющих красно-розовую окраску [Huang, 2015].

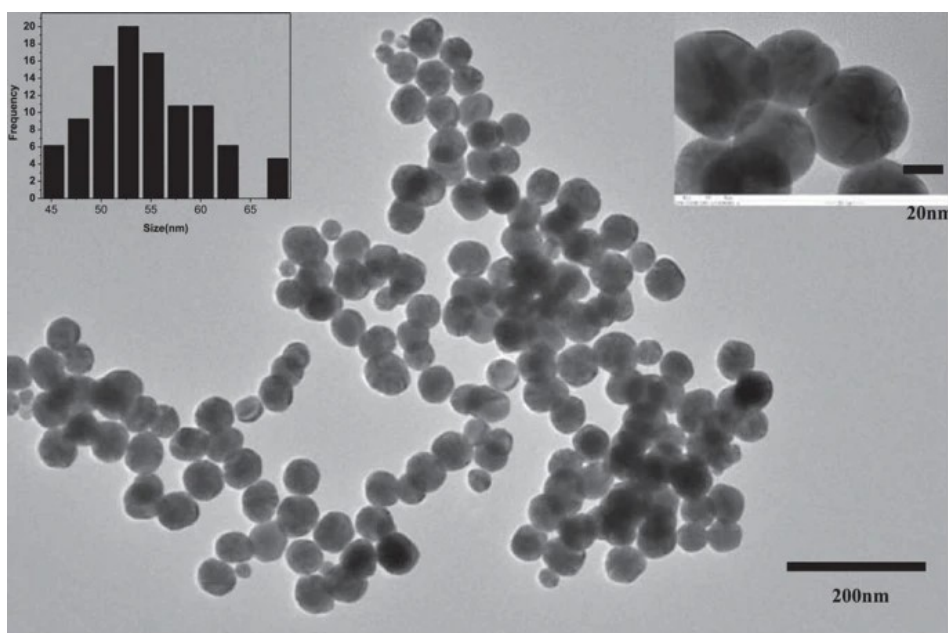


РИСУНОК 51. ПЭМ-фотография золотых наночастиц [Chen, 2014]

Существует целый ряд колориметрических тест-систем, основанных на феномене агрегации золотых наночастиц (рис. 52). При агрегации наночастиц, цвет их суспензий меняется от ярко-розового к темно-синему. Измеряя интенсивность поглощения суспензий наночастиц на 620 нм, можно количественно оценить концентрацию аналита в образце [Otsuka, 2001; Kim Thanh, 2002]. В качестве антианалитов, конъюгиро-

ванных с наночастицами, могут выступать моноклональные антитела, лектины, бактериальные белки А/Г, ДНК и др. Принцип этих анализов такой же, как и в агглютинационных тестах, с той лишь разницей, что визуальное агглютинация оценивается по изменению цвета суспензии.

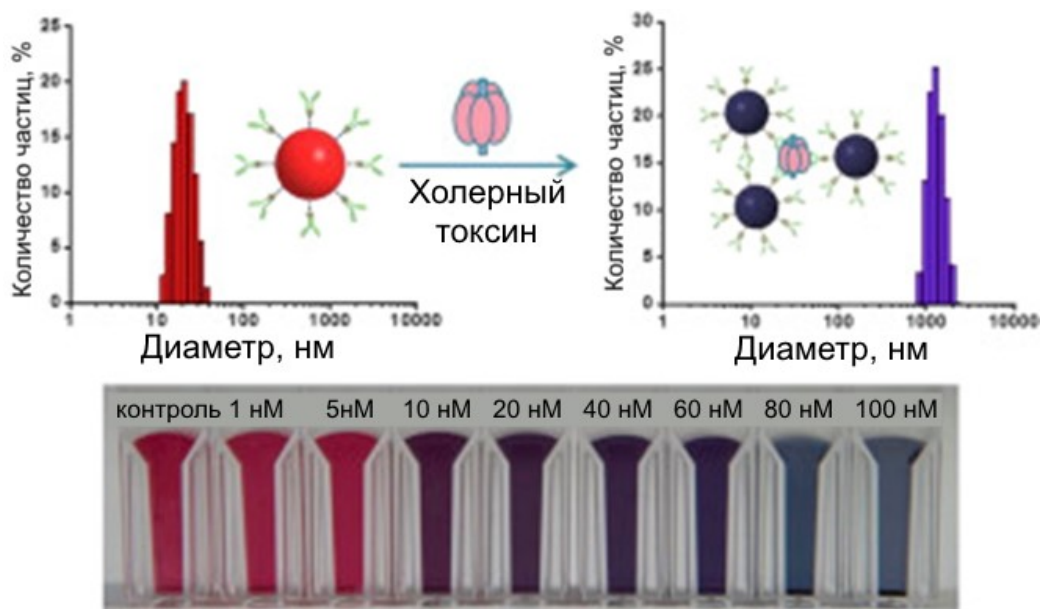


РИСУНОК 52. Агрегация золотых наночастиц, конъюгированных с антителами против холерного токсина под воздействием аналита.

В нижней части рисунка видна зависимость окраски суспензии от концентрации токсина [Khan, 2015]

Углеродные наночастицы

Наночастицы аморфного углерода, углеродные нанотрубки, производные графена, фуллерены используются в диагностических системах благодаря своим разнообразным физико-химическим свойствам – электропроводности, способности к люминесценции (наночастицы менее 10 нм размером, например графеновые наноточки), каталитической активности. В ряде случаев они играют роль носителей для молекул-меток (см. «**Диагностические реагенты, в которых наночастицы используются как носители метки и распознающих молекул**»). Мы остановимся в этом пособии лишь на рассмотрении наночастиц аморфного углерода, которые используются для создания колориметрических и флуоресцентных тестов.

Наночастицы аморфного углерода используются в качестве цветных меток в колориметрических анализах (рис. 53). Благодаря своей

насыщенной черной окраске они могут обеспечивать большую аналитическую чувствительность анализа в сравнении с золотыми наночастицами [Posthuma-Trumpie, 2012].

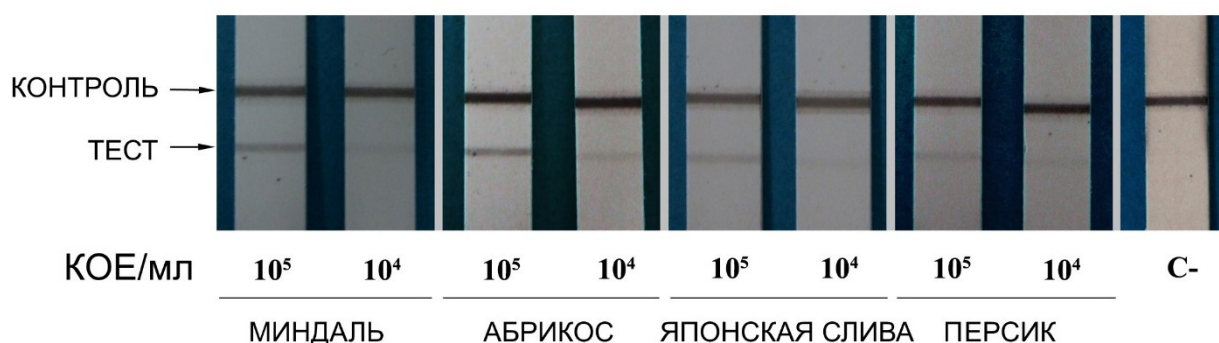


РИСУНОК 53. Результаты иммунохроматографических тестов на основе углеродных наночастиц; проводилось определение концентрации (в колонеобразующих единицах (КОЕ) на 1 мл) возбудителя заболеваний растений *Xanthomonas arboricola* в экстрактах миндаля, сливы, персика и абрикоса [López-Soriano, 2017]

Синтезируют наночастицы аморфного углерода при помощи сжигания органики. Полученная в ходе сжигания сажа (после серии отмывок различными растворителями), по сути своей, и состоит из наночастиц аморфного углерода. Для того чтобы получить конъюгаты наночастиц аморфного углерода с распознающими молекулами, существует несколько подходов. Наиболее часто аффинные соединения просто адсорбируют на поверхности наночастиц. Другой подход состоит в ковалентной пришивке молекул. Поверхность наночастиц аморфного углерода бедна функциональными группами, пригодными для такого типа конъюгирования, поэтому их предварительно вводят при помощи химической обработки наночастиц. Одним из наиболее популярных подходов является выдерживание наночастиц в смеси азотной кислоты и перекиси водорода. Воздействие этих окислителей приводит к появлению карбоксильных, гидроксильных и эпокси групп на поверхности наночастиц. Еще один способ заключается в адсорбции на поверхности наночастиц инертного полимера, к которому затем ковалентно присоединяют целевые распознающие молекулы.

Среди преимуществ наночастиц аморфного углерода следует отметить их низкую стоимость, простоту синтеза, высокую интенсивность окраски, устойчивость к воздействию физико-химических факторов;

гидрофобная поверхность наночастиц способствует эффективной адсорбции молекул.

Недостатками являются низкая стабильность некоторых типов наночастиц в водной среде. Для стабилизации их зачастую требуется добавление поверхностно-активных веществ. Малое количество функциональных групп усложняют ковалентное прикрепление молекул к углеродным наночастицам. Если говорить о применении наночастиц в производстве, то сухие наночастицы аморфного углерода могут представлять опасность для дыхательных путей при длительной экспозиции. Высокая способность к адсорбции делает эти наночастицы непригодными для анализов, в которых используются автоматические дозирующие устройства, микрофлюидные системы, поскольку будет происходить их загрязнение.

Есть многочисленные примеры использования наночастиц аморфного углерода в дот-иммуноаналитических, иммунохроматографических, иммунофильтрационных тестах. Разработаны анализы, в которых углеродные наночастицы используются для детекции ампликонов в ПЦР и реакциях изотермической амплификации ДНК. Такие тест-системы могут быть использованы для молекулярной диагностики в полевых лабораториях в комплексе с портативными ПЦР-амплификаторами, например при вспышках эпидемий, подобных лихорадке Эбола.

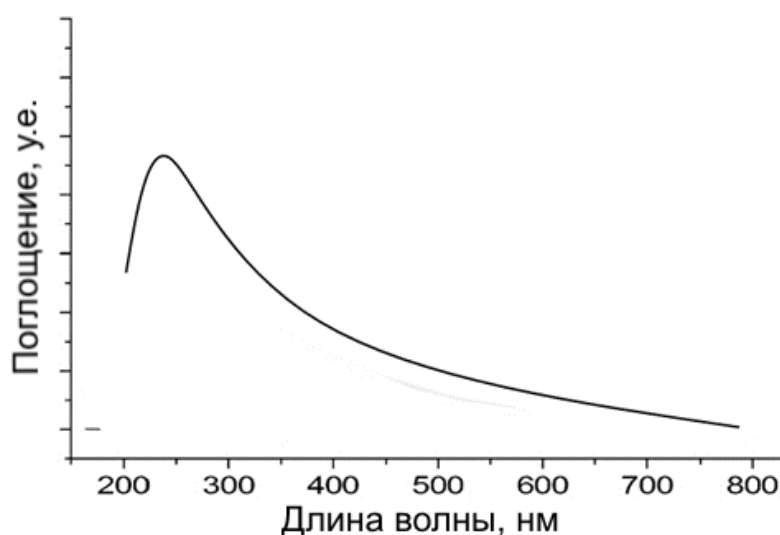


РИСУНОК 54. Спектр поглощения углеродных наночастиц (аморфный углерод) в УФ и видимом диапазоне

Углеродные наночастицы являются «гасителями» во флуоресцентных анализах, основанных на феномене Фёрстеровского резонансного переноса энергии. Они поглощают излучение в широком диапазоне длин волн (300–800 нм), в который попадают пики эмиссии подавляющего большинства современных флуорохромов (рис. 54). В связи с этим в последнее время они находят применение в гомогенных и гетерогенных анализах в качестве «гасителей» флуоресценции (рис. 55).

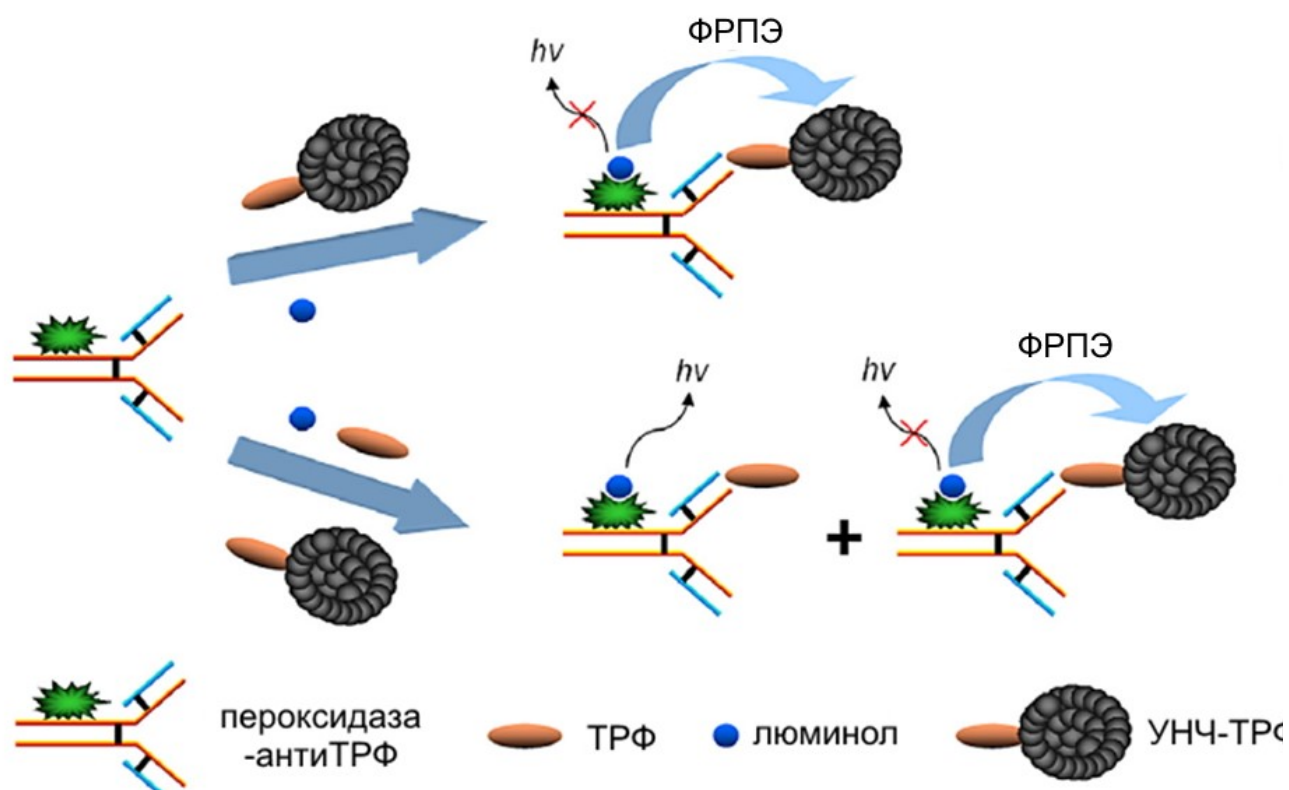


РИСУНОК 55. Конкурентный иммуноанализ трансферрина (ТРФ), основанный на гашении хемотрюминесценции углеродными наночастицами (УНЧ). При отсутствии в образце ТРФ меченные пероксидазой хрена антитела взаимодействуют с конъюгатами углеродных наночастиц и ТРФ, при добавлении люминола люминесценция тушится за счет Фёрстеровского резонансного переноса энергии (ФРПЭ). При наличии ТРФ в образце часть меченных антител не взаимодействуют с углеродными конъюгатами, и определенная доля люминесценции не подвергается гашению. Таким образом, чем больше в образце ТРФ, тем выше интенсивность люминесценции [Gao, 2014]

Нанозимы – наночастицы с каталитической активностью, подобной ферментативной

Пероксидаза хрена катализирует окисление перекисью водорода некоторых бесцветных субстратов, продукты которых имеют различную окраску, в частности ТМБ, ортофенилендиамин (ОФД), диаминобензидин (ДАБ) и др. Этот фермент является одним из самых востребованных в области разработки иммуноферментных тест-систем. В 2007 г. была продемонстрирована пероксидазоподобная активность наночастиц оксида железа [Gao, 2007], что стимулировало многочисленные исследования, направленные на поиск и изучение аналогичных свойств у различных наноматериалов. В своей работе Gao и соавторы показали зависимость активности наночастиц от их размеров: с уменьшением размеров (увеличением удельной площади поверхности) их каталитическая активность возрастала (рис. 56). Ключевую роль в функционировании наночастиц играют атомы железа, которые присутствуют и в активном центре самой пероксидазы. Фермент многократно увеличивает каталитическую активность атома железа, входящего в состав гема. В наночастицах каждый атом железа отдельно имеет намного меньшую активность, но благодаря их огромному количеству достигается схожий эффект. Стоит отметить, что наночастицы, как правило, имеют меньшую активность в сравнении с пероксидазой хрена, хотя есть и исключения, например наночастицы на основе берлинской лазури, синтезированные в МГУ [Komkova, 2018]. Увеличение каталитической активности наночастиц достигается за счет изменения их состава, а также путем модификации их поверхности.

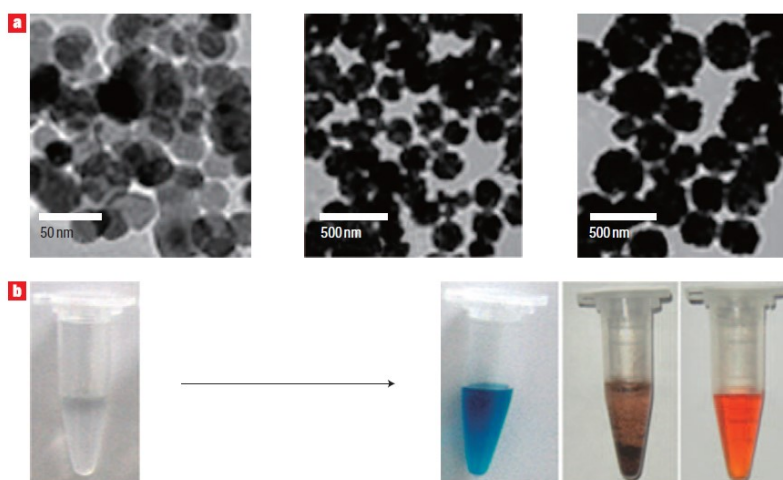


РИСУНОК 56. Наночастицы Fe_3O_4 размером 30, 150 и 300 нм (а), конверсия бесцветных субстратов ТМБ, ДАБ и ОФД в окрашенные продукты в присутствии наночастиц Fe_3O_4 (b) [Gao, 2007]

Золотые наночастицы, как и наночастицы меди, железа, платины, серебра и др., а также оксидов и солей металлов (Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , FeS , CuO , CuS , V_2O_5 , CeO_2 , MnO_2), обладают пероксидазоподобной активностью, что позволяет создавать на их основе колориметрические тесты, подобные иммуноферментным. Кроме того, такое свойство позволяет усиливать сигнал колориметрических тестов, основанных на природной окраске наночастиц, в частности иммунохроматографических тестов, путем инкубации тест-полоски в растворе субстрата. Различные наночастицы, кроме того, являются миметиками других ферментов (глюкозооксидазы, лактазы, глутатионпероксидазы, каталазы и др.), в связи с чем они могут быть использованы в колориметрических тестах в комплексе с ферментами для катализа каскада реакций, в электрохимических сенсорах, для идентификации низкомолекулярных веществ (активных форм кислорода, АТФ, ионов), а также в качестве катализаторов в органическом синтезе и других отраслях промышленности.

Главная особенность ферментов – высочайшая каталитическая активность. Наночастицы, как было сказано выше, обычно менее эффективны. Преимущества наночастиц состоят в том, что они могут быть получены методом химического синтеза, причем зачастую с использованием недорогих и доступных реагентов, их не нужно выделять из живых организмов, что облегчает и удешевляет производство. Наночастицы, как правило, менее чувствительны к колебаниям pH и температуры, что расширяет диапазон их применения, упрощает условия хранения и увеличивает срок годности. Активность наночастиц можно регулировать при помощи модификации их поверхности и состава. Кроме того, многие наночастицы помимо каталитической, обладают и другими свойствами (например, наночастицы оксида железа являются магнитными), что позволяет реализовывать мультимодальные системы анализа (например, колориметрический анализ + флуоресценция), а также использовать наночастицы как для предварительного концентрирования образца, так и для детекции аналита (см. магнитные наночастицы).

Магнитные наночастицы

Магнитные наночастицы на основе железа, никеля, кобальта, их оксидов и сплавов широко используются в иммуноанализах. Существуют две основные стратегии их применения – использование их в качестве

метки благодаря их уникальным магнитным [Schrittwieser, 2016] или иным физико-химическим свойствам, а также использование их для предварительного концентрирования аналита, содержащегося в образце [Matta, 2018]. Повышение чувствительности анализа достигается как за счет увеличения концентрации аналита, так и за счет снижения эффектов матрикса, из которого аналит был извлечен [Giri, 2016]. Под эффектами матрикса понимается содержание в образце различных примесей, которые могут повлиять на специфичность или чувствительность анализа, в частности билирубин, гемоглобин, остатки лизированных клеток и т. п. Магнитные наночастицы позволяют одновременно сконцентрировать аналит и удалить эти примеси (рис. 57). Такой подход предоставляет возможность обнаруживать аналиты, присутствующие в образце в сверхмалых концентрациях.

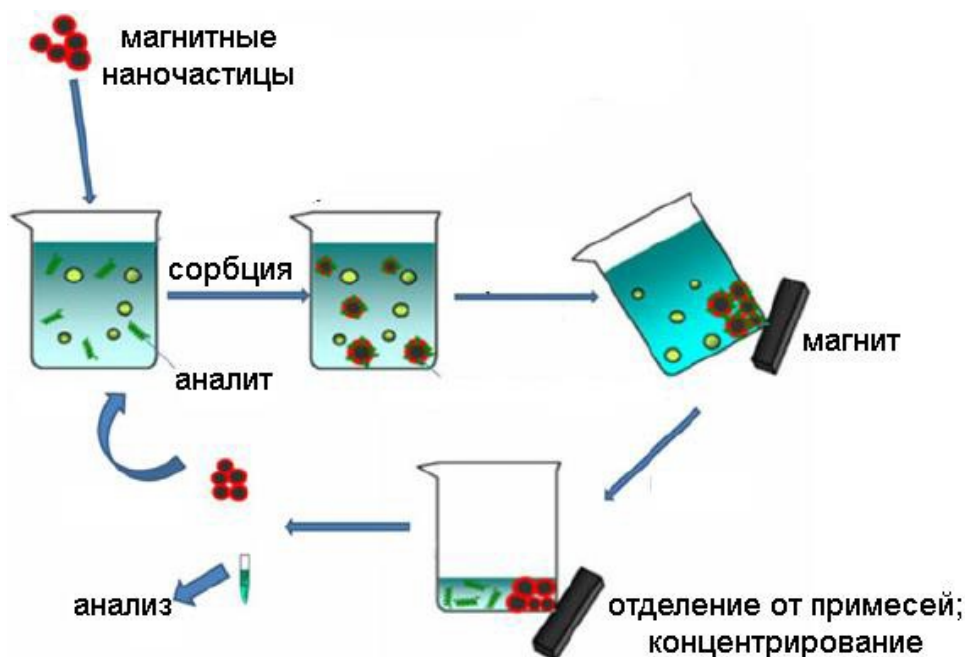


РИСУНОК 57. Предварительное концентрирование аналита при помощи магнитных наночастиц [Xie, 2014]

Мы не будем останавливаться на разборе природы магнитных феноменов, перспективных для создания средств лабораторной диагностики. Упомянем лишь один из них – способность магнитных наночастиц различного размера в разной степени влиять на T2-релаксацию протонов. В основе этого метода лежит принцип ядерно-магнитного резонанса (ЯМР), который используется в магнитно-резонансной томографии (МРТ). Диагностические системы на основе ЯМР коммерчески доступны

и используются главным образом для идентификации бактерий (рис. 58). Для понимания того, как они устроены, кратко разберем, как работает МРТ.



РИСУНОК 58. Прибор для ЯМР-анализа [www.t2biosystems.com]

Если поместить человека в магнитное поле томографа, то можно получить объемное изображение его органов и тканей, которые имеют более темную или более светлую окраску. Степень окраски определяется свойствами тканей – ее типом, плотностью, обводненностью и т. д. Откуда берется сама окраска? Всякая ткань человека содержит протоны, которые, будучи заряженными частицами, имеют и некоторый магнитный момент. Магнитное поле томографа упорядочивает их магнитные моменты, они становятся однонаправленными (как стрелки множества компасов поворачиваются строго с юга на север). Далее аппарат генерирует высокочастотный импульс, который воздействует на протоны тканей и сдвигает их магнитные моменты, делая их разнонаправленными. Через некоторое время (время релаксации или T_2) эти магнитные моменты вновь восстановятся. Это время будет различным для протонов разных тканей и будет зависеть от их микроокружения, структуры ткани и т. д. Изображение, которое выдает томограф, как раз и отражает различия времени релаксации (T_2) протонов разных тканей, что позволяет судить об их природе, структуре, выявлять неоднородности (поврежде-

ния, опухоли). Еще одним фактором, который изменяет T2 протонов, является присутствие вблизи них магнитных наночастиц разного размера, а также распределение этих наночастиц в объеме жидкости (рис. 59). Именно это и используется в иммуноанализе.

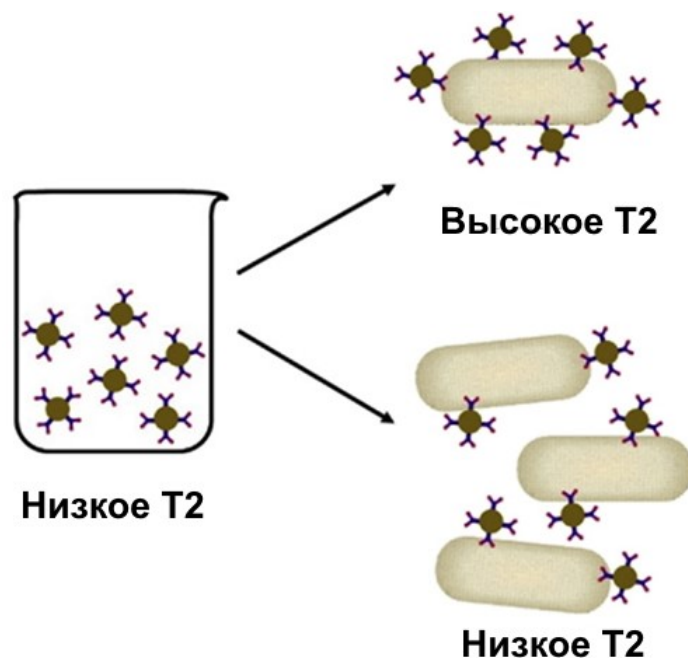


РИСУНОК 59. Принцип детекции бактерий *Listeria monocytogenes* в молоке. При малом количестве бактерий к каждой из них прикрепляется много частиц, вследствие чего они находятся близко друг к другу, что приводит к существенному повышению T2 протонов. В обратной ситуации наночастицы находятся на расстоянии друг от друга, что приводит к падению T2 [Zhao, 2017]

Флуоресцентные наночастицы

Наночастицы, предназначенные для флуоресцентных анализов, весьма многочисленны как по своей структуре, так и по типу флуоресценции. Традиционно в качестве флуоресцентных меток используются органические красители, такие как флуоресцеин или родамин. Для них характерен достаточно малый Стоксов сдвиг, склонность к фотообесцвечиванию, а также снижение интенсивности флуоресценции при агрегации. Флуоресцентные наночастицы имеют более высокую фотостабильность и яркость, чем обычные флуорохромы. Кроме того, они позволяют манипулировать этими свойствами за счет изменения своей структуры и размеров. Многие наноматериалы обладают уникальными флуоресцентными свойствами, которых нет у традиционных флуорохромов.

Флуоресцентные наночастицы на основе полимеров (полиметакрилата, полиакрилата, полистирола и др.) являются сложными по составу комплексами, образованными полимерной массой, внутри которой находятся ковалентно или нековалентно соединенные с ней молекулы флуоресцентных красителей (рис. 60). Еще одним подходом является ковалентная пришивка флуорохромов к готовым наночастицам. Полимеры имеют в своем составе множество функциональных групп, позволяющих присоединить множество молекул красителей, что обеспечивает высокую яркость наночастиц. Кроме того, те же функциональные группы можно использовать для конъюгирования с распознающими молекулами.

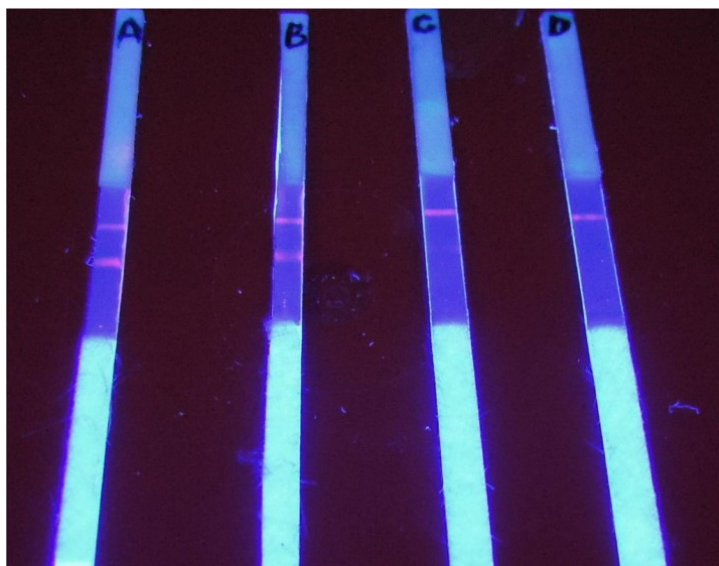


РИСУНОК 60. Иммунохроматографические тест-полоски, в качестве диагностического реагента использованы флуоресцентные наночастицы на основе полистирола

Нековалентное инкапсулирование красителей внутри наночастиц может сопровождаться постепенным их выходом из наночастицы в окружающий раствор, т. е. попросту утечкой красителей, что приводит к снижению их яркости (рис. 61). В связи с этим нужно использовать либо красители с крайне низкой растворимостью в воде, либо ковалентно пришивать красители к полимеру. Последнее требует введения в структуру красителей соответствующих функциональных групп, что приводит к усложнению процесса синтеза наночастиц и его удорожанию.

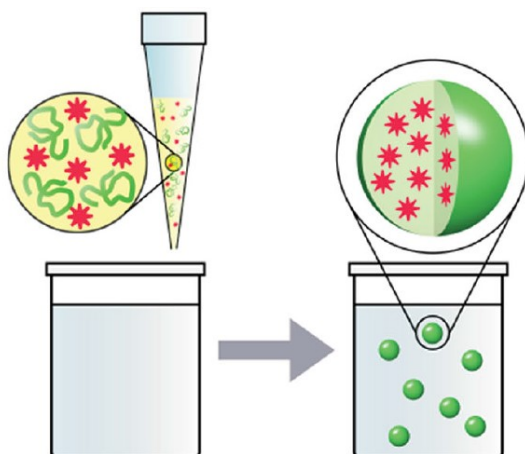


РИСУНОК 61. Нанопреципитация – один из простейших методов синтеза флуоресцентных полимерных наночастиц. Смесь красителя и полимера, растворенных в растворителе 1, добавляют в растворитель 2. Растворители подбираются таким образом, что растворимость их в растворителе 1 высокая, а в растворителе 2 – очень низкая. При попадании смеси в растворитель 2 вследствие низкой растворимости полимер и краситель агрегируют, формируя наночастицы. Размер наночастиц можно регулировать, меняя условия синтеза (из [Reisch, 2016] с изм.)

Еще одной проблемой является гашение флуоресценции, обусловленное агрегацией флуорохромов. При высокой концентрации молекул красителя внутри наночастиц происходит их агрегация, приводящая к снижению интенсивности флуоресценции. Одним из решений является использование красителей с **АИЕ-эффектом** (от англ. *Aggregation Induced Emission* – эмиссия, вызванная агрегацией). Эти красители не флуоресцируют в свободном состоянии, но флуоресцируют при агрегации, вызванной выпадением в осадок в «плохом» растворителе. Этот эффект основан на том, что в структуре таких молекул присутствуют С–С связи, вокруг которых происходит свободное вращение отдельных частей молекулы. При ограничении этого вращения, вызванного агрегацией молекул, избыток энергии, полученной от возбуждающего излучения, расходуется на флуоресценцию (рис. 62).

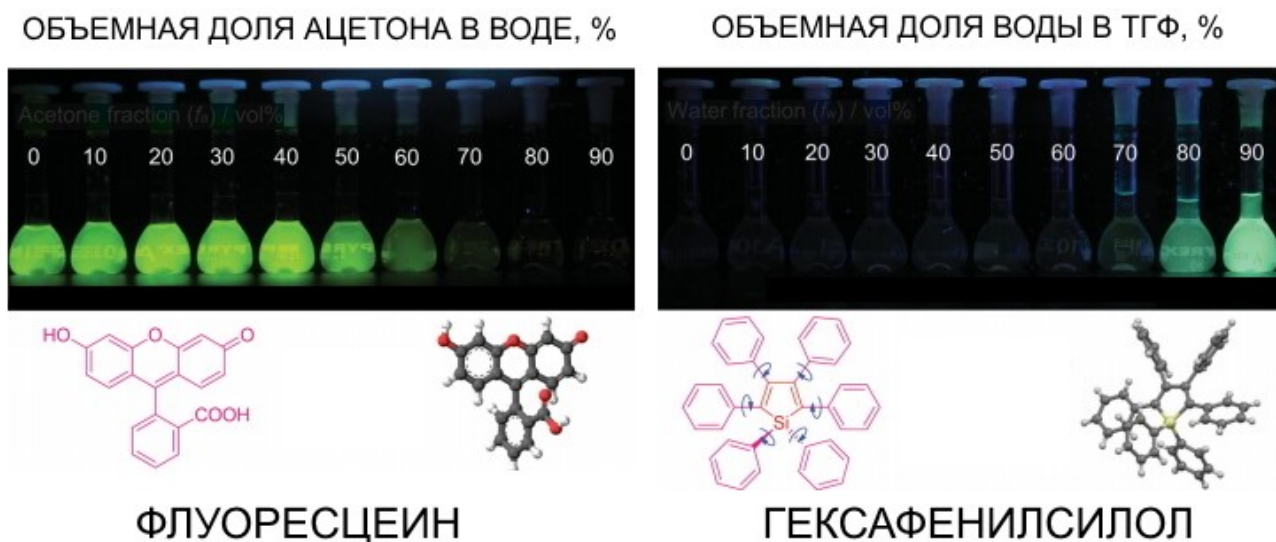


РИСУНОК 62. Снижение флуоресценции флуоресцеина из-за агрегации в растворах нарастающей концентрацией ацетона, в котором он плохо растворяется (слева), нарастание флуоресценции гексафенилсилола вследствие агрегации в растворах с высокой концентрацией воды. В структуре гексафенилсилола присутствуют многочисленные одинарные С–С связи (молекула имеет форму «пропеллера») (из [Mei, 2014] с изм.)

Ключевыми особенностями АIE-флуорохромов являются высокая яркость флуоресценции, устойчивость к фотообесцвечиванию, а также большой Стоксов сдвиг, не характерный для традиционных флуорохромов [Mei, 2014]. Большой Стоксов сдвиг позволяет снизить эффект от фоновой флуоресценции образца, а также является весьма удобным для применения в гомогенных анализах, основанных на эффекте Фёрстеровского резонансного переноса энергии, [He, 2020].

Квантовые точки – это полупроводниковые наночастицы размером, как правило, от 1 до 10 нм, состоящие из CdTe, CdSe, CdS, ZnSe, ZnS, PbS, PbSe и SnTe. Они могут включать такие элементы, как индий и галлий. Зачастую квантовые точки покрыты оболочкой, состоящей, например, из ZnS. Они могут быть модифицированы различными полимерами и функциональными группами, облегчающими их конъюгирование с распознающими молекулами.



РИСУНОК 63. Флуоресценция квантовых точек

Ключевыми особенностями квантовых точек являются высокая яркость люминесценции (рис. 63) и высокий квантовый выход, стабильность к химическим воздействиям, устойчивость к фотообесцвечиванию. Квантовые точки имеют широкий спектр абсорбции, но узкие спектры эмиссии. Это позволяет разрабатывать мультиплексные диагностические системы, поскольку различные типы квантовых точек возбуждаются от одного источника света, при этом свечение их хорошо различается ввиду узких неперекрывающихся спектров. Квантовые точки излучают как в видимом, так и в ближнем инфракрасном диапазоне. Спектр их эмиссии может контролироваться при помощи изменения их размеров, формы, химического состава [Cardoso Dos Santos, 2020].

Существенным недостатком квантовых точек является их токсичность, что делает их попадание в живые организмы и окружающую среду весьма нежелательным событием [Filali, 2020]. Это накладывает ограничения на их практическое применение, поскольку приводит к проблемам на всех стадиях внедрения диагностических систем на их основе: производство квантовых точек и тест-систем столкнется с проблемами утилизации отходов и организацией безопасности сотрудников. Лаборатории, использующие тест-системы должны особым образом организовывать утилизацию тест-систем, лаборантам необходимо тщательно соблюдать технику безопасности при работе с токсичными препаратами на основе квантовых точек. Эти факторы, хотя и не имеют непосредственного отношения к эффективности тест-систем на основе квантовых точек, могут существенно повлиять на перспективы их внедрения в клиническую практику.

Еще одним типом флуоресцентных наночастиц являются наночастицы на основе переходных металлов, а именно лантанидов, а также иттрий и скандий. Одним из свойств этих элементов является способность к ап-конверсии – поглощению нескольких фотонов с низкой энергией и эмиссией одного фотона, но с более высокой энергией. Таким образом, длина волны эмиссии у них меньше, чем длина волны возбуждения в противоположность традиционным флуорохромам [Wen, 2018]. Наночастицы с ап-конверсией, как правило, состоят из атомов, выполняющих три разные функции (рис. 64). Первые составляют основу наночастицы, они осуществляют пространственную организацию для атомов, играющих роль активаторов и усилителей, а также обеспечивают транспорт электронов внутри наночастицы. Важным условием при подборе этих атомов является стабильность наночастицы в окружающей среде. Основу наночастиц обычно составляют Y_2O_3 , Y_2O_2S , LaF_3 , $NaYF_4$, $NaGdF_4$ [Wang, 2010]. Атомы-активаторы непосредственно осуществляют ап-конверсию, атомы-усилители же делают ее более интенсивной. Активаторами могут быть любые лантаниды, но обычно это катионы Er^{3+} , Tm^{3+} или Ho^{3+} , роль усилителя зачастую выполняет ион Yb^{3+} .

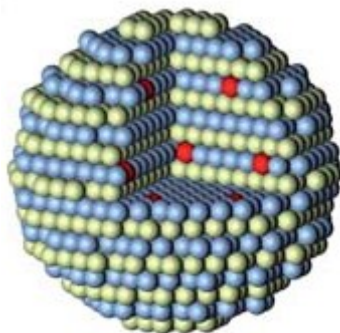


РИСУНОК 64. Структура наночастиц, способных к ап-конверсии: голубым и желтым цветом изображены атомы переходных и других элементов, составляющих основу наночастицы. Красным – атомы, играющие роль активаторов и усилителей (из [Wang, 2010])

Особенностями наночастиц с ап-конверсией (рис. 65) является то, что они обладают уникальным антистоксовым сдвигом, который не характерен для большинства флуоресцирующих молекул. Спектр возбуждения наночастиц находится в ближней ИК-области, а спектр эмиссии зависит от структуры наночастиц. Спектры эмиссии и возбуждения яв-

ляются очень узкими (10–20 нм), что с одной стороны способствует созданию мультиплексных диагностических систем (ввиду неперекрывающихся спектров эмиссии разных наночастиц), с другой – вынуждает подбирать такие источники возбуждающего излучения, длина волны которых совпадает с узкой областью возбуждения наночастиц, что не всегда просто. Основным преимуществом антистоксова сдвига является снижение влияния аутофлуоресценции молекул окружающей среды, что способствует уменьшению фонового сигнала, особенно в гомогенных анализах с использованием неразведенных образцов (многие белки и пигменты могут флуоресцировать и создают существенный фоновый сигнал). Это приводит к повышению аналитической чувствительности и специфичности за счет увеличения соотношения «сигнал/шум». Кроме того, большинство биомолекул не поглощают излучение в ближней ИК-области, что дополнительно снижает интенсивность аутофлуоресценции.

Дополнительным преимуществом является способность наночастиц с ап-конверсией флуоресцировать в течение длительного времени. Флуоресценция традиционных флуорохромов и многих биомолекул затухает спустя несколько микросекунд, люминесценция лантанидов намного более длительная: она детектируется спустя сотни микросекунд с момента возбуждения. Это позволяет «отсекать» фоновую флуоресценцию образца, дополнительно увеличивая соотношение «сигнал/шум». Другими преимуществами наночастиц с ап-конверсией являются высокая физико-химическая стабильность и устойчивость к фотообесцвечиванию.

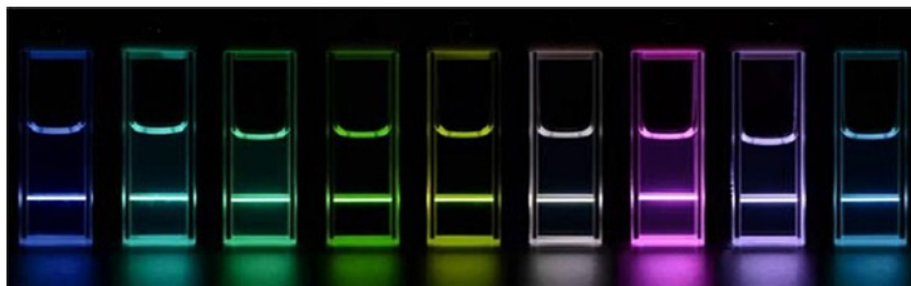


РИСУНОК 65. Люминесценция наночастиц с ап-конверсией, допированных атомами различных редкоземельных элементов [Singh, 2019]

Способность лантанидов к **длительной люминесценции** реализуется не только путем включения их в состав наночастиц с ап-конверсией, но и при помощи создания на их основе наночастиц, обладающих способностью к долгоживущей флуоресценции, но имеющей традиционный Стоксов сдвиг (рис. 66). Одна из проблем практического применения наночастиц с ап-конверсией состоит в том, что на данный момент на рынке нет достаточного количества приборов, способных ее детектировать, поскольку большая часть флуориметров ориентирована на традиционные флуорохромы, особенно это касается приборов, адаптированных для биологии и медицины [Gnach, 2012]. Даже с использованием таких приборов можно реализовать преимущества лантанидов. Для этого можно использовать комплексы на основе лантанидов и молекул-антенн.

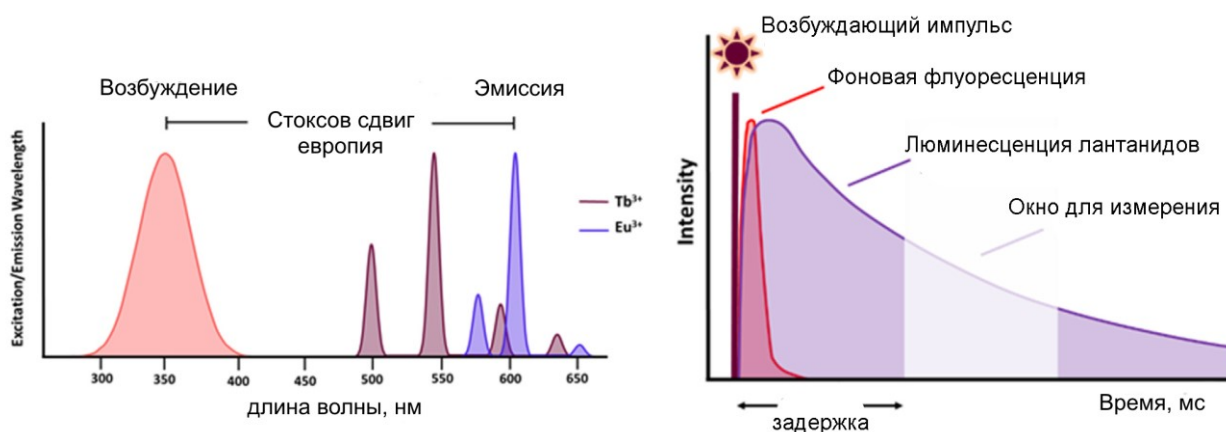


РИСУНОК 66. Пики возбуждения и эмиссии флуорохромов на основе Eu^{3+} и Tb^{3+} (слева), принцип измерения флуоресценции с временной задержкой (справа)

Катионы лантанидов, такие как Eu^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , Sm^{3+} , способны к люминесценции, однако их способность к поглощению света очень мала, вследствие чего интенсивность флуоресценции также слишком слаба для практического применения. Решением является использование комплексов катионов лантанидов и молекул-антенн, обладающих выраженной способностью к поглощению света. Такие молекулы, кроме того, должны иметь способность хелатировать катион лантанида. В качестве молекул-антенн используют традиционные хелаторы (например, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота (ДОТА), диэти-

лентриаминпентауксусная кислота (ДТПА)), модифицированные ароматическими группировками, бета-дикетонаты, а также ароматические хелаторы, например 1,10-фенантролин [Nagan, 2011]. Ароматические группы должны быть расположены вблизи от атома лантанида для эффективного переноса энергии излучения с антенны на атом лантанида (рис. 67).

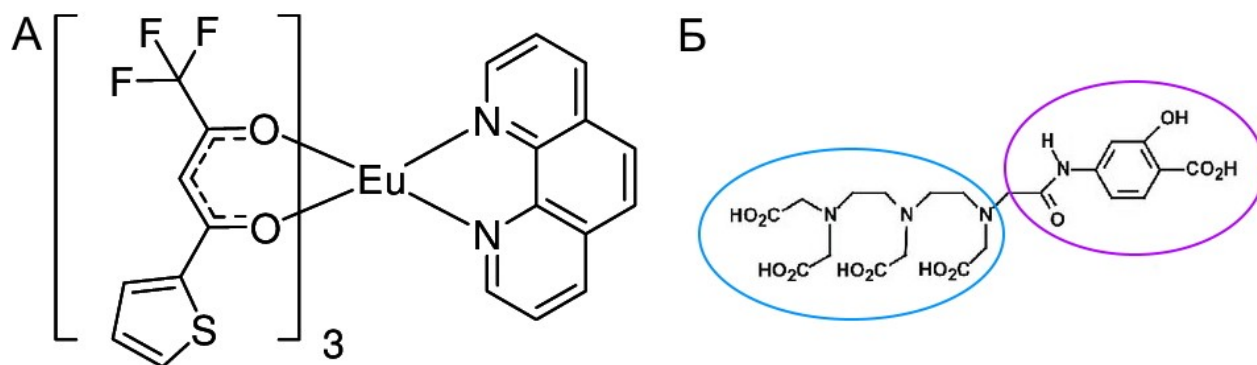


РИСУНОК 67. А – комплекс европия с двумя популярными молекулами-антеннами: 1-(теонил)-3,3,3-трифторацетоном (слева) и 1,10-фенантролином (справа); Б – молекула-антенна на основе ДТПА (голубой овал), модифицированного ароматическим соединением (фиолетовый овал). Карбоксильные группы участвуют в хелатировании катиона, ароматическая группа является антенной

Одним из наиболее популярных способов использования комплексов на основе лантанидов является их встраивание в состав наночастиц-носителей, например наночастиц кремния. В этом случае молекула-антенна используется еще и для прикрепления комплекса к кремнийсодержащей группе.

Диагностические реагенты, в которых наночастицы используются как носители метки и распознающих молекул

Эффективным способом усиления сигнала является использование наночастиц, конъюгированных с распознающими молекулами (антителами, аптамерами) и сигнальными (репортерными) молекулами (ферментами, флуорофорами). Усиление сигнала достигается главным образом за счет увеличения количества сигнальных молекул, связанных с твердой фазой. Большая площадь поверхности наночастиц обеспечивает высокий уровень их загрузки сигнальными и распознающими молекулами (рис. 68). Связывание одной наночастицы с твердой фазой приво-

дит к тому, что в работу включаются десятки молекул-меток, что приводит к кратному усилению сигнала. Наиболее часто в качестве носителей используются золотые, магнитные, кремниевые, углеродные наночастицы и нанотрубки, а также нанопластины графена.

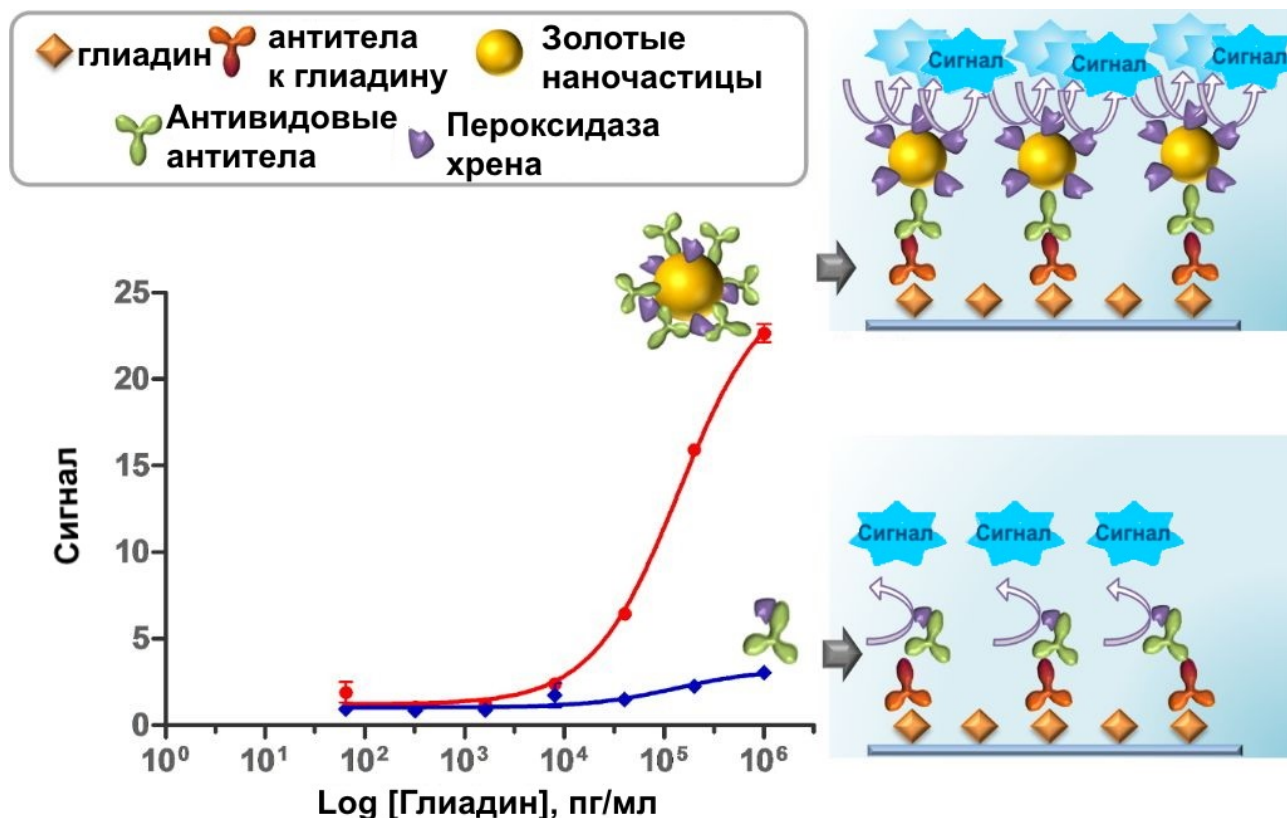


РИСУНОК 68. Использование золотых наночастиц в качестве носителей метки и распознающих молекул для усиления сигнала в непрямом ИФА антител к глиадину. Синяя кривая – калибровочная кривая, полученная с использованием традиционного ферментного конъюгата, красная – с использованием золотых частиц в качестве носителей [Ciaurriz, 2017]

Еще одним способом усиления сигнала является синтез наночастиц из веществ, играющих роль меток. В частности, в электрохимических сенсорах используются наночастицы, состоящие из агрегировавших молекул ферментов, в частности все той же пероксидазы хрена. Использование наночастиц из белков-миметиков пероксидазы, в частности гемоглобина [Narwal, 2017], также является распространенным подходом. Еще одним подходом является синтез наночастиц из смеси ферментов и молекул инертного белка [Lee, 2019].

Факторы, препятствующие повсеместному использованию наноматериалов в диагностических системах

Несмотря на огромное количество научных публикаций, наночастицы все еще весьма ограничено используются в диагностических системах, несмотря на колоссальный потенциал. Путь от лабораторного стола до коммерческого тест-набора весьма непрост [Agrahari, 2018]. В большинстве научных публикаций, описывающих создание тест-систем на основе перспективных наноматериалов, синтезируются небольшие партии наночастиц, сам процесс синтеза ограничен миллиграммовыми количествами. Для коммерческих целей необходимо производить наночастицы в граммовых и килограммовых объемах. Следовательно, требуется **масштабируемость** технологии синтеза [Landesman-Milo, 2016]. Как правило, при простом увеличении объема используемых реагентов происходит изменение качеств синтезируемых наночастиц: они имеют другие размеры, иногда немного другие физико-химические свойства, а иногда масштабирование и вовсе не приводит к получению наночастиц. На результат синтеза влияет множество факторов: объем емкости, темп перемешивания, температура, точное соотношение компонентов. В большой и малой емкости скорости диффузии реагентов могут отличаться. Чтобы их сделать сравнимыми, нужно подбирать новые условия перемешивания, возможно, и вовсе использовать иной тип реактора.

Из проблемы масштабирования вытекает еще одна – **сложность** синтеза. Способ синтеза наночастиц и их конъюгирования с распознающими молекулами должен быть насколько можно прост, затраты энергии должны быть минимизированы, количество технически сложных процедур должно быть сведено к минимуму, поскольку в ходе масштабирования они могут еще более усложниться. Существенную роль играет и **воспроизводимость** результатов синтеза наночастиц. Свойства и структура итоговых наночастиц должны иметь минимальные различия от партии к партии. Для соблюдения описанных требований необходимо хорошо понимать влияние различных факторов на свойства наночастиц и иметь возможность контролировать соблюдение всех необходимых условий при переходе от лабораторного масштаба к пилотному полупромышленному и промышленному масштабу.

Стабильность наночастиц при хранении является еще одним необходимым условием их успешного внедрения. Традиционные ИФА-

наборы, например, имеют сроки годности в районе 6–12 месяцев, схожие сроки годности имеют и другие тест-наборы (например, агглютинационные). Большой срок годности необходим для практического применения тест-наборов, поскольку существенное время может пройти от момента его производства до применения конечным пользователем (транспортировка, хранение на складах, хранение в лаборатории до момента использования). Если набор не был использован сразу целиком, потребителям хочется не покупать новый, а полностью использовать уже купленный. Тест-наборы обычно хранятся и транспортируются при температурах от +2 до +8 °С, при этом периодически они могут подвергаться воздействию повышенных или пониженных температур. Распознающие молекулы, с которыми конъюгированы наночастицы, наиболее стабильны в буферных растворах с нейтральной рН. В определенных условиях для увеличения стабильности конъюгатов эти растворы могут содержать различные стабилизаторы и консерванты. Все перечисленные факторы не должны влиять на свойства наночастиц.

Проблемы, связанные с **безопасностью** наночастиц, уже обсуждались нами в разделе, посвященном квантовым точкам. Все описанное там применимо и к другим наноматериалам: при разработке наночастиц весьма желательно использовать нетоксичные реагенты, продумывать вопросы, связанные с утилизацией наночастиц, их влиянием на здоровье человека и окружающую среду.

Внедрение наноматериалов в практику замедляется, поскольку в настоящее время нет четкой **законодательной базы**, что во многом связано с отсутствием единого определения термина «наночастица», а также единых требований к способам их характеристики и тем параметрам, которым они должны соответствовать. Важно еще и то, что **авторские права** на многие технологии синтеза наночастиц и технические решения так же, как и сами продукты на основе наночастиц, кому-то принадлежат [Ниа, 2018]. Это ограничивает коммерциализацию этих технологий и продуктов третьими лицами. Например, при разработке новой диагностической системы на основе наночастиц и аптамера может оказаться, что технологии создания наночастиц и аптамера по отдельности уже запатентованы, хотя совместно в диагностических целях они никогда не использовались и конъюгат на их основе является сам по себе абсолютно новым продуктом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные диагностические системы, основанные на стереоспецифических взаимодействиях, позволяют обнаруживать разнообразные аналиты в очень малых концентрациях за считанные часы и даже минуты. Тем не менее опыт эпидемий таких заболеваний, как лихорадка Эбола, лихорадка Денге, Covid-2019, наглядно демонстрирует недостатки современной системы здравоохранения в области *in vitro* диагностики – длительность и высокая стоимость разработки новых тест-систем, особенно предназначенных для экспресс-диагностики, недостаточное качество таких экстренных разработок. А ведь именно экспресс-тесты прежде всего востребованы в условиях, когда счет идет на часы, когда в ближайшей доступности нет оснащенных лабораторий, когда медперсонал перегружен и не в силах оперативно проводить трудоемкие анализы. Именно разработка новых форматов экспресс-тестов, увеличение их мультиплексности, гибкости должно стать одним из трендов современной медицинской диагностики.

Необходимы дешевые и простые реагенты, которые могли бы стать альтернативой прекрасно работающим, но все еще дорогостоящим моноклональным антителам, которые являются основой большинства современных тест-систем. Возможно, в будущем их место займут аптамеры, молекулярно-импринтированные полимеры или же другие, более совершенные, распознающие элементы.

Более активно должен быть использован потенциал новых материалов, в том числе и наночастиц. Их уникальные физико-химические свойства могут позволить улучшить аналитические характеристики тест-систем, снизить их себестоимость и стимулировать разработку новых, ранее недоступных форматов анализа, особенно в сочетании с применением мощных портативных электронных устройств. Подобные тест-системы будут востребованы не только в специализированных лабораториях, но и на дому (у кровати больного), на производстве, на фермах, одним словом там, где они более всего нужны.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСМ – атомно-силовая микроскопия
АТФ – аденозинтрифосфат
ДАБ – диаминобензидин
ДОТА – 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота
ДТПА – диэтилентриаминпентауксусная кислота
ИФА – иммуноферментный анализ
КОЕ – колонеобразующие единицы
МИП – молекулярно-импринтированные полимеры
МРТ – магнитно-резонансная томография
ОФД – ортофенилендиамин
ПСА – простатспецифический антиген
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
СО – стандартное отклонение
СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
T₂ – время релаксации протонов
ТМБ – тетраметилбензидин,
ТРФ – трансферрин
УНЧ – углеродные наночастицы
ФРПЭ – Фёрстеровский резонансный перенос энергии
ХГЧ – хорионический гонадотропин
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
ЯМР – ядерно-магнитный резонанс
AFB₁ – афлатоксин В₁
AIE – эмиссия, вызванная агрегацией
CH – констатный фрагмент тяжелой цепи,
CL – констатный фрагмент легкой цепи
DLS – динамическое светорассеяние
ОТА – охратоксин А
ScFv – одноцепочечные переменные фрагменты
SELEX – систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении
VH – переменный фрагмент тяжелой цепи
VL – переменный фрагмент легкой цепи
ZEA – зеараленон

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Теория и практика иммуноферментного анализа / А. М. Егоров, А. П. Осипов, Б. Б. Дзантиев, Е. М. Гаврилова. Высшая школа. М., 1991. 288 с.

Agrahari V., Agrahari V. Facilitating the translation of nanomedicines to a clinical product: challenges and opportunities // Drug Discovery Today. 2018. № 23 (5). P. 974–991. DOI: 10.1016/j.drudis.2018.01.047.

Ansari S., Masoum S. Molecularly imprinted polymers for capturing and sensing proteins: Current progress and future implications // TrAC – Trends in Analytical Chemistry. 2019. № 114. P. 29–47. DOI: 10.1016/j.trac.2019.02.008.

Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? // Journal of Controlled Release. 2016. № 235. P. 337–351. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.

Cardoso Dos Santos M., Algar W.R., Medintz I.L., Hildebrandt N. Quantum dots for Förster Resonance Energy Transfer (FRET) // TrAC – Trends in Analytical Chemistry. 2020. № 125. P. 115–819. DOI: 10.1016/j.trac.2020.115819.

Castro A.R., Mody H.C., Parab S.Y., Patel M.T., Kikkert S.E., Park M.M., Ballard R.C. An immunofiltration device for the simultaneous detection of non-treponemal and treponemal antibodies in patients with syphilis // Sexually Transmitted Infections. 2010. № 86(7). P. 532–536. DOI: 10.1136/sti.2010.042937.

Chen F., Wang Y., Ma J., Yang G. A biocompatible synthesis of gold nanoparticles by Tris (hydroxymethyl) aminomethane // Nanoscale Research Letters. 2014. № 9(1). P. 220. DOI: 10.1186/1556-276X-9-220.

Chen Y., Chen Q., Han M., Zhou J., Gong L., Niu Y., Zhang Y., He L., Zhang L. Development and optimization of a multiplex lateral flow immunoassay for the simultaneous determination of three mycotoxins in corn, rice and peanut // Food Chemistry. 2016. № 213. P. 478–484. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.06.116.

Cheng H.-Y., Lai L.-J., Ko F.-H. Rapid and sensitive detection of rare cancer cells by the coupling of immunomagnetic nanoparticle separation with ELISA analysis // International Journal of Nanomedicine. 2012. № 7. P. 2967–2973. DOI: 10.2147/IJN.S32240.

Choe W., Durgannavar T.A., Chung S.J. Fc-binding ligands of immunoglobulin G: An overview of high affinity proteins and peptides // Materials. 2016. № 9(12). 994. DOI: 10.3390/ma9120994.

Ciaurriz P., Fernández F., Tellechea E., Moran J.F., Asensio A.C. Comparison of four functionalization methods of gold nanoparticles for enhancing the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) // *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2017. № 8(1). P. 244–253. DOI: 10.3762/bjnano.8.27.

Deng B., Lin Y., Wang C., Li F., Wang Z., Zhang H., Li X.-F., Le X.C. Aptamer binding assays for proteins: The thrombin example-A review // *Analytica Chimica Acta*. 2014. № 837. P. 1–15. DOI: 10.1016/j.aca.2014.04.055.

Dillon M.J., Bowkett A.E., Bungard M.J., Beckman K.M., O'Brien M.F., Bates K., Fisher M.C., Stevens J.R., Thornton C.R. Tracking the amphibian pathogens *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* using a highly specific monoclonal antibody and lateral-flow technology // *Microbial Biotechnology*. 2017. № 10(2). P. 381–394. DOI: 10.1111/1751-7915.12464.

Farka Z., Juřík T., Kovář D., Trnková L., Skládal P. Nanoparticle-Based Immunochemical Biosensors and Assays: Recent Advances and Challenges // *Chemical Reviews*. 2017. № 117(15). P. 9973–10042. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00037.

Filali S., Pirot F., Miossec P. Biological Applications and Toxicity Minimization of Semiconductor Quantum Dots // *Trends in Biotechnology*. 2020. № 38 (2). P. 163–177. DOI: 10.1016/j.tibtech.2019.07.013.

Gao H., Wang W., Wang Z., Han J., Fu Z. Amorphous carbon nanoparticle used as novel resonance energy transfer acceptor for chemiluminescent immunoassay of transferrin // *Analytica Chimica Acta*. 2014. № 819. P. 102–107. DOI: 10.1016/j.aca.2014.02.018.

Gao L., Zhuang J., Nie L., Zhang J., Zhang Y., Gu N., Wang T., Feng J., Yang D., Perrett S., Yan X. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles // *Nature Nanotechnology*. 2007. № 2(9). P. 577–583. DOI: 10.1038/nnano.2007.260.

Giri B., Pandey B., Neupane B., Ligler F.S. Signal amplification strategies for microfluidic immunoassays // *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*. 2016. № 79. P. 326–334. DOI: 10.1016/j.trac.2015.10.021.

Gnach A., Bednarkiewicz A. Lanthanide-doped up-converting nanoparticles: Merits and challenges // *Nano Today*. 2012. № 7(6). P. 532–563. DOI: 10.1016/j.nantod.2012.10.006.

Hagan A.K., Zuchner T. Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011. № 400(9). P. 2847–2864. DOI: 10.1007/s00216-011-5047-7.

Hasegawa H., Savory N., Abe K., Ikebukuro K. Methods for improving aptamer binding affinity // *Molecules*. 2016. № 21(4). P. 421. DOI: 10.3390/molecules21040421.

He X., Xiong L.-H., Huang Y., Zhao Z., Wang Z., Lam J.W.Y., Kwok R.T.K., Tang B.Z. AIE-based energy transfer systems for biosensing, imaging, and therapeutics // *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*. 2020. № 122. 115743. DOI: 10.1016/j.trac.2019.115743.

Hua S., de Matos M.B.C., Metselaar J.M., Storm G. Current trends and challenges in the clinical translation of nanoparticulate nanomedicines: Pathways for translational development and commercialization // *Frontiers in Pharmacology*. 2018. № 9. 790. DOI: 10.3389/fphar.2018.00790.

Huang X., Aguilar Z.P., Xu H., Lai W., Xiong Y. Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review // *Biosensors and Bioelectronics*. 2015. № 75. P. 166–180. DOI: 10.1016/j.bios.2015.08.032.

Jeevanandam J., Barhoum A., Chan Y.S., Dufresne A., Danquah M.K. Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations // *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2018. № 9(1). P. 1050–1074. DOI: 10.3762/bjnano.9.98.

Joseph P.D., Eling T., Mason R.P. The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates // *Journal of Biological Chemistry*. 1982. № 257(7). P. 3669–3675.

Kendall C., Ionescu-Matiu I., Dreesman G.R. Utilization of the biotin/avidin system to amplify the sensitivity of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) // *Journal of Immunological Methods*. 1983. № 56(3). P. 329–339. DOI: 10.1016/S0022-1759(83)80022-2.

Khan S.A., DeGrasse J.A., Yakes B.J., Croley T.R. Rapid and sensitive detection of cholera toxin using gold nanoparticle-based simple colorimetric and dynamic light scattering assay // *Analytica Chimica Acta*. 2015. № 892. P. 167–174. DOI: 10.1016/j.aca.2015.08.029.

Kim Thanh N.T., Rosenzweig Z. Development of an aggregation-based immunoassay for anti-protein A using gold nanoparticles // *Analytical Chemistry*. 2002. № 74(7). P. 1624–1628. DOI: 10.1021/ac011127p.

Komkova M.A., Karyakina E.E., Karyakin A.A. Catalytically Synthesized Prussian Blue Nanoparticles Defeating Natural Enzyme Peroxidase // *Journal of the American Chemical Society*. 2018. № 140(36). P. 11302–11307. DOI: 10.1021/jacs.8b05223.

Kristiansen M., Aggerbeck H., Heron I. Improved ELISA for determination of anti-diphtheria and/or anti-tetanus antitoxin antibodies in sera// APMIS. 1997. № 105(11). P. 843–853.

Landesman-Milo D., Peer D. Transforming Nanomedicines from Lab Scale Production to Novel Clinical Modality // Bioconjugate Chemistry. 2016. № 27(4). P. 855–862. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b0060.

Langevin D., Lozano O., Salvati A., Kestens V., Monopoli M., Raspaud E., Mariot S., Salonen A., Thomas S., Driessen M., Haase A., Nelissen I., Smisdom N., Pompa P.P., Maiorano G., Puntès V., Puchowicz D., Stepnik M., Suárez G., Riediker M., Benetti F., Mičetić I., Venturini M., Kreyling W.G., van der Zande M., Bouwmeester H., Milani S., Rädler J.O., Mülhopt S., Lynch I., Dawson K. Inter-laboratory comparison of nanoparticle size measurements using dynamic light scattering and differential centrifugal sedimentation // NanoImpact. 2018. № 10. P. 97–107. DOI: 10.1016/j.impact.2017.12.004.

Lee M.-J., Lee E.-S., Kim T.-H., Jeon J.-W., Kim Y.T., Oh B.-K. Detection of thioredoxin-1 using ultra-sensitive ELISA with enzyme-encapsulated human serum albumin nanoparticle // Nano Convergence. 2019. № 6(1). P. 37. DOI: 10.1186/s40580-019-0210-5.

López-Soriano P., Noguer P., Gorris M.T., Puchades R., Maquieira Á., Marco-Noales E., López M.M. Lateral flow immunoassay for on-site detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *Pruni* in symptomatic field samples // PLoS ONE. 2017. № 12(4): e0176201. DOI: 10.1371/journal.pone.0176201.

Matta L.L., Alocilja E.C. Emerging nano-biosensing with suspended MNP microbial extraction and EANP labeling // Biosensors and Bioelectronics. 2018. № 117. P. 781–793. DOI: 10.1016/j.bios.2018.07.007.

Mei J., Hong Y., Lam J.W.Y., Qin A., Tang Y., Tang B.Z. Aggregation-induced emission: The whole is more brilliant than the parts // Advanced Materials. 2014. № 26(31). P. 5429–5479. DOI: 10.1002/adma.201401356.

Miernicki M., Hofmann T., Eisenberger I., von der Kammer F., Praetorius A. Legal and practical challenges in classifying nanomaterials according to regulatory definitions // Nature Nanotechnology. 2019. № 14(3). P. 208–216. DOI: 10.1038/s41565-019-0396-z.

Modena M.M., Rühle B., Burg T.P., Wuttke S. Nanoparticle Characterization: What to Measure? // Advanced Materials. 2019. № 31(32). 1901556. DOI: 10.1002/adma.201901556.

Narwal V., Yadav N., Thakur M., Pundir C.S. An amperometric H₂O₂ biosensor based on hemoglobin nanoparticles immobilized on to a gold elec-

trode // Bioscience Reports. 2017. № 37(4). BSR20170194. DOI: 10.1042/BSR20170194.

Otsuka H., Akiyama Y., Nagasaki Y., Kataoka K. Quantitative and reversible lectin-induced association of gold nanoparticles modified with α -lactosyl- ω -mercapto-poly(ethylene glycol) // Journal of the American Chemical Society. 2001. № 123(34). P. 8226–8230.. DOI: 10.1021/ja010437m.

Panfilova E., Shirokov A., Khlebtsov B., Matora L., Khlebtsov N. Multiplexed dot immunoassay using Ag nanocubes, Au/Ag alloy nanoparticles, and Au/Ag nanocages // Nano Research. 2012. № 5(2). P. 124–134. DOI: 10.1007/s12274-012-0193-6.

Posthuma-Trumpie G.A., Wichers J.H., Koets M., Berendsen L.B.J.M., Van Amerongen A. Amorphous carbon nanoparticles: A versatile label for rapid diagnostic (immuno)assays // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2012. № 402(2). P. 593–600. DOI: 10.1007/s00216-011-5340-5.

Reisch A., Klymchenko A.S. Fluorescent Polymer Nanoparticles Based on Dyes: Seeking Brighter Tools for Bioimaging // Small. 2016. № 12(15). P. 1968–1992. DOI: 10.1002/smll.201503396.

Ren X., Gelinas A.D., Von Carlowitz I., Janjic N., Pyle A.M. Structural basis for IL-1 α recognition by a modified DNA aptamer that specifically inhibits IL-1 α signaling // Nature Communications. 2017. № 8(1): 810. DOI: 10.1038/s41467-017-00864-2.

Rey E.G., O'Dell D., Mehta S., Erickson D. Mitigating the Hook Effect in Lateral Flow Sandwich Immunoassays Using Real-Time Reaction Kinetics // Analytical Chemistry. 2017. № 89(9). P. 5095–5100 DOI: 10.1021/acs.analchem.7b00638.

Ross G.M.S., Salentijn G.I., Nielen M.W.F. A critical comparison between flow-through and lateral flow immunoassay formats for visual and smartphone-based multiplex allergen detection // Biosensors. 2019. № 9(4): 143. DOI: 10.3390/bios9040143.

Saah A.J., Hoover D.R. 'Sensitivity' and 'specificity' reconsidered: The meaning of these terms in analytical and diagnostic settings // Annals of Internal Medicine. 1997. № 126(1). P. 91–94. DOI: 10.7326/0003-4819-126-1-199701010-00026.

Sakata H., Tsurudome M., Hishiyama M., Ito Y., Sugiura A. Enzyme-linked immunosorbent assay for mumps IgM antibody: Comparison of IgM capture and indirect IgM assay // Journal of Virological Methods. 1985. № 12(3-4). P. 303–311 DOI: 10.1016/0166-0934(85)90141-7.

Schrittwieser S., Pelaz B., Parak W.J., Lentijo-Mozo S., Soulantica K., Dieckhoff J., Ludwig F., Guenther A., Tschöpe A., Schotter J. Homogeneous

biosensing based on magnetic particle labels // *Sensors* (Switzerland). 2016. № 16(6). 828. DOI: 10.3390/s16060828.

Singh R., Dumlupinar G., Andersson-Engels S., Melgar S. Emerging applications of upconverting nanoparticles in intestinal infection and colorectal cancer // *International Journal of Nanomedicine*. 2019. № 14. P. 1027–1038. DOI: 10.2147/IJN.S188887.

Sreedevi C., Hafeez M., Subramanyam K.V., Anand Kumar P., Chengalva Rayulu V. Development and evaluation of flow through assay for detection of antibodies against porcine cysticercosis // *Tropical Biomedicine*. 2011. № 28 (1). P. 160–170.

Tang Y., Li Z., He N., Zhang L., Ma C., Li X., Li C., Wang Z., Deng Y., He L. Preparation of functional magnetic nanoparticles mediated with PEG-4000 and application in pseudomonas aeruginosa rapid detection // *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2013. № 9(2). P. 312–317. DOI: 10.1166/jbn.2013.1493.

Trausch J.J., Shank-Retzlaff M., Verch T. Replacing antibodies with modified DNA aptamers in vaccine potency assays // *Vaccine*. 2017. № 35(41). P. 5495–5502 DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.04.003.

Vu C.Q., Rotkruea P., Soontornworajit B., Tantirungrotechai Y. Effect of PDGF-B aptamer on PDGFR β /PDGF-B interaction: Molecular dynamics study // *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2018. № 82. P. 145–156. DOI: 10.1016/j.jmgm.2018.04.012.

Wang F., Banerjee D., Liu Y., Chen X., Liu X. Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy // *Analyst*. 2010. № 135(8). P. 1839–1854 DOI: 10.1039/coan00144a.

Wang T., Chen C., Larcher L.M., Barrero R.A., Veedu R.N. Three decades of nucleic acid aptamer technologies: Lessons learned, progress and opportunities on aptamer development // *Biotechnology Advances*. 2019. № 37(1). P. 28–50. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.001.

Wen S., Zhou J., Zheng K., Bednarkiewicz A., Liu X., Jin D. Advances in highly doped upconversion nanoparticles // *Nature Communications*. 2018. № 9(1): 2415. DOI: 10.1038/s41467-018-04813-5.

Xie L., Jiang R., Zhu F., Liu H., Ouyang G. Application of functionalized magnetic nanoparticles in sample preparation // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014. № 406(2). P. 377–399. DOI: 10.1007/s00216-013-7302-6.

Zhao Y., Li Y., Jiang K., Wang J., White W.L., Yang S., Lu J. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food by biofunctionalized magnetic nanoparticle based on nuclear magnetic resonance // *Food Control*. 2017. № 71. P. 110–116. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.06.028.

Учебное издание

Храмцов Павел Викторович
Раев Михаил Борисович
Заморина Светлана Анатольевна

**Стереоспецифические взаимодействия.
Инструментальные и неинструментальные методы
в иммуноаналитике**

Учебное пособие

Редактор *М. А. Шемякина*
Корректор *Н. А. Антонова*
Компьютерная вёрстка: *П. В. Храмцов*

Объем данных 6,25 Мб
Подписано к использованию 29.12.2020

Размещено в открытом доступе
на сайте www.psu.ru
в разделе НАУКА / Электронные публикации
и в электронной мультимедийной библиотеке ELiS

Издательский центр
Пермского государственного
национального исследовательского университета
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15