

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



САФРОНОВА Валентина Андреевна

**Экспресс-методы иммуноанализа прогестерона в молоке для
целей ветеринарной диагностики**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
Доцент, к.х.н. Осипов А.П.

Москва – 2016

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. Латеральный проточный иммуноанализ	9
1.1.1. Строение тест-полоски	9
1.1.2. Форматы проведения ЛПИА	10
1.1.3. Основные компоненты тест-полосок для ЛПИА	12
1.1.3.1. Аналитическая мембрана	12
1.1.3.2. Мембрана для нанесения образца	17
1.1.3.3. Мембрана для нанесения конъюгата	18
1.1.3.4. Абсорбирующая (впитывающая) мембрана	19
1.1.4. Теоретические основы ЛПИА	19
1.1.4.1. Капиллярные явления	19
1.1.4.2. Взаимодействие антиген-антитело	20
1.1.5. Антитела в ЛПИА	25
1.1.6. Метки, применяемые в ЛПИА	25
1.1.6.1. Латексные частицы	25
1.1.6.2. Коллоидное золото	25
1.1.6.3. Флуоресцентные метки	28
1.1.6.4. Квантовые точки	28
1.1.6.5. Парамагнитные частицы	30
1.1.6.6. Ферментные метки	31
1.1.6.7. Углеродные наночастицы	31
1.2. Иммунофльтрационный анализ	33
1.2.1. Принцип метода	33
1.2.2. Метки в ИФиА	35
1.2.3. Мембраны в ИФиА	36

1.3.	Физиологическая роль ПГ и методы его определения	39
1.3.1.	Роль ПГ в организме коров	39
1.3.2.	Методы определения ПГ для выявления стельности коров	43
1.3.2.1.	Радиоиммунологический анализ	44
1.3.2.2.	Иммуноферментный анализ	45
1.3.2.3.	Флуоресцентный иммуноанализ	48
1.3.2.4.	Биосенсоры для определения ПГ	49
1.3.2.5.	Быстрые методы определения ПГ	52
ГЛАВА II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ		56
2.1.	Материалы и методы исследования	56
2.1.1.	Химические реагенты, материалы и биологические препараты	56
2.1.2.	Оборудование	57
2.1.3.	Методы исследования	58
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ		64
3.1.	Разработка ЛПИА для определения ПГ	64
3.1.1.	Получение наночастиц золота и конъюгата ПГ-ОВА, меченного золотыми наночастицами	65
3.1.1.1.	Получение и характеристика наночастиц золота	65
3.1.1.2.	Получение ПГ-ОВА, меченного наночастицами золота	66
3.1.1.3.	Выбор оптимального рН и концентрации конъюгата ПГ-ОВА	66
3.1.2.	Оптимизация условий проведения ЛПИА с использованием наночастиц золота для определения ПГ	68
3.1.2.1.	Выбор концентраций реагентов	69
3.1.2.2.	Выбор схемы проведения анализа	71
3.1.3.	Оптимизация условий проведения ЛПИФА для определения ПГ	75
3.1.3.1.	Изучение условий регистрации аналитического сигнала	75
3.1.3.2.	Варианты проведения анализа	77
3.1.3.3.	Выбор концентраций реагентов	77

3.1.3.4.	Оптимизация условий нанесения конъюгата ПГ-ПХ на мембрану для конъюгата	79
3.1.3.5.	Выбор способа нанесения реагентов	81
3.1.3.6.	Выбор схемы проведения анализа	83
3.1.3.7.	Оптимизация стадии окрашивания тест-полоски	84
3.1.3.8.	Выбор мембранных компонентов для создания тест-полоски	86
3.1.3.9.	Влияние содержания белков на проведение анализа	92
3.1.3.10.	Практическое использование метода ЛПИФА для анализа ПГ в молоке с целью определения стельности	95
3.2.	Разработка метода ИФиА для определения ПГ	98
3.2.1.	Оптимизация условий проведения ИФиА ПГ с коллоидным золотом в качестве метки	99
3.2.1.1.	Выбор концентраций реагентов	99
3.2.2.	Разработка метода ИФиА с ферментной меткой	102
3.2.2.1.	Выбор концентраций реагентов	103
3.2.2.2.	Определение оптимальных характеристик регистрации протекания субстратной реакции на мембранах	105
3.2.2.3.	Оптимизация метода ИФиА ПГ с ферментной меткой	107
3.2.2.4.	Выбор аналитической мембраны	110
3.2.2.5.	Влияние содержания белков в образце на проведение анализа	112
3.2.2.6.	Апробация ИФиА ПГ на реальных образцах молока	113
3.2.2.7.	Сравнение метода ИФиА ПГ с традиционным методом ИФА	115
3.2.2.8.	Сравнение метода ИФиА с ферментной меткой с методами ЛПИФА и методом ИФА	117
	ВЫВОДЫ	119
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	121

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЛПИА – латеральный проточный иммуноанализ

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛПИФА – латеральный проточный иммуноферментный анализ

ИФиА – иммунофльтрационный анализ

ПГ – прогестерон

ПХ – пероксидаза хрена

БСА - бычий сывороточный альбумин

ОВА - овальбумин

ПГ-ОВА – конъюгат прогестерона с овальбумином

ПГ-ПХ – конъюгат прогестерона с пероксидазой хрена

КТ – квантовые точки

Ат – антитело

3-О-КМО-ПГ – 3-О-карбоксиметилоксим прогестерона

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одной из наиболее актуальных задач в области аналитической биотехнологии является создание простых биосенсорных устройств, позволяющих осуществлять экспресс-анализ индивидуальных или сложных смесей биологически активных соединений в объектах окружающей среды и биологических жидкостях. Обязательными требованиями являются высокая чувствительность, воспроизводимость результатов, стабильность, относительно низкая стоимость. Одним из подходов, активно реализуемым в последнее время в мире для решения практических задач медицинской и ветеринарной диагностики, является применение экспресс-методов на основе иммуноанализа, таких как латеральный проточный иммуноанализ (ЛПИА) и иммунофилтратационный анализ (ИФиА). Результатом в таких тест-системах является появление в тестовой зоне линии или пятна, интенсивность окраски которых зависит от определяемой концентрации аналита. Основные преимущества данных тест-систем - простота в использовании, так как все необходимые для проведения анализа специфические компоненты уже заранее содержатся в используемых устройствах (для анализа требуется всего лишь добавить несколько капель анализируемого раствора); небольшое время проведения анализа (как правило, 5-10 минут); возможность регистрации результата анализа по интенсивности окрашивания линии на мембране визуально, или с помощью специальных портативных детектирующих устройств.

Наибольшее распространение на практике такие тест-системы получили в медицинской диагностике, однако в последние годы большое внимание исследователи уделяют созданию таких аналитических экспресс-методов для целей ветеринарии. Раннее определение стельности коров является одной из наиболее важных практических задач для современных молочных хозяйств, а создание простых экспресс-методов для ранней диагностики стельности позволит улучшить воспроизводство молочного стада, выявлять заболевания органов репродуктивной системы коров на ранних стадиях.. Одной из причин снижения эффективности работы молочных хозяйств является недостаточный уровень воспроизводства, обусловленный в том числе длительным периодом от отела до оплодотворения, который иногда достигает 150 суток. Для борьбы с бесплодием и улучшения воспроизводства молочного стада целесообразно использовать методы ранней диагностики стельности. Это позволяет не только

повысить результативность работы осеменатора, но и выявить нарушения репродуктивной функции, оценивать эффективность лечения акушерско-гинекологических болезней. Традиционное ректальное исследование для выявления стельности позволяет получить четкое представление о состоянии всех внутренних половых органов, и является основным методом, позволяющим непосредственно в условиях производства в любое время года получить достоверные результаты лишь на 70...90-й день после осеменения. Важным обстоятельством является, что ректальные исследования может проводить только достаточно опытный ветеринарный врач, так как ректальное исследование на раннем сроке беременности часто приводит к аборту вследствие ранимых связей эмбриона со стенкой матки. Исследование стельности с использованием ультразвуковых сканеров (УЗИ-исследование), в соответствии с существующей методикой, позволяет получить достоверный диагноз по комплексу нескольких показателей уже на 32...37-й день после осеменения. Однако данный вид диагностирования требует специального дорогого оборудования и высокой квалификации ветеринарных врачей, и, самое главное, - опыта идентификации эхограмм.

В последние десятилетия для точной и ранней диагностики стельности активно применяются методы иммунохимического анализа по определению уровня видонеспецифического гормона – прогестерона (ПГ) в молоке или сыворотке крови. Данные методы позволяют определять стельность коров уже на 19-21 сутки. Одним из наиболее эффективных и широко применяемых является метод иммуноферментного анализа (ИФА). Метод ИФА способствует раннему выявлению гипофункции яичников, лютеиновой кисты, персистентного желтого тела и соответственно раннему лечению этих заболеваний. Также методом ИФА можно определить наличие или отсутствие половой цикличности уже в первый месяц после отела, уточнить оптимальное время осеменения, исключить передачу инфекционных болезней и стрессов при проведении ректального исследования.

Несмотря на то, что данный метод известен и широко распространен во многих странах, в России он применяется сравнительно недавно. Основными причинами, тормозящими широкое применение ИФА-метода в нашей стране, являются недостаточное количество лабораторий, оснащенных специальным оборудованием на местах, отсутствие недорогих отечественных иммуноферментных наборов, а также

проблема хранения и транспортировки в замороженном виде отобранных в хозяйстве проб молока в лаборатории, часто находящиеся на значительном расстоянии от самой фермы.

Основным направлением исследований данной работы является разработка новых высокочувствительных систем для полуколичественного или количественного анализа ПГ в молоке коров с целью раннего определения стельности и возможностью проведения анализа и регистрации его результатов в полевых условиях.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Латеральный проточный иммуноанализ

В течение последнего десятилетия получили развитие так называемые «быстрые методы» проведения анализа биологически активных соединений с визуальной регистрацией результатов, которые уже нашли применение в самых различных областях: медицинской диагностике, фармацевтической и пищевой промышленности, охране окружающей среды, ветеринарии и т.д. Наиболее широко применяется метод на основе иммуноанализа – латеральный проточный иммуноанализ (ЛПИА), который положил начало развитию экспресс-методов для определения биологически активных соединений с визуальной регистрацией результатов [1-5]. В основе метода лежит применение готовых тест-систем, состоящих из мембранных носителей, с иммобилизованными реагентами, которые при взаимодействии с образцом образуют окрашенные специфические иммунокомплексы. Основные преимущества быстрых тестов на основе ЛПИА – это низкая стоимость, быстрота анализа, отсутствие специальных навыков персонала при работе, а также возможность проведения анализа во внелабораторных условиях. Данные тест-системы имеют важное значение для диагностики беременности, заболеваний внутренних органов (например, сердечный приступ, почечная недостаточность или диабет), различных инфекций, загрязнений конкретными патогенами, наличия токсичных веществ в продуктах питания или окружающей среде.

1.1.1. Строение тест-полоски

Принцип ЛПИА заключается в движении жидкости с анализируемым образцом за счет капиллярных сил внутри пор вдоль пористой мембраны, вовлечением в реакцию иммобилизованных в ней компонентов и образованием в тестовой и контрольных зонах тест-полоски специфических иммунокомплексов, визуализируемых как окрашенные полосы. В качестве меток в данных системах используют окрашенные латексы, магнитные и углеродные частицы, ферменты, липосомы, квантовые точки и коллоидное золото и т.д. [6,7].

На Рис. 1 представлена тест-система для проведения ЛПИА. Она представляет собой подложку, на которую последовательно наклеены мембраны: мембрана для нанесения образца, мембрана для меченого реагента, аналитическая мембрана и

впитывающая (абсорбирующая) мембрана. Мембраны должны быть расположены относительно друг друга таким образом, чтобы край каждой из них перекрывал край расположенной рядом мембраны. Такое перекрытие необходимо для равномерного переноса компонентов образца с одной части тест-полоски на другую.

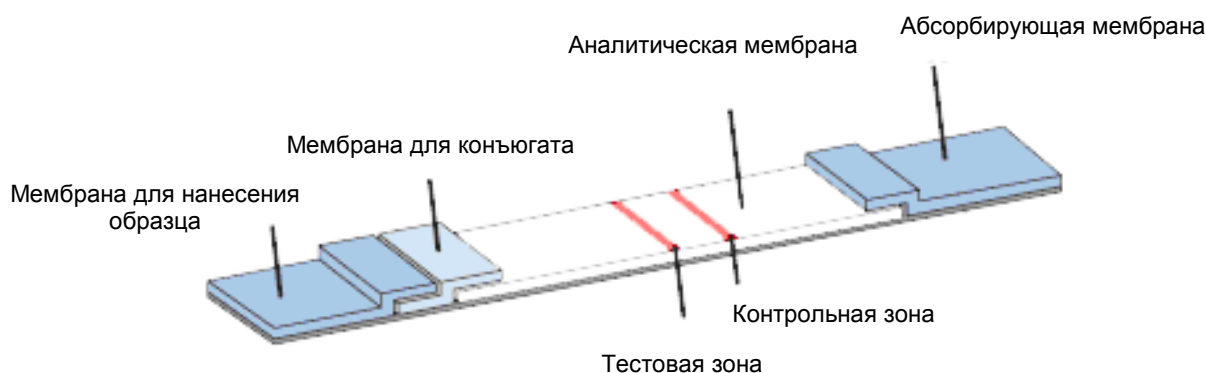


Рис. 1. Строение тест-системы на основе ЛПИА.

Тест-полоски получают следующим образом: на лист аналитической мембраны в области тестовой и контрольной зоны наносят растворы необходимых реагентов, на мембрану для конъюгата наносят раствор меченого реагента, после чего мембраны высушивают. Для устранения неспецифического связывания реагируемых веществ мембраны обрабатывают специальными растворами, содержащими белки, поверхностно-активные вещества (ПАВ) или полимеры. Нанесение растворов реагентов на аналитическую мембрану проводят с помощью контактного или бесконтактного диспенсера, который распределяет раствор в виде узкой линии по всей длине мембраны с заданной скоростью. После высушивания реагентов компонуют заготовку для тест-полосок, последовательно наклеивая на пластиковую подложку аналитическую мембрану, впитывающую мембрану, мембрану для меченого реагента и мембрану для нанесения образца таким образом, чтобы обеспечивался непрерывный поток жидкости. Полученную заготовку режут на полоски заданной ширины и упаковывают в специальные кассеты, после чего тест-полоски готовы к использованию [8].

1.1.2. Форматы проведения ЛПИА

Сэндвич-формат применяется для определения высокомолекулярных соединений. В традиционном варианте, в тестовой зоне иммобилизованы первичные антитела. На мембране для конъюгата импрегнированы меченые антитела, которые смываются

потоком раствора образца при анализе. Вторичные антитела против меченых антител иммобилизованы в контрольной зоне. Образец, содержащий анализируемое вещество, наносят на мембрану для образца, и он постепенно распространяется к другим частям тест-полоски. На мембране для конъюгата, анализируемый антиген связывается с иммобилизованным конъюгатом меченых антител, в результате образуется комплекс антиген – меченое антитело. Полученный комплекс движется под действием капиллярных сил и достигает аналитической мембраны. В области тестовой линии комплекс конъюгата меченых антител с антигеном связывается со специфическими антителами. Избыток конъюгата меченых антител взаимодействует в контрольной зоне с вторичными антителами. Образец или избыток раствора далее движется к впитывающей мембране. Интенсивность окраски тестовой линии прямо пропорциональна количеству анализируемого вещества. Появление окраски в области контрольной линии свидетельствует о работе теста.

Для анализа низкомолекулярных веществ применяют конкурентный формат. В данном случае при интерпретации результата наблюдается обратная зависимость: отсутствие окраски в тестовой линии говорит о присутствии анализируемого вещества, в то время как окраска в тестовой, так и в контрольной линии свидетельствует об отрицательном результате. Конкурентный формат может осуществляться двумя способами. В первом случае, в тестовой зоне иммобилизован антиген, на мембрану для конъюгата нанесены меченые специфические антитела. На мембрану для образца наносится раствор, содержащий анализируемый антиген. Контрольная линия содержит иммобилизованные вторичные антитела, которые связывают свободные меченые антитела. Когда образец достигает тестовой линии, иммобилизованный антиген связывается с мечеными антителами. В случае если в образце анализируемый антиген отсутствует или присутствует в небольшом количестве, некоторые центры связывания антител остаются свободными.

Альтернативный вариант проведения конкурентного формата, когда в тестовой зоне иммобилизованы антитела, специфичные к анализируемому антигену, и на мембране для конъюгата содержится меченый белковый конъюгат антигена. После нанесения образца, антиген, содержащийся в образце, и меченый белковый конъюгат антигена конкурируют за центры связывания специфических антител. Результат анализа

в таком варианте проведения также характеризуется уменьшением интенсивности окраски тестовой линии при увеличении концентрации анализируемого антигена.

При одновременном определении нескольких антигенов в ЛПИИА используют мультиплексный формат. Тест-полоска в таком случае содержит столько тестовых линий, сколько требуется определять антигенов. Мультиплексный формат определения очень удобен в клинической диагностике, где несколько маркеров могут одновременно показать картину заболевания [9]. В качестве примера можно привести недавно разработанный мультиплексный метод ЛПИИА для одновременного определения четырех общих человеческих папилломовирусов [10].

1.1.3. Основные компоненты тест-полосок для ЛПИИА

1.1.3.1. Аналитическая мембрана

Мембраны, используемые для изготовления тест-полосок, являются наиболее важной частью экспресс-тестов. Аналитическая мембрана для проведения ЛПИИА должна обладать рядом свойств, таких как прочная иммобилизация антител или антигенов, высокая стабильность и активность в течение длительного времени. Наиболее часто используемый материал для аналитической зоны - это нитрат целлюлозы [11-14]. Также доступны нейлоновые [15], полиэфирсульфоновые [16], полиэтиленовые [17] носители. Полиэфирсульфоновые мембраны применяются в основном при определении нуклеиновых кислот [16]. Нитроцеллюлозная и нейлоновая мембраны обладают высокой способностью связывать белок, в то время как, например поливинилиденфторидные мембраны обладают более низкой связывающей способностью. В качестве нитроцеллюлозных мембран коммерчески доступны мембраны с различным размером пор от 0,05 до 15 мкм. Информативной характеристикой мембраны также является скорость капиллярного потока, соответствующая времени, за которое фронт жидкости проходит определенный участок мембраны. Прежде всего, размер пор и материал мембраны учитывают для прохождения метки [18]. Скорость, с которой комплекс антигена и метки движется вдоль мембраны, обеспечивает необходимое время анализа. Эти параметры особенно важны, когда образец обладает высокой вязкостью или содержит в своем составе молекулы жира, например – молочные образцы. Размер пор и скорость капиллярного потока взаимосвязаны. С увеличением размера пор мембраны скорость капиллярного потока возрастает, но при этом сокращается время взаимодействия антигена в образце с

антителами, поэтому слишком высокая скорость потока может снижать чувствительность анализа [19]. На чувствительность анализа также может влиять расположение тестовой зоны, в которой иммобилизованы антитела, от начального участка мембраны. Скорость капиллярного потока не является постоянной величиной, она сильно уменьшается по мере продвижения жидкости вдоль мембраны. При близком расположении тестовой зоны к начальному краю мембраны скорость движения жидкости велика, поэтому времени для образования в тестовой зоне комплекса меченое антитело-антиген и иммобилизованные антитела может быть недостаточно, и наблюдается низкий аналитический сигнал [20].

Нитроцеллюлозные мембраны можно хранить при обычной температуре и влажности окружающей среды, однако при низкой влажности, обработка нитроцеллюлозной мембраны затруднена, из-за способности данного материала накапливать статическое электричество. Нитроцеллюлозные мембраны гидрофобны, поэтому для придания смачиваемости мембране в ее поры вводят ПАВ в определенной концентрации, что позволяет достигать необходимую смачиваемость мембраны для достижения максимальной скорости потока жидкости вдоль мембраны. Для увеличения смачиваемости мембраны весьма эффективными являются ионные детергенты, такие как додецилсульфат натрия [21].

Важное свойство аналитической мембраны – это обеспечение прочного связывания антител или антигенов в тестовой и контрольной зонах. Иммобилизация белков на мембране имеет сорбционную природу. Для нитроцеллюлозных мембран основными движущими силами связывания белков на носителе являются электростатические взаимодействия (диполь-дипольные взаимодействия сильно поляризованных нитроэфирных групп мембраны и карбонильных групп пептидных связей белков), в случае поливинилиденфторидных и полиэфирсульфоновых мембран – гидрофобные, а для нейлона – ионные или электростатические взаимодействия [22, 23].

Поскольку основными движущими силами в нитроцеллюлозных мембранах при сорбции белков являются электростатические, рН раствора может оказывать влияние на сорбционные свойства из-за воздействия на структуру белка в растворе. При иммобилизации белков на мембране, следует исключить введение в раствор хаотропных агентов, в том числе Твина-20 или Тритона X-100, либо понизить их концентрацию менее 0,01% по объему, чтобы избежать их влияния на молекулярные контакты белков с

поверхностью мембраны. Если требуется присутствие подобных реагентов для снижения неспецифических взаимодействий или фонового сигнала, их следует вводить в мембрану для образца [8, 21, 23].

Количество белка, связанного на пористой мембране, определяется в основном внутренней поверхностью пор, доступной для иммобилизации. При прочих равных параметрах величина внутренней поверхности мембраны, доступной для связывания нелинейно уменьшается с увеличением размера пор, линейно возрастает при увеличении толщины мембраны и нелинейно возрастает при увеличении пористости [21].

В работе [24] описана модель диффузии белка БСА в порах нитроцеллюлозной мембраны в направлении параллельном плоскости мембраны. В работе были рассмотрены нитроцеллюлозные мембраны с разным размером пор. В Таблице 1 приведены значения экспериментально рассчитанных коэффициентов диффузии в зависимости от размера пор мембран.

Таблица 1. Значения коэффициентов диффузии для мембран с разным размером пор [24].

Размер пор, м	Коэффициент диффузии, м ² /с
$1,3 \cdot 10^{-6}$	$4,49 \pm 0,35 \cdot 10^{-10}$
$4,2 \cdot 10^{-6}$	$1,30 \pm 0,30 \cdot 10^{-9}$
$4,9 \cdot 10^{-6}$	$9,53 \pm 0,39 \cdot 10^{-9}$
$5,1 \cdot 10^{-6}$	$1,24 \pm 0,26 \cdot 10^{-8}$
$7,5 \cdot 10^{-6}$	$2,28 \pm 0,32 \cdot 10^{-8}$

На Рис.2 представлен график зависимости коэффициента диффузии от размера пор. При небольшом размере пор мембраны, изменения в величине коэффициента диффузии менее значительны, он растет медленно по мере увеличения размера пор. Это происходит по причине того, что при маленьком размере пор, наблюдается относительно высокое содержание полимера в составе мембраны при том же объеме полимерной матрицы. На рис.2 видно, что значение коэффициента диффузии резко увеличивается при размере пор мембраны более 4 мкм.

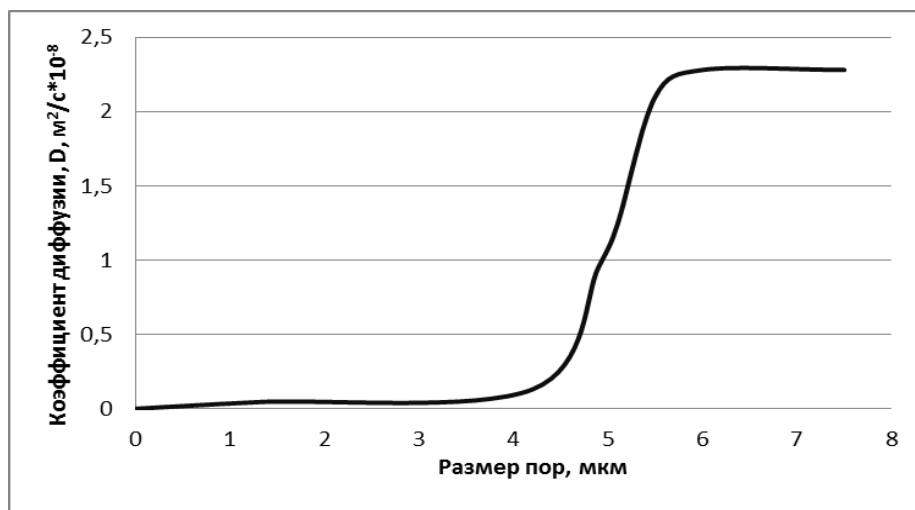


Рис.2. Зависимость коэффициента диффузии белка БСА от размера пор нитроцеллюлозной мембраны [24].

Факторы, влияющие на сорбцию белков на мембране. Большое значение для наилучших условий адсорбции связывающего реагента на мембране и сохранения активности этих реагентов после высушивания, хранения и последующей реактивации при проведении анализа имеет состав буферной смеси. Конкретный состав буферной смеси обычно определяется индивидуальными свойствами используемых при адсорбции на мембранах специфических компонентов.

Состав буфера. Выбор буферной смеси имеет значение для достижения наилучшего связывания активных компонентов на мембране и последующего соблюдения оптимальных условий для протекания специфических реакций в процессе проведения анализа. Как минимум, это требование должно выполняться для величины рН буферного раствора. При нанесении на мембрану связывающего компонента возможно использование различных буферных растворов, например, фосфатного, боратного, трисового, карбонатного и др. Однако следует учитывать, что при высушивании мембраны с нанесенными компонентами концентрация соли сильно возрастает, что может существенно сказываться на структуре адсорбированных белковых молекул и их стабильности. Например, при использовании трисового буферного раствора, содержащего первичные аминогруппы, последние способны образовывать прочные солевые связи с отрицательно заряженными карбоксильными группами аминокислотных остатков белков, нарушающие эффективность специфических взаимодействий с исследуемым образцом. По этой же причине соли натрия предпочтительней солей калия. Для работы в области рН 4-6 возможно

использование ацетата аммония, который практически полностью удаляется при высушивании [8].

Выбор рН. Величина растворимости белков обусловлена зарядом поверхности белковой молекулы и минимальна вблизи изоэлектрической точки белка. Поэтому при нанесении белка на поверхность мембраны желательно использовать рН раствора вблизи изоэлектрической точки наносимого белка ($pI \pm 1$). Большинство антител имеет изоэлектрическую точку pI от 5,5 до 7,5, в связи, с чем оптимальными значениями рН буферного раствора для нанесения антител является рН 7,0 - 7,5.

Ионная сила. При нанесении растворов белков на мембрану желательно использовать как можно меньшую величину ионной силы буферного раствора, так как ионная сила способна уменьшать электростатические взаимодействия между белком и мембраной, принимающем участие в сорбционном процессе. Аналогичный эффект оказывает физиологический раствор, способствующий повышению растворимости белков, но снижающий гидрофобную сорбцию белков на мембране. Увеличение молярности буфера приводит к увеличению количества соли, которая остается в порах после высушивания мембраны, что приводит к их закупорке и ухудшению капиллярных свойств мембраны при проведении анализа. Поэтому, как правило, сорбционный буфер имеет молярность, не превышающую 10 мМ. Следует по возможности избегать добавления в раствор хлористого натрия, если этого не требуется для поддержания активности или стабильности адсорбируемого белка [20, 21].

Использование метанола, этанола или изопропанола. Установлено, что добавление в раствор таких спиртов, как метанол, этанол или изопропанол в концентрациях от 1 до 10% по весу оказывается благоприятным по следующим трем причинам. Во-первых, присутствие спирта способствует лучшему проникновению белка в поры мембраны благодаря уменьшению вязкости раствора, поверхностного натяжения и электростатического отталкивания. Во-вторых, небольшие количества спирта приводят к снижению растворимости белковых молекул без изменения эффективности взаимодействий и изменения структуры центров связывания молекул. В-третьих, присутствие даже небольших количеств спирта в буферном растворе приводит к улучшению процесса сушки мембран после нанесения адсорбируемых белков. Подбор оптимальных концентраций спирта для конкретной системы осуществляют эмпирическим путем [21].

Использование поверхностно-активных веществ. В некоторых случаях сорбция реагента на мембране приводит к вытеснению содержащихся в ней ПАВ, в результате чего меняются капиллярные свойства мембраны в местах нанесения линий, фронт образца получается неровным и сильно размытым, что влияет на результаты анализа. Для предотвращения этого эффекта в сорбционный раствор дополнительно вводят небольшое количество ПАВ.

1.1.3.2. Мембрана для нанесения образца

Исследуемый образец наносится в виде одной или нескольких капель на полимерную пористую мембрану, которая контактирует с мембраной для конъюгата и обеспечивает равномерное распределение образца и последующее распространение его в аналитической мембране. Обладая специальными свойствами, эта мембрана способствует переносу образца с определенной скоростью. Мембрана для образца может содержать в своем составе такие компоненты как белки, детергенты, буферные соли. Эти компоненты добавляются, как правило, для увеличения вязкости наносимого раствора образца, улучшения солюбилизации детектируемого агента, предотвращение неспецифического взаимодействия конъюгата золотых частиц с компонентами раствора образца для более эффективного связывания антител и образования специфических иммунокомплексов. Присутствие альбумина или ПАВ, таких как додецилсульфат натрия и Твин-20, в минимальных концентрациях может улучшать растворимость конъюгата, уменьшать неспецифические взаимодействия и неспецифическую адсорбцию определяемого вещества на мембране. Введение блокирующих веществ в мембрану для образца может устранять необходимость дополнительной стадии обработки мембраны или мембраны с конъюгатом. Такой подход может быть значительно проще, дешевле и эффективней, чем введение дополнительных стадий обработки самой реакционной мембраны для предотвращения неспецифического связывания. Аналогичное дополнительное введение блокирующих белков в мембрану для конъюгата и ее последующее высушивание может приводить к десорбции специфических антител с поверхности золота при нековалентном способе получения конъюгатов и замещении специфических белков на блокирующие белки в процессе длительного хранения препаратов. Таким образом, обработка мембраны для образца инертными реагентами является единственным путем уменьшения последующего неспецифического связывания на аналитической мембране [8, 21].

Основными типами мембран для нанесения образца являются тканая сетка и целлюлозные фильтры. Первый тип в основном используется для равномерного распределения образца по мембране с конъюгатом. Как правило, такие мембраны достаточно дороги, характеризуются большой механической прочностью, но малым удерживаемым объемом жидкости (около 1-2 мкл/см²), что делает невозможным их дополнительную обработку для введения блокирующих веществ или буферных солей. Мембраны для нанесения образца на основе целлюлозных фильтров значительно дешевле, имеют большой объем пор (>25 мкл/см²), толщину около 250 мкм, но легко рвутся, особенно в смоченном виде [21].

1.1.3.3. Мембрана для нанесения конъюгата

Основное назначение мембраны для нанесения конъюгата - это равномерный перенос образца и меченого реагента к аналитической мембране, при этом следует иметь в виду, что при прохождении образца через поры мембраны уже возможно протекание реакции взаимодействия определяемого вещества с антителами, находящимися на поверхности меченого конъюгата. Для того, чтобы процесс такого взаимодействия протекал количественно, необходимо равномерное распределение реагентов внутри пор мембраны и их ламинарный поток. Кроме того, мембрана для нанесения конъюгата должна обладать следующими свойствами:

- низким неспецифическим связыванием, благодаря чему весь содержащийся в образце определяемый компонент должен перейти к аналитической мембране;
- равномерными характеристиками течения жидкости, что должно обеспечивать равномерность подачи анализируемых компонентов к реакционной зоне мембраны;
- постоянным и равномерным распределением свободного объема по мембране, так как количество переносимого конъюгата, находящегося на мембране после его нанесения, должно быть строго одинаковым для различных образцов;
- низкой экстрагируемостью из мембраны, как по отношению к возможным химическим примесям в мембране, так и механическим включениям;
- хорошей операционной стабильностью [21].

Мембрана для нанесения конъюгата обеспечивает важный процесс переноса образца и детектирующего агента к аналитической мембране. Для того чтобы обеспечить солубилизацию и перенос детектирующего агента, необходим определенный объем жидкости, содержащийся в наносимом образце. Количество

находящегося в образце анализируемого вещества также определяется объемом наносимого образца. Объем жидкости, который распространяется после прохождения детектирующего агента, не влияет на интенсивность регистрируемого сигнала, но может сказываться на величине фонового сигнала.

В качестве мембраны для нанесения конъюгата широкое распространение получили нетканые тонкослойные фильтры, которые получают сжатием специально предобработанной волокнистой целлюлозы, стекла или полимеров (полиэфиров, полипропилена или полиэтилена) [24].

1.1.3.4. Абсорбирующая (впитывающая) мембрана

Основной функцией абсорбирующей мембраны является увеличение общего объема образца, проходящего через активные зоны мембраны. Увеличение объема может способствовать уменьшению неспецифического связывания, так как проходящий раствор выполняет также роль и промывающего раствора для удаления не находящихся в виде иммунокомплексов частиц. В отсутствие абсорбирующей мембраны объем анализируемого образца не может превышать сорбционную емкость мембраны.

В большинстве абсорбирующих мембран в качестве материалов используются целлюлозные фильтры [21]. По своим характеристикам они могут отличаться толщиной, степенью сжатия, абсорбирующей способностью, равномерностью распределения свободного объема. Для изменения эффективности всасывания жидкости в конечных устройствах обычно изменяют длину мембраны.

1.1.4. Теоретические основы ЛПИА

В основе ЛПИА лежат те же основные принципы, характеризующие твердофазные методы иммунохимического анализа с учетом протекания иммунохимических реакций в потоке, образующемся за счет капиллярных явлений, являющихся движущими силами распространения жидкости внутри пор мембранных носителей.

1.1.4.1. Капиллярные явления

Капиллярные явления обеспечивают движение потока жидкости вдоль мембраны. В начальном приближении в ЛПИА поры мембраны можно представить, как совокупность длинных прямых цилиндрических капилляров, расположенных параллельно друг другу. Для расчета скорости потока жидкости, это условие позволяет

считать, что поток ламинарный. Поток жидкости в капиллярах зависит от размера пор мембраны, их распределения и пористости, а также от характеристик жидкости, движущейся вдоль мембраны, таких как вязкость и поверхностное натяжение. Уравнение смачиваемости сухой пористой мембраны жидкостью выглядит следующим образом:

$$L^2 = \frac{\gamma d_p t \cos \theta}{4\mu}, \text{ где } L - \text{расстояние, пройденное жидкостью в пористой мембране, } d_p -$$

диаметр пор, γ – поверхностное натяжение жидкости, μ - вязкость жидкости, θ – краевой угол, t - время, за которое жидкость проходит расстояние L в капилляре [14]. Продифференцировав уравнение по dt , получаем, что линейная скорость смачивания обратно пропорциональна расстоянию, пройденному жидкостью по капилляру:

$$\frac{dL}{dt} = \frac{\gamma d_p \cos \theta}{8\mu L}$$

Скорость смачивания также обратно пропорциональна вязкости жидкости и пропорциональна диаметру пор мембраны (d_p), поверхностному натяжению (γ) и величине краевого угла (θ). Для уменьшения краевого угла при производстве мембран часто добавляют поверхностно-активные вещества, увеличивая при этом смачиваемость мембраны. После полного смачивания мембраны жидкостью, скорость потока жидкости будет определяться уравнением:

$$Q = \frac{\kappa A}{\mu} \left(\frac{dP}{dL} \right),$$

где Q – объемная скорость потока, κ – относительная проницаемость мембраны, A – площадь сечения капилляра, μ - вязкость жидкости, протекаемой по мембране, dP - разница давлений на концах капилляра длины L [19].

1.1.4.2. Взаимодействие антиген-антитело

В работе [25] предложены математические модели для двух форматов конкурентного ЛПИА. Данные модели позволяют представить величину аналитического сигнала как функцию от концентраций антигена и метки, и реакционных констант. В работе было показано, что разработанная математическая модель согласуется с экспериментальными данными.

Образец, содержащий анализируемый антиген, метку и буферный раствор представлены как емкость, которая контактирует с сухой пористой мембраной. Раствор движется вдоль мембраны под действием капиллярных сил. Рассматриваются два

конкурентных формата: первый, когда и метка (P) и анализируемый антиген (A) могут связываться с иммобилизованными антителами (R), образуя комплексы R_tP и R_tA . Когда антитела образуют комплекс R_tA , он уже не может связываться с меткой. Только метка может связываться с контрольной линией, образуя комплекс R_cP . Другой формат, когда молекулы метки могут связываться или с анализируемым антигеном или с иммобилизованным в тестовой линии белковым конъюгатом антигена. Когда анализируемый антиген связался с меткой с образованием комплекса PA, метка уже не может связываться с белковым конъюгатом антигена в тестовой зоне. Свободная метка, не образовавшая комплекс PA, может связываться в тестовой зоне с образованием комплекса R_tP .

На примере первого формата конкурентного ЛПИА рассмотрим предложенную математическую модель. Раствор, содержащий анализируемый антиген с начальной концентрацией $[A_0]$, метку с начальной концентрацией $[P_0]$, движется по мембране к тестовой зоне. Обычно пористая мембрана узкая и тонкая. Образец медленно движется в направлении границы раздела фаз со средней скоростью U . Антитела иммобилизованы в тестовой зоне полоски в диапазоне $X_{t1} < x < X_{t2}$. Таким образом, будет рассмотрена одна пространственная координата x , которая меняется в диапазоне длины тест-полоски. Концентрации реагентов - это функция от пространства и времени. В тестовой зоне наблюдаются реакции образования комплексов R_tP и R_tA :



Скорость образования комплекса антитела с антигеном в тестовой зоне пропорциональна концентрациям свободного антигена, содержащегося в пробе и несвязавшихся свободных антител.

$$F_{RTA} = k_{a1}[A]([R_{t0}] - [R_tA] - [R_tP]) - k_{d1}[R_tA]. \quad (1)$$

Подобным образом, скорость образования комплекса антител с меткой в тестовой зоне равна:

$$F_{RTP} = k_{a2}[A]([R_{t0}] - [R_tA] - [R_tP]) - k_{d2}[R_tP]. \quad (2)$$

В вышеуказанном, $[R_{t0}]$ начальная концентрация антител в тестовой зоне. $[R_{t0}] - [R_tA] - [R_tP]$ – концентрация антител, доступных для взаимодействия. k_{ai} и k_{di} являются соответственно константами скорости связывания и диссоциации. После прохождения тестовой зоны, раствор проходит контрольную зону, которая расположена $X_{c1} < x < X_{c2}$. В

контрольной зоне метка реагирует с иммобилизованным реагентом (R_c) с образованием комплекса R_cP ($P + R_c \leftrightarrow R_cP$). Скорость образования такого комплекса равна:

$$F_{RCP} = k_{a3}[P]([R_{C0}] - [R_cP]) - k_{d3}[R_cP]. \quad (3)$$

$[R_{C0}]$ и $[R_{C0}] - [R_cP]$ являются соответственно начальной концентрацией контрольного реагента и концентрацией реагента, доступной для связывания в контрольной линии. Концентрации свободного антигена ($[A]$, (x,t)), свободной метки ($[P]$, (x,t)), комплекса антиген-антитело ($[R_tA]$, (x,t)) и комплекса метка-антитело ($[R_tP]$) в тестовой зоне, и комплекса метка-контрольный реагент в контрольной зоне ($[R_cP]$) описаны с использованием уравнений диффузии:

$$\frac{\partial[A]}{\partial t} = \frac{D_a \partial^2[A]}{\partial x^2} - \frac{U \partial[A]}{\partial x} - F_{RTA}, \quad (4)$$

$$\frac{\partial[P]}{\partial t} = \frac{D_p \partial^2[P]}{\partial x^2} - \frac{U \partial[P]}{\partial x} - F_{RTP} - F_{RCP}, \quad (5)$$

$$\frac{\partial[R_tA]}{\partial t} = F_{RTA}, \quad (6)$$

$$\frac{\partial[R_tP]}{\partial t} = F_{RTP}, \quad (7)$$

$$\frac{\partial[R_cP]}{\partial t} = F_{RCP}. \quad (8)$$

Пусть средняя скорость поперечного сечения получена из экспериментальных данных и равна $U \sim 0,2$ мм/с. D_A и D_P являются соответственно молекулярными коэффициентами диффузии для антигена и метки. Предположим, что молекулярная масса антигена равна ~ 47 кг/моль и молекулярная масса метки ~ 7000 кг/моль. Соответственно, применяем уравнение Стокса-Эйнштейна для оценки коэффициентов диффузии: $D_A \sim 1.0 \cdot 10^{-10}$ м²/с и $D_P \sim 2.0 \cdot 10^{-11}$ м²/с. Величины коэффициентов диффузии влияют на процесс динамики, а не на состояние равновесия.

Рассмотрим случай, когда метку смешали с образцом, прежде чем наносить на мембрану. Образец, содержащий антиген с концентрацией $[A_0]$ и метку с концентрацией $[P_0]$, наносят на мембрану для образца. Таким образом, в точке $X=0$,

$$[A](0, t) = A_0 \text{ и } [P](0, t) = P_0. \quad (9)$$

В конце мембраны ($X=L$), определим условия постоянного оттока:

$$\frac{\partial[A](L,t)}{\partial x} = \frac{\partial[P](L,t)}{\partial x} = 0. \quad (10)$$

Учитывая бесконечно малые величины коэффициентов диффузии, пограничные условия не оказывают влияния на процессы в потоке. Начальные концентрации реагентов:

$$[A](x,0) = [P](x,0) = [R_tA](x,0) = [R_tP](x,0) = [R_cP](x,0). \quad (11)$$

Концентрацию метки обычно детектируют с помощью сканнера. В тестовой зоне, сигнал сканнера пропорционален $S_t = [P] + [R_tP]$. В контрольной зоне: $S_c = [P] + [R_cP]$. В остальных областях тест-полоски, свободных от взаимодействия, сигнала сканнера пропорционален $S_0 = [P]$, где S_0 фоновый сигнал. Изменение сигнала определяется выражением $\Delta S_t = S_t - S_0$ и показатель контрастности $DS_t = (S_t - S_0)/S_0$. Обозначим уровень сигнала в отсутствие антигена ($[A_0] = 0$) - S^0 . Когда скорость потока относительно высокая, столкновения между молекулами не оказывают влияния на концентрации антигена или метки в растворе. Предположим, что столкновения достигли состояния равновесия. Это условие позволяет получить относительно простые алгебраические выражения для равновесных концентраций комплекса антиген-антитело (R_tA), комплекса метка-антитело (R_tP), и комплекса в контрольной зоне (R_cP). В тестовой зоне равновесные концентрации комплексов равны:

$$[R_tP]_E = \frac{ka_2kd_1[P_0][Rt_0]}{ka_1kd_2[A_0] + ka_2kd_1[P_0] + kd_1kd_2} \quad (12)$$

$$[R_tA]_E = \frac{ka_1kd_2[A_0][Rt_0]}{ka_1kd_2[A_0] + ka_2kd_1[P_0] + kd_1kd_2} \quad (13)$$

Вне тестовой зоны концентрации рассматриваемых комплексов равны нулю. В контрольной зоне концентрация комплекса ($[R_cP]$) равна

$$[R_cP]_E = \frac{ka_3[P_0][Rc_0]}{ka_3[P_0] + kd_3} \quad (14)$$

В случае равномерного распределения реакционных компонентов, в тестовой зоне аналитический сигнал пропорционален – $S_t = [P] + [R_tP]_E = [P_0] + [R_tP]_E$. В контрольной зоне, $S_c = [P] + [R_cP]_E = [P_0] + [R_cP]_E$. В зонах, где не наблюдается взаимодействие аналитический сигнал $S_0 = [P_0]$. Таким образом, показатель контрастности равен

$$DS_t = \frac{[R_tP]_E}{P_0} = \frac{ka_2kd_1[Rt_0]}{ka_1kd_2[A_0] + ka_2kd_1[P_0] + kd_1kd_2} \quad (15)$$

$$\Delta S_t = [R_tP]_E$$

Уровень сигнала в тестовой зоне равен

$$\Delta S_t \sim \frac{ka_2kd_1[P_0][Rt_0]}{ka_2kd_1[P_0] + kd_1kd_2} \quad (16)$$

Когда $[A_0] \ll [A_c]$,

$$[A_c] = \frac{ka_2kd_1[R_0] + kd_1kd_2}{ka_1kd_2} \quad (17)$$

Другими словами, концентрация антигена ниже пороговой $[A_c]$ не будет детектироваться. Очевидно, что величина пороговой концентрации зависит от концентрации метки и может быть снижена за счет уменьшения концентрации метки. Когда концентрации антигена превышает пороговую концентрацию, величина аналитического сигнала обратно пропорциональна концентрации антигена в образце. Когда $[A_0] \gg [A_c]$,

$$\Delta St \sim \frac{ka_2kd_1[P_0][Rt_0]}{ka_1kd_2[A_0]} \quad (18)$$

Далее определим влияние концентрации метки на аналитический сигнал. Когда концентрация метки мала,

$$\Delta St \sim \frac{ka_2kd_1[Rt_0]}{ka_1kd_2[A_0]+kd_1kd_2} \quad (19)$$

Т.е. увеличивается почти линейно с возрастанием концентрации метки. При увеличении концентрации метки, увеличивается и пороговая концентрация антигена. Таким образом, главные выводы из разработанной модели можно сделать следующие: при концентрации антигена ниже пороговой величины, сигнал в тестовой зоне не зависит от концентрации антигена. Для детектирования присутствия в системе антигена, необходимо, чтобы концентрация антигена превышала пороговое значение. Величина порогового значения зависит от константы скорости реакции и концентрации метки. Чувствительность конкурентного ЛПИА возможно регулировать путем изменения концентрации метки. При концентрации антигена выше порогового значения, интенсивность сигнала обратно пропорциональна концентрации антигена. При низких концентрациях метки, наблюдается пропорциональность аналитического сигнала концентрации метки. Однако при превышении предельной концентрации метки, уровень сигнала выходит на постоянный уровень, т.е. наступает насыщение. Также при превышении концентрацией метки предельного значения, индекс контрастности уменьшается по мере увеличения концентрации метки. При низких концентрациях метки индекс контрастности не зависит от концентрации метки. В данном формате в условиях равновесия системы, уровень сигнала в контрольной зоне не зависит от концентрации антигена. Для сравнения, в другом формате конкурентного ЛПИА, в зависимости от величин констант скорости реакции, сигнал в контрольной зоне может, как уменьшаться, оставаться неизменным, так и увеличиваться, в случае если увеличивается концентрация антигена.

1.1.5. Антитела в ЛПИА

В экспресс-тестах используются три типа антител:

1) Антитела к исследуемому антигену или антителу, конъюгированные («сшитые») с коллоидным золотом – меткой, которую можно легко идентифицировать даже в самых малых концентрациях. Эти антитела нанесены на мембрану для конъюгата вблизи участка погружения тест-полоски в физиологическую жидкость.

2) Антитела к исследуемому антигену, прочно иммобилизованные в тестовой зоне полоски на аналитической мембране.

3) Вторичные антитела, прочно иммобилизованные в контрольной зоне тест-полоски [20].

Антитела, используемые в тестах, должны обеспечивать необходимую для данного анализа чувствительность, специфичность, а также оставаться стабильными после высушивания мембраны. Особое внимание уделяют подбору условий для получения конъюгатов антител с меткой, в качестве которой чаще всего выступают наночастицы золота [26, 27].

1.1.6. Метки, применяемые в ЛПИА

1.1.6.1. Латексные частицы

Первой меткой, используемой в ЛПИА, были латексные частицы. Как правило, материалом для латексных частиц служат стирол и его производные [2, 6, 26]. Полимерные частицы, используемые в ЛПИА, как правило имеют диаметр 100-500 нм, обладают узким распределением по размерам, содержат на поверхности функциональные группы, которые могут химически связывать антитела или антигены, а также обладают устойчивостью к агрегации, в том числе в средах с высокой ионной силой, например, в физиологических растворах.

Часто в ЛПИА используют окрашенные латексы. Так, в работе [28] сообщается о нековалентном встраивании в состав полистироловых микросфер зеленого флуоресцеина в процессе эмульсионной полимеризации. Также в работе [29] отмечается возможность включения в стенки латексов наночастиц металлов.

1.1.6.2. Коллоидное золото

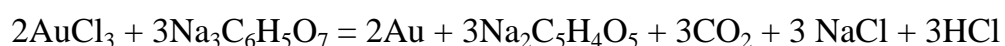
Впервые коллоидное золото было использовано в качестве метки для иммуноэлектронной микроскопии в 1971 году [30]. Основными преимуществами

наночастиц золота являются простота их приготовления, возможность получения частиц с разным диаметром, а также их окраска благодаря уникальным оптическим свойствам, в частности, основанным на явлении поверхностного плазмонного резонанса. Переменное электрическое поле приводит к когерентным колебаниям электронов в осциллирующем внешнем поле, которые называются поверхностным (дипольным) плазмоном, а оптический резонанс, связанный с этими колебаниями, - поверхностным плазмонным резонансом. Параметры плазмонного резонанса малых частиц, включая число резонансов, их положение и ширина, зависят от формы частиц, их структуры и размерных эффектов диэлектрической проницаемости. Наночастицы золота имеют один плазмонный резонанс в районе длины волны 520 нм, который сдвигается в длинноволновую область с увеличением размера частиц [31-33].

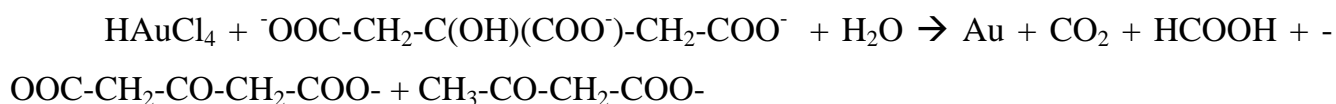
Высокая электронная плотность, способность рассеивать и излучать вторичные электроны, характерное поглощение и рассеяние в видимой области спектра, интенсивная красная окраска позволяют визуально определять наночастицы золота. Как правило, в ЛПИИ используют частицы с диаметром 15-40 нм. В основе методов синтеза лежит реакция химического восстановления соли золота Au^{3+} с образованием пересыщенного раствора молекулярного золота и последующего образования наночастиц золота. Зигмонди и Сведберг изучили кинетику процесса восстановления золотохлористоводородной кислоты и сформулировали основные представления о механизме формирования наночастиц коллоидного золота [34].

В работе Френса [35] с использованием в качестве восстановителя золотохлористоводородной кислоты цитрата натрия при $100^{\circ}C$ удалось получить стабильные монодисперсные частицы золота с диаметром 15-50 нм.

Суммарную реакцию цитратного восстановления можно представить следующим образом [36]:



При этом окисление цитрата идет до ацетондикарбоксилата и углекислого газа. Существует также другое предположение о схеме окисления цитрат- и дикарбоксилат-ионов [37]:



Отличительной чертой метода является то, что цитрат-ион одновременно выступает в роли стабилизатора и восстановителя, поэтому его концентрация играет критическую роль: ее изменение влияет как на скорость восстановления, так и на процессы роста частиц. Большое влияние на размеры частиц оказывает соотношение концентраций ионов золота и цитрат-ионов, время кипячения и скорость смешения реагентов. Разделение во времени процессов нуклеации и роста частиц является основным условием формирования монодисперсных золей. Одновременное введение раствора восстановителя в реакционную среду приводит к «взрывному» механизму нуклеации, тогда как при порционном введении оба процесса идут параллельно [33].

В работе [38] приведена зависимость диаметра золотых частиц от объема добавляемого цитрата:

$d(\text{нм}) = 38.2V^{-0.855}$, где V – объем (в мл) 1% раствора цитрата натрия в расчете на 100 мл золя. Согласно этому уравнению, с увеличением добавляемого цитрата натрия в систему размер наночастиц золота уменьшается.

Для определения среднего размера наночастиц золота традиционно используют метод электронной микроскопии [39]. Однако данный метод довольно трудоемкий, поэтому чаще применяют спектрофотометрический метод, основанный на зависимости максимума поглощения света золотых наночастиц от их размера [40]. Для определения золотых наночастиц диаметром 5-50 нм, полученных цитратным методом Френса, в работе [38] приведена калибровочная кривая, основанная на спектрофотометрических и данных электронной микроскопии. В Таблице 2 приведены максимумы пиков поглощения для некоторых размеров золотых наночастиц.

Таблица 2. Зависимость пика поглощения от размера частиц золя [38].

Средний размер частиц золота, нм	Пик поглощения, нм
12	517
15	518
20	520
35	528

1.1.6.3. Флуоресцентные метки

Флуоресцентные метки широко применяются в ЛПИА, так как позволяют проводить количественную оценку концентрации анализируемого вещества в образце. Такие метки должны обладать следующими характеристиками: иметь высокий квантовый выход, большой коэффициент экстинкции, быть химически и фотоустойчивы; иметь большой сдвиг Стокса. Из наиболее распространенных в анализе применяют метки - ксантеновые (флуоресцеин), цианиновые красители (Cy3, Cy5), родамин [41]. В работе [42] было показано, что применение флуоресцентных микросфер повышает чувствительность анализа по сравнению с наночастицами золота при определении бактерий *Escherichia coli*.

Также в качестве флуоресцентных меток могут выступать комплексы лантанидов. Комплексы европия и тербия поглощают в ультрафиолетовой области, а излучают при 600-700 нм. Но недостаток таких комплексов с металлами - низкие квантовые выходы.

1.1.6.4. Квантовые точки

Современные исследования наноматериалов привели к открытию квантовых точек (КТ), которые обладают уникальными электрическими и оптическими свойствами. Они представляют собой нанокристаллы неорганических полупроводниковых материалов диаметром 1 – 10 нм. Как правило, это соединения CdSe, CdS, ZnSe, InP или InS (Рис.3). При столь малых размерах в них проявляются квантовые свойства электронов [43, 44]. Эти частицы-полупроводники не только водорастворимы, но также могут легко конъюгировать с биомолекулами, так как сходны с ними по размерам.

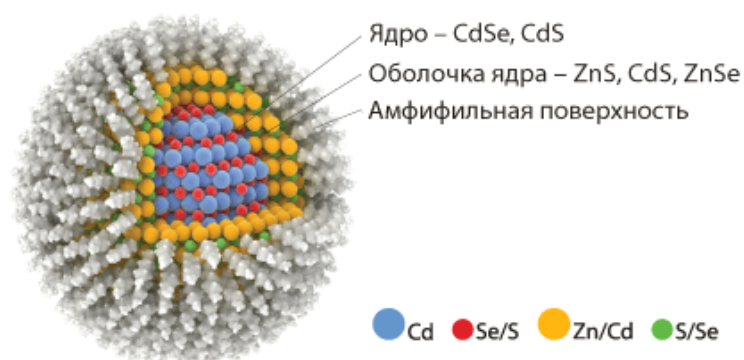


Рис.3. Структура квантовых точек.

Квантовые точки обладают высоким квантовым выходом люминесценции (до 80%), а также большим коэффициентом молярного поглощения (до $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [45]. С

целью получения более высокого квантового выхода ядро КТ покрывают тонким слоем другого полупроводника, имеющего схожую кристаллическую структуру [46].

Благодаря своим уникальным свойствам, КТ могут заместить органические флуоресцентные красители. Так же, как и у частиц коллоидного золота, оптические свойства квантовых точек зависят от их размера, и для них наблюдается широкий спектр длин волн. Особенностью КТ является большая величина Стоксова сдвига, который может достигать значения 300-400 нм в зависимости от длины волны света возбуждения [45]. Для возбуждения КТ разных размеров достаточно одного источника света. Квантовые точки обладают высокой фотостабильностью, коэффициентом абсорбции. Они сохраняют свои свойства внутри клеток, живых организмов, не подвержены разложению благодаря их неорганической природе. Образование комплексов КТ с биомолекулами - процесс сложный, это ограничивает их применение в анализе по сравнению с наночастицами коллоидного золота. Также не стоит забывать об их токсичности.

Одним из достоинств КТ является то, что при их возбуждении одним источником излучения в зависимости от своего диаметра они излучают свет в разных диапазонах спектра. На Рис. 4 показана зависимость испускаемого КТ света от размера КТ. Кроме того, в зависимости от материала, из которого они сделаны, можно получить флуоресценцию в инфракрасном диапазоне. Оптические свойства КТ не меняются в течение нескольких месяцев.

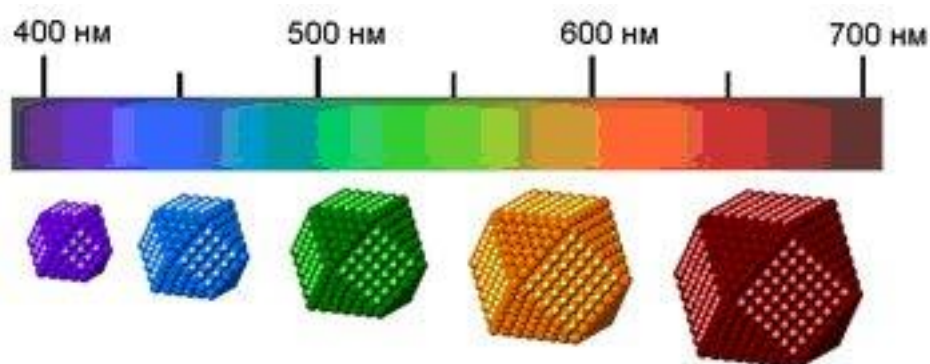


Рис.4. Зависимость испускаемого квантовыми точками света от размера квантовых точек.

Квантовые точки могут использоваться в качестве меток в ЛПИИ [47, 48]. При использовании в анализе конъюгатов КТ с антителами различной специфичности, возможно проведение одновременного мультианализа нескольких антигенов в одной

анализируемой пробе. В работе [49] было продемонстрировано применение КТ трех цветов: красного, зеленого и желтого для одновременного определения трех видов антибиотиков в сложных образцах.

1.1.6.5. Парамагнитные частицы

Парамагнитные частицы представляют собой особую группу наноразмерных частиц, обладающих магнитными свойствами. Как правило, это наночастицы оксида железа диаметром 5-50 нм – магнетита (Fe_3O_4), гематита и маггемита - кристаллических модификаций Fe_2O_3 . Частицы могут воспламеняться на воздухе при комнатной температуре, поэтому для их стабилизации необходимо создать защитную оболочку. В качестве стабилизирующих веществ могут выступать цеолит, стекло, силикагель, карбо-полимеры или водорастворимые полимеры [50]. В результате поверхность оболочки содержит функциональные реакционноспособные группы, которые могут быть использованы для получения конъюгатов с антителами с целью дальнейшего применения в иммуноанализе [45].

Магнитные наночастицы, как и золотые наночастицы, можно использовать в качестве визуальной метки в методах ЛПИА. Интенсивность сигнала зависит от размера магнитной частицы [51]. Магнитные частицы образуют окрашенную в желтый цвет линию, если концентрация определяемого вещества повышена. Поместив тест-полоску в магнитное поле и, измерив магнитный поток, можно количественно оценить результат. В присутствии магнитного поля спины неспаренных электронов ориентируются в магнитном поле в невозбужденном состоянии, формируя материал с насыщенным магнитным моментом. Внешнее магнитное поле не влияет на частицы во время хранения и транспортировки [8].

В работе [52] показано, что использование в качестве метки парамагнитных частиц позволяет создать тест-системы, чувствительность которых на 3 порядка выше соответствующих иммуноферментных систем. Способ детекции магнитных меток в данном случае основан на явлении гигантского магнитного сопротивления. На основе детекции магнитного сигнала с помощью сверхпроводящих квантовых интерференционных датчиков (СКВИД) разработан анализ для высокочувствительного количественного определения стафилококковых токсинов в продуктах питания [52].

Однако применение парамагнитных наночастиц в анализе пока более ограничено, чем, например, квантовых точек или нанотрубок из-за необходимости использования дорогостоящего оборудования.

1.1.6.6. Ферментные метки

Ферменты также могут применяться в качестве меток в ЛПИА. Но при использовании ферментов в анализе добавляется дополнительная стадия – добавление субстратного раствора для завершения анализа. В результате фермент-субстратной реакции образуются окрашенные тестовая и контрольная линии. В случае с ферментами выбор пары фермент-субстрат является важной процедурой при разработке анализа, что непосредственно влияет на чувствительность анализа.

В основном ферментные метки применяют при анализе гаптен в низких концентрациях, так как чувствительности таких меток как коллоидное золото не всегда достаточно для их определения. В качестве меток обычно применяют ферменты: пероксидазу хрена (ПХ) [54-57] и щелочную фосфатазу [58]. При анализе низкомолекулярных веществ фермент, используемый в качестве метки, ковалентно связывают с гаптен [59]. В основном при использовании фермента в качестве метки, анализ на тест-полоске проводится в двух направлениях: в вертикальном направлении пропускают исследуемый образец и необходимые иммунореагенты, далее через 15 минут в горизонтальном направлении пропускают субстратный раствор для визуализации результата. Субстратный раствор наносят в специальное окошко, далее раствор проходит в продольном направлении через аналитическую мембрану, где происходит окрашивание тестовой полосы. Для равномерного прохождения субстратного раствора с удаленной стороны тест-полоски находится специальная впитывающая мембрана. В ряде работ было показано, что при определении гаптен использование в качестве метки фермента ПХ позволяет увеличить чувствительность анализа более чем на порядок по сравнению с использованием золота в качестве метки [54-57]. В работе [60] заметное увеличение чувствительности анализа удалось достигнуть при использовании комплекса наночастиц коллоидного золота с ферментом.

1.1.6.7. Углеродные наночастицы

Углеродные наночастицы - это относительно недорогая метка и проста в получении. Благодаря черной окраске углеродные наночастицы могут быть легко

детектированы с высокой чувствительностью. Основными преимуществами являются высокая стабильность, отсутствие токсичности и необходимости активации. Углеродные наночастицы могут связываться с большим числом биомолекул для определения низко- и высокомолекулярных веществ. В последние годы иммунохроматографические системы с использованием углеродных наночастиц в качестве меток успешно применяют в медицине [61], микробиологии [62-64], безопасности питания [65]. В работе [66] было показано, что использование углеродных наночастиц позволяет получить выигрыш в чувствительности по сравнению с метками коллоидного золота, латексными частицами для определения биотин-стрептавидинового взаимодействия. В некоторых случаях, чувствительность анализа с использованием углеродных наночастиц сравнима с ИФА. Однако главным недостатком данного типа метки является неоднородность наночастиц, а также неспецифическая сорбция биомолекул на поверхности частиц.

1.2. Иммунофльтрационный анализ

1.2.1. Принцип метода

Иммунофльтрационный анализ (ИФиА) является одним из экспресс-вариантов проточного мембранного твердофазного иммуноанализа. Данный метод также основан на использовании пористых носителей (мембран), на которых иммобилизованы взаимодействующие с анализируемым веществом антитела [67]. Схема анализа основана на пропускании в перпендикулярном по отношению к поверхности мембраны направлении в определенном порядке необходимых специфических реагентов, чередуя с промывкой буферным раствором от несвязавшихся компонентов. Движение реагентов в ИФиА осуществляется под действием двух сил: силы тяжести и капиллярных сил, что отличает данный метод от метода ЛПИА, где преимущественно действуют только капиллярные силы. На Рис.5 представлена схема строения тест-кассеты для проведения ИФиА.

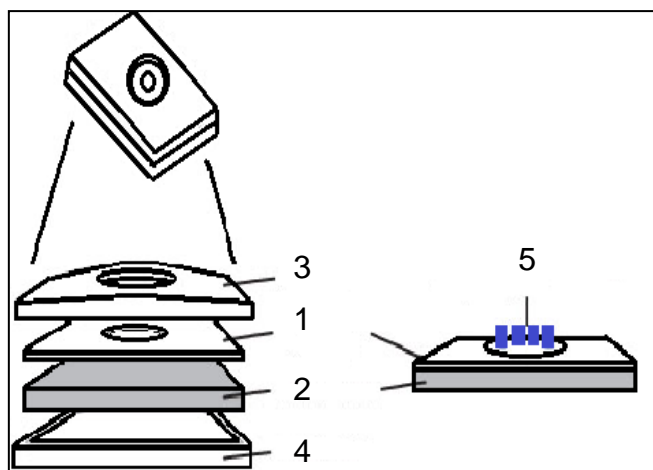


Рис. 5. Строение тест-кассеты для ИФиА, где 1 – аналитическая мембрана, 2 – адсорбирующая мембрана, 3, 4 – пластиковый футляр, 5 – тестовая зона.

Метод ИФиА был предложен в 1984 году [68]. Данный метод был представлен в виде устройства для проведения иммуноанализа, не требующего стадий инкубации. Оно состояло из пористой мембраны или фильтра, на которой иммобилизованы антитела, и расположенной под ним в тесном контакте мембраны. Размер пор пористой мембраны, был подобран таким образом, чтобы поток анализируемой жидкости двигался под действием силы тяжести и капиллярных сил, без использования специальных устройств. В качестве пористой мембраны могут использоваться как стекловолоконные фильтры,

так и различные синтетические или натуральные материалы.

Описано использование ИФиА для определения хорионического гонадотропина человека [69], различных гербицидов [70, 71], микотоксинов [72-74], сульфонамидов [75, 76], антибиотиков [77, 78] и т.д. Данный метод широко применяется для обнаружения низкомолекулярных веществ. В статье [76] было показано, что метод ИФиА на порядок более чувствительный, чем метод ЛПИА. Метод ИФиА может осуществляться как в конкурентном [69-72], так и в сэндвич-формате [69, 79]. Одними из первых были разработаны методики для конкурентного определения хлорамфеникола [80] в молоке и фумонизина [72] в кукурузосодержащих продуктах. Тест-системы представляли собой пластиковый футляр, в котором последовательно помещены впитывающая мембрана и аналитическая мембрана, с нанесенными антителами. Минимальный визуальный предел обнаружения составил 7,5-10 нг/мл. Для определения хорионического гонадотропина человека в моче использовалась сэндвич-схема анализа [69]. В данном случае антитела против хорионического гонадотропина иммобилизованы на пористой стекловолоконной мембране с использованием глутарового альдегида, а в качестве материала впитывающей мембраны был выбран ацетат целлюлозы.

Иммунофильтрационные тест-системы отличаются большим разнообразием видов устройств. Они могут быть представлены как просто тест-кассета с окошком для внесения образца, или аналогичная тест-кассета, но позволяющая анализировать одновременно несколько образцов. Такие кассеты с 8 лунками применялись в работе [72] при определении фумонизина. Также тест-система может быть представлена в виде планшета, к которому подключен вакуумный насос [81]. Для повышения чувствительности на основе принципа ИФиА создаются быстрые полуавтоматические тест-системы – амперометрические иммуносенсоры [79], кремниевые сенсоры [82], электрохимические [83] и флуоресцентные иммуносенсоры [81]. Также для снижения предела обнаружения в иммунофильтрационных тест-системах с меткой коллоидного золота применяют методики с использованием солей серебра [84] или золота [85]. Другим подходом для увеличения чувствительности в ИФиА является использование реагентов с высокой константой связывания, например, водорастворимых полиэлектролитов. В таком случае, реакция между антигеном и антителом протекает в гомогенных условиях, а связанный с антителами полиэлектролит с очень высокой скоростью взаимодействует с противоионом, иммобилизованным на мембране [86-88].

Одной из основных проблем ИФиА является наличие фонового сигнала. Для получения четкого видимого сигнала и отсутствия фонового сигнала, стадии промывки буферным раствором не всегда бывает достаточно. В работе [89] по определению афлатоксина М1 в молоке был предложен метод для обработки аналитической мембраны с целью нивелировать фоновый сигнал и неспецифическое связывание. Методика проведения анализа состояла в следующем: нейлоновые мембраны резали на квадраты размером 2*2 см, на мембраны иммобилизовали специфические антитела. Для уменьшения фонового сигнала мембраны инкубировали в растворе, содержащем 2% казеина 30 мин, далее мембраны высушивали при 37°C 30 мин. Данная методика получила широкое распространение и активно применялась в ряде работ [90, 91]. В качестве белка помимо казеина применяется БСА [92], а также смесь белков.

1.2.2. Метки в ИФиА

Чаще всего в ИФиА используют ферментные метки (ПХ [73-75, 93], щелочная фосфатаза [79, 94]) и коллоидное золото [95, 96]. Если в качестве метки применяется фермент, необходимо удалить несвязавшийся меченый реагент, промыв аналитическую мембрану раствором буфера. Такие устройства позволяют проводить в основном либо качественную, либо полуколичественную оценку результата и ограничены для оценки высоких концентраций анализируемого вещества. Данное ограничение заключается в зависимости ИФиА от концентрации метки для регистрации видимого сигнала, неспецифическом связывании, и перекрестной реактивности, которая обычно присутствует при высоких концентрациях белка [97]. Для модификации ИФиА с целью определения аналита в более широком диапазоне концентраций в качестве метки использовали латексные частицы [98, 99], квантовые точки [97, 100]. Коллоидные красители (R-3) впервые применили Сноуден и Гоммель в виде конъюгата антител для индикаторной реакции [101]. Метод был успешно применен для определения африканской трипаносомальной инфекции [102, 103].

Работа [104] посвящена исследованию влияния различных субстратных растворов на образование окрашенного продукта на мембране и формированию аналитического сигнала при использовании в качестве метки фермента. Для ферментов ПХ и щелочной фосфатазы были рассмотрены различные коммерческие субстратные растворы. Субстраты The Metal Enhanced DAB, 4-CN и CN/DAB фирмы Pierce (США) для ПХ не дали окраски на мембране, даже при высоких концентрациях иммунореагентов и

большом объеме использованного субстрата. Субстрат The Vector NovaRed (Vector Laboratories, США) показал слабую красную окраску, которая развивалась в течение 15-20 минут после добавления субстрата, также как и субстраты Single Component TMB Peroxidase EIA Substrate Kit (Bio-Rad laboratories, США) и 1-step Turbo TMB-ELISA (Pierce, США) дали слабые едва заметные голубые пятна в тех же условиях. ТМБ и субстраты, используемые для ИФА, образуют растворимый продукт окисления, который адсорбируется на мембране. Наилучший результат получен для раствора Colorburst Blue TMB/Peroxide solution (Alerchek, США): интенсивно окрашенные темно-голубые пятна наблюдаются на мембране через 1-2 минуты. При использовании Seramun Blau pres (Seramun Diagnostica, Германия) наблюдается низкий фоновый сигнал, но развитие окраски происходит медленнее и интенсивность сигнала слабее, чем при использовании TMB Colorburst. При работе с Seramun Blau pres иммунореагентов требуется в 2 раза больше, чем при использовании Colorburst Blue TMB.

Также было проведено сравнение двух ферментных меток: ПХ и щелочной фосфатазы. Применение конъюгата анализируемого вещества с щелочной фосфатазой показало лучшие аналитические характеристики, анализ более устойчив к матрикс-эффекту. Наблюдалось лучшее представление визуального результата.

В статье [75] было показано, что получение конъюгата ПХ с применением глутарового альдегида приводит к довольно высокому фоновому сигналу. В работе было предложено использование парабензохинона для синтеза конъюгата. В результате синтезированный конъюгат можно было использовать в концентрации в 10 раз ниже, что позволило уменьшить фоновый сигнал.

1.2.3. Мембраны в ИФиА

По химическому составу в ИФиА аналитические мембраны могут быть нитроцеллюлозными, полиамидными, полиэтиленсульфоновыми, целлюлозными, стекловолоконными, полиэтиленсульфоновыми и т.д. Мембраны должны обладать следующими свойствами: высокой сорбционной емкостью, эффективно связывать иммунореагенты, хорошими гидродинамическими и физическими свойствами, обеспечивать минимальную диссоциацию иммобилизованных реагентов и низким фоновым сигналом. Одним из часто используемых материалов является нейлон, содержащий остатки аминогрупп, которые могут быть использованы для ковалентной иммобилизации антител глутаральдегидным методом. Для иммобилизации антител на

стекловолоконных мембранах применяют аminosиланы. Наиболее полно рассмотрены и исследованы различные виды мембран в работе [67]. Для сравнения мембран был использован формат, когда в тестовой зоне иммобилизованы антитела. Мембраны PES4, PES10, CA1 и C5 фирмы Intersep (США) были исключены на начальной стадии из рассмотрения, так как обладали плохими гидродинамическими свойствами. Наиболее чувствительный иммуноанализ наблюдался для мембран Immobilon P, PVDF-plus и Nytran, возможно, благодаря использованию меньших концентраций иммунореагентов, высокой сорбционной емкостью, а также отсутствием процесса десорбции. Анализ проводился в формате: планшет с фильтрующей системой. Другие критерии для отбора мембран – это скорость фильтрации и наилучшее соотношение полезный - фоновый сигнал.

Таблица 3. Сравнение характеристик аналитических мембран [67].

Наименование мембраны	Производитель	Время фильтрации, мин	Фоновый сигнал, %
Immobilon P	Millipore	6	5-8
PVDF-plus	Micron separations	16	8-10
NitroPure	Micron separations	12	12-15
NitroBind	Micron separations	11	12-15
Immunodyne	Pall Biosupport	9	10-12
MagnaNylon	Micron separations	15	12-15
MagnaCharge	Micron separations	10	8-10
MagnaGraph	Micron separations	13	8-10
Nytran	Schleicher and Schuell	9	20-25
BA 85	Schleicher and Schuell	12	12-15
Glass fiber GF/C	Whatman International	6	3-5

Как видно из представленной Таблицы 3 только стекловолоконная мембрана GF/C и мембрана Immobilon P имеют самый низкий фоновый сигнал, а также короткое время фильтрации.

Помимо материала, из которого изготовлены мембраны, ключевой характеристикой является размер пор мембран. При увеличении размера пор,

увеличивается скорость потока реагентов, что оказывает существенное влияние на чувствительность анализа. Так же при анализе сложных образцов, таких как молоко, кровь и т.д. размер пор оказывает влияние не только на скорость потока, но и возможность протекания данного образца сквозь мембрану. В случае если данная возможность отсутствует, и образец не проходит через аналитическую мембрану, используют различные подходы: разбавление образца, если позволяет чувствительность метода, использование префильтров [75, 77, 89], позволяющих отделить наиболее крупные компоненты образца, а также вакуумных насосов [81].

Выбор впитывающей мембраны не так критичен, для анализа применяют различные пористые мембраны, например, на основе ацетата целлюлозы.

1.3. Физиологическая роль ПГ и методы его определения

1.3.1. Роль ПГ в организме коров

Главный гестагенный гормон ПГ был открыт Корнером и Алленом в 1928 году, а его химическая структура (Рис.6) охарактеризована Слоттом с сотрудниками в 1934 году. ПГ относится к классу прогестинов, которые представляют собой С-21-стероиды с кетогруппой в положении С-3 и двойной связью между 4-м и 5-м атомами углерода.

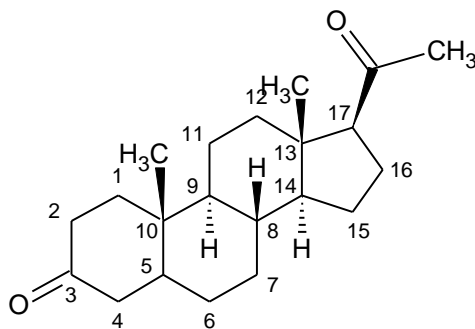


Рис 6. Химическая структура ПГ.

Физические свойства. Молекулярный вес ПГ равен 314,46 г/моль. Он представляет собой белый с желтоватым оттенком кристаллический порошок. ПГ практически нерастворим в воде ($s = 4,2 \cdot 10^{-5} \text{M}$), но очень легко растворяется в этаноле, хлороформе и малорастворим в растительных маслах. Количественно ПГ определяют спектрофотометрическим методом по максимуму поглощения при 241 нм, используя в качестве растворителя этанол, и гравиметрическим методом, используя реакцию осаждения 2,4-динитрофенилгидразона.

Химические свойства. ПГ реагирует с концентрированной серной кислотой (реакция обусловлена наличием стероидного цикла). При добавлении воды образуется желтое окрашивание с зеленой флуоресценцией, далее при добавлении хлороформа оба слоя обесцвечиваются. При реакции спиртового раствора ПГ с м-динитробензолом в щелочной среде образуется соединение, окрашенное в красный цвет [105].

Прогестерон - это наиболее важный прогестин, который является промежуточным продуктом в биосинтезе многих стероидных гормонов. Биосинтез ПГ происходит в два этапа, начиная с холестерина, источником которого являются липопротеины плазмы. Сначала холестерин в митохондриях превращается в прегненолон при расщеплении боковой цепи. Затем прегненолон перемещается в эндоплазматический ретикулум, где он превращается в ПГ с помощью фермента 3-бета-гидроксистероиддегидрогеназы-

изомеразы (Рис.7). Расщепление боковой цепи холестерина является скоростью-лимитирующей стадией этого пути и контролируется гормонами биосинтеза ПГ [106].

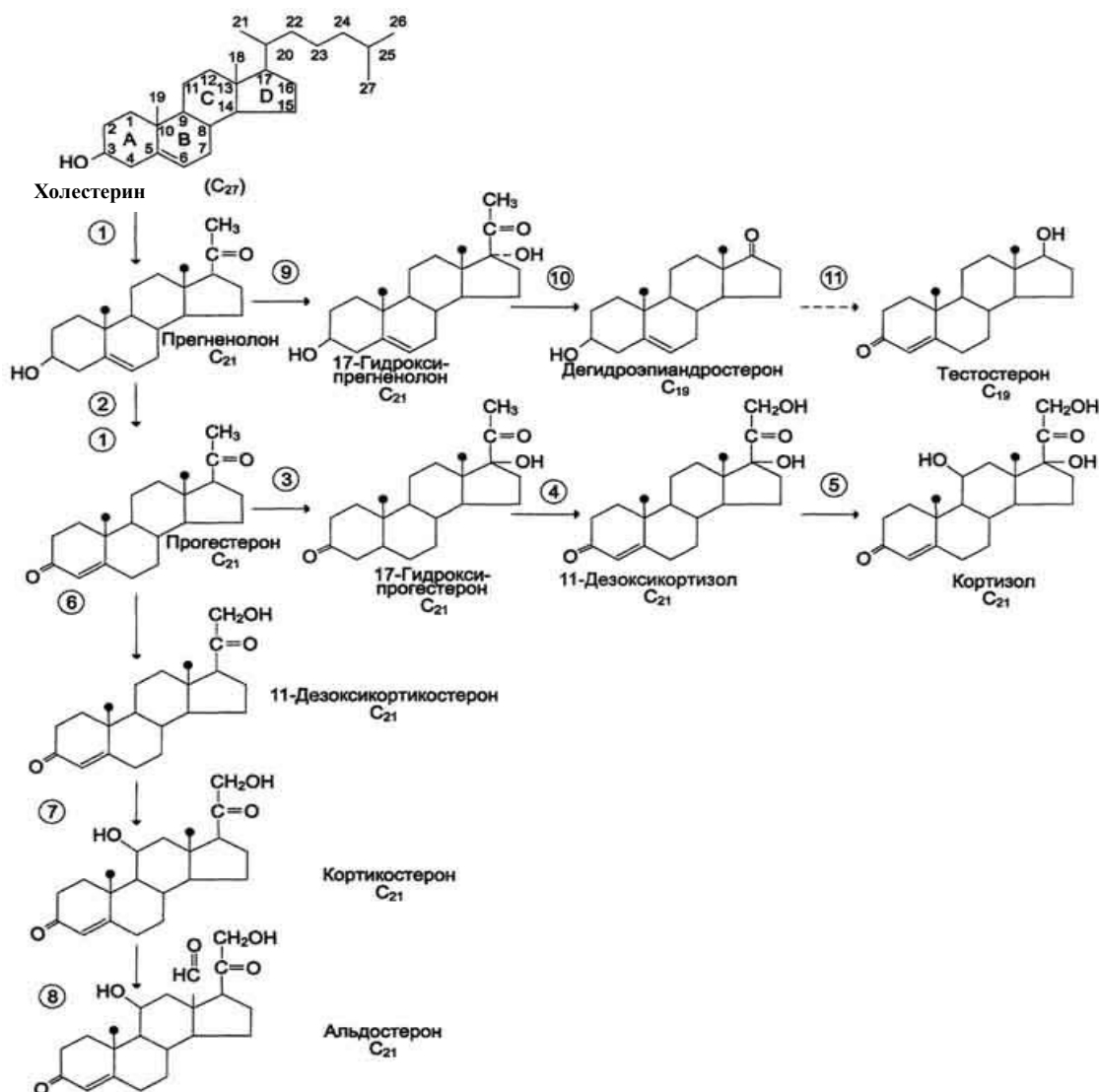


Рис. 7. Основные этапы синтеза стероидных гормонов [106].

ПГ также является одним из важнейших регуляторов физиологического статуса млекопитающих. Он секретируется желтым телом, образующимся из фолликула после выхода ооцита под влиянием лютеинизирующего гормона, вырабатываемого передней долей гипофиза [107]. В начале беременности ПГ вырабатывается желтым телом до тех пор, пока сформировавшаяся плацента не начинает осуществлять самостоятельную выработку гормонов. Вследствие оплодотворения яйцеклетки и ее имплантации образуется хорион, а секретируемый его клетками хорионический гонадотропин продлевает существование желтого тела и секрецию ПГ. Далее функцию секреции берет на себя плацента. Постепенно уровень хорионического гонадотропина снижается, а образование ПГ в плаценте продолжает увеличиваться до конца беременности, что

является необходимым условием ее нормального развития. Нехватка ПГ во время беременности может привести к ее прерыванию. Желтое тело секретирует также два других стероида 17-альфа-гидроксипрогестерон и 20-дигидропрогестерон [108]. Эти три стероида составляют основную часть природных прогестинов, представляющих собою стероиды, стимулирующие беременность. ПГ намного активнее, нежели его производные.

Прогестерон в коровьем молоке. Уровень ПГ в коровьем молоке изменяется циклично. На рис.8 показано, как меняется концентрация ПГ в молоке в течение одного полового цикла: содержание менее 3 нг/мл соответствует моменту овуляции (или эструса), затем постепенно оно возрастает до максимума (10-15 нг/мл) на 13...15 сутки. Если стельность не наступает, то между 17 и 21 днями после последней течки количество ПГ быстро падает, что указывает на начало следующего цикла созревания яйцеклетки. Если животное становится стельным, то высокая концентрация гормона сохраняется. Стельной корова считается при концентрации ПГ в молоке более 7 нг/мл [109]. Как видно, из представленного Рис.8 уже на 19-21 день концентрация ПГ у стельной и нестельной коровы существенно различаются. Поэтому именно в это время путем определения концентрации ПГ можно диагностировать стельность коров. Определять концентрацию ПГ можно как в сыворотке крови, так и в молоке коров. Однако наиболее доступным и простым с точки зрения получения биологического материала является, конечно, молоко.

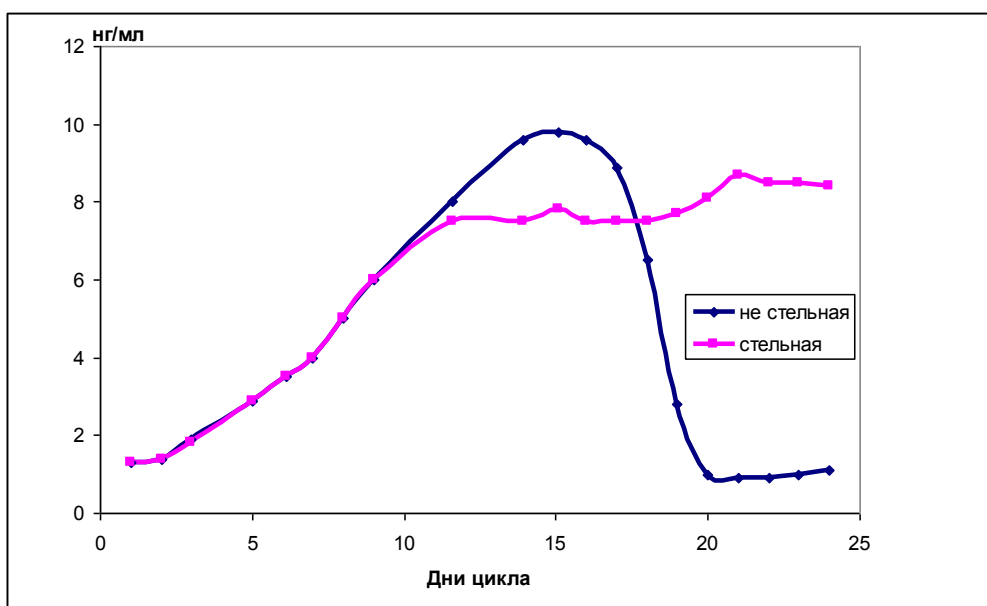


Рис.8. Изменение уровня ПГ в молоке у коров в половой период [109].

Впервые в работе [110], было показано, что определение концентрации ПГ в молоке может являться методом для диагностирования стельности. Содержание ПГ в коровьем молоке коррелирует с его содержанием в сыворотке крови (Рис.9), поэтому ПГ используют в качестве маркера для определения стельности коров (коэффициент корреляции $r=0,88$), измеряя его содержание в крови или молоке [111-113].

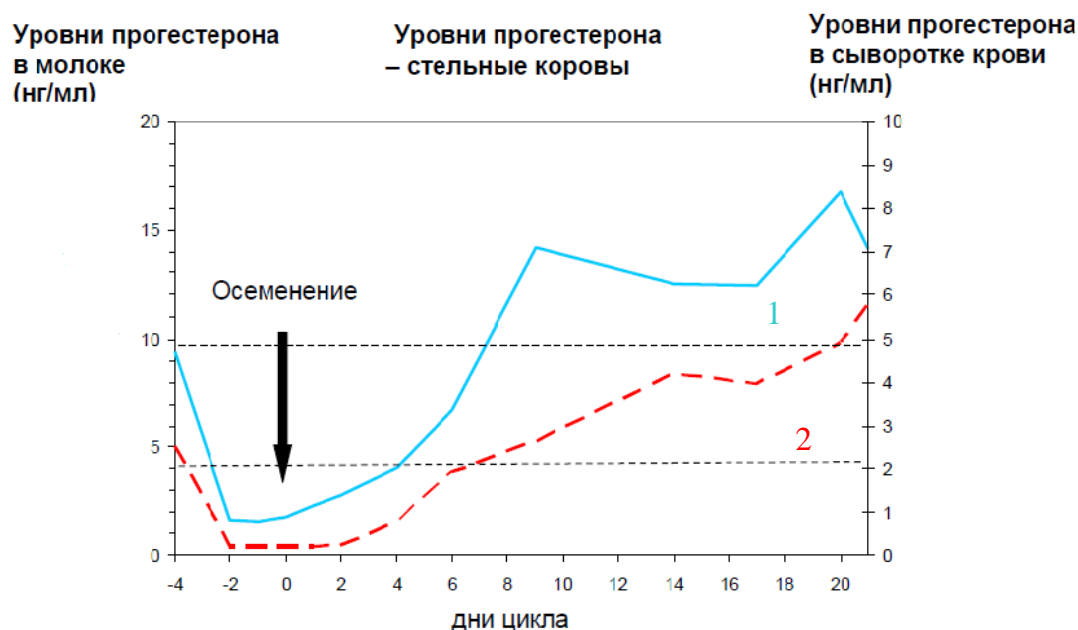


Рис.9. Изменение уровня ПГ в половой период в коровьем молоке (1) и плазме крови (2) [111].

Из-за своей липофильной структуры, ПГ присутствует в молоке в более высоких концентрациях, нежели в сыворотке крови [111, 114]. При этом около 80% ПГ находится в жировой фракции молока. Массовая доля ПГ в молоке колеблется от $5 \cdot 10^{-3}$ до $12,5 \cdot 10^{-3}$ мкг/мл [115, 116]. В работе [117] при помощи метода РИА были определены концентрации ПГ в коровьем молоке во время беременности на 30, 60, 90 день и т.д. Концентрация ПГ варьировалась от 15 до 26,2 нг/мл. Это в 4 раза выше, чем содержание ПГ в сыворотке крови (при средней концентрации ПГ в молоке 21,2 нг/мл и концентрации ПГ в плазме крови 5,3 нг/мл). Количество ПГ, содержащееся в коровьем молоке начинает превышать количество ПГ в плазме крови уже на 4-5 день после осеменения [118]. В молоке ПГ может присутствовать как в связанной с белками, так и в свободной форме. Обмен между свободной и связанной формами ПГ происходит довольно быстро, поэтому обе формы участвуют в физиологической активности гормона [119].

На содержание ПГ в образцах молока существенно влияет время и способ отбора пробы. В работе [120] было показано, что процентное содержание жира в образцах молока, собранных во второй половине дня, выше, чем в образцах, полученных во время утренней дойки, таким образом, и содержание ПГ в вечерних образцах молока будет выше. По жирности молочные образцы также различаются в зависимости от фракции полученного молока во время одного доения. Различают следующие фракции молока: цистернальное молоко, находящееся в молочной цистерне коров и крупных молочных ходах, альвеолярное, содержащееся в более мелких образованиях емкостной системы вымени, и остаточная порция, которая остается в вымени после доения. У коров в разгаре лактации цистернальная порция молока составляет 40-50% удоя, альвеолярная- 50-60% и остаточная-15-20% [121]. Процентное содержание жира в альвеолярном молоке практически в 2 раза выше, чем в цистернальном. В работе [120] так же было показано, что содержание ПГ в цистернальном молоке заметно ниже, чем в альвеолярном, а содержание ПГ в альвеолярном и остаточном молоке практически не отличаются друг от друга. Чтобы минимизировать различия в процентном содержании жира в образцах молока, а, следовательно, и в концентрациях ПГ, молочные образцы отбирают из усредненной порции молока или в одно и то же время доения [122].

1.3.2. Методы определения ПГ для выявления стельности коров

Первые методы для определения стельности коров по уровню низкомолекулярного гормона ПГ были основаны на методах газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Определение ПГ проводили как в молочных образцах [123], так и в сыворотке крови [124]. Ввиду того, что ПГ является неполярным соединением для проведения анализа, проводится дополнительная стадия получения производного ПГ [125]. Данные методы не получили широкого применения для определения стельности, так как довольно трудоемкие и требуют специального дорогостоящего оборудования и не пригодны для скрининга большого количества образцов [123,125, 126].

Более широкое распространение для определения ПГ получили иммунохимические методы анализа. Они основаны на специфическом связывании антителами ПГ в исследуемом образце. В случае определения гаптенных возможностей метода ограничены конкурентной схемой анализа. В таком случае исследуемый образец конкурирует с меченым антигеном за центры связывания антител. Количество меченых

иммунных комплексов обратно пропорционально количеству свободного антигена в пробе. В качестве метки используют радиоизотопы (РИА), ферменты (ИФА), флуорофоры (флуоресцентный иммуноанализ) и окрашенные наночастицы (ЛПИИ).

1.3.2.1. Радиоиммунологический анализ (РИА)

Первый метод РИА ПГ был разработан в 1973 году [126]. В качестве метки использовали тритий [127, 128]. Начиная уже с 1980 года стали появляться первые работы, где в качестве радиоактивной метки использовали ^{125}I [129], который в дальнейшем получил широкое распространение для данного вида анализа. Также в качестве радиоактивных меток используют ^{14}C .

Для оценки количества меченых иммунных комплексов, их необходимо отделить от свободного меченого антигена. Наиболее распространены два способа разделения:

1. К реакционной смеси добавляют вещество, повышающее ее плотность, например, полиэтиленгликоль [130].

2. К реакционной смеси добавляют вещество с большой молекулярной массой, которое специфически связывается с антителами в составе иммунных комплексов. Для этого используют вторичные антитела. Иммунные комплексы, имеющие большую молекулярную массу, чем свободные антигены, осаждают центрифугированием и измеряют радиоактивность осадка [131].

В работе [132] предложена методика разделения меченого иммунокомплекса ПГ и немеченого ПГ с использованием активированного угля. К раствору меченого и немеченого реагента добавляют суспензию активированного угля и декстрана. Далее реакционную смесь инкубируют при 0°C в течение 10 мин, центрифугируют, и супернатант, содержащий связанный ПГ, декантируют и проводят регистрацию результата.

Существует несколько вариантов проведения РИА ПГ. Методика, описанная выше, называется жидкофазным РИА (все реагенты находятся в растворенном состоянии). Существует и твердофазный РИА, в котором антитела иммобилизованы на водонерастворимом носителе, например, на полистироле [131]. Другой подход РИА описан в работе [133]. Методика его проведения заключается в следующем: антитела к ПГ инкубируют с образцом или стандартным раствором ПГ и меченым реагентом 2 часа при комнатной температуре. Разделение связанных и несвязанных форм ПГ проводят при помощи реагента, содержащего вторичные антитела и полиэтиленгликоль.

Чувствительность такого метода анализа для определения ПГ в молоке составила 0,05 нг/мл.

Для приготовления стандартных растворов ПГ чаще всего используют обезжиренное молоко, которое получают путем центрифугирования (10 мин при 4229g) и удаления жирового слоя [134] или в молоко добавляют активированный уголь, и после центрифугирования, также удаляют жировой слой [135].

Метод РИА обладает довольно высокой чувствительностью, он позволяет определять ПГ в довольно низких концентрациях порядка 0,05 нг/мл [133]. Однако применение данного метода ограничено использованием радиоактивных веществ, время жизни которых достаточно короткое, кроме того возникают проблемы с утилизацией радиоактивных веществ. Также важно наличие специального оборудования для проведения эксперимента с радиоактивными изотопами.

При определении стельности коров методом РИА точность отрицательного результата, т.е. определения нестельных коров составляет 95-100% [128, 136]. В случае положительного результата при использовании данных полученных при анализе проб в день осеменения и на 21-23 после осеменения точность определения составила порядка 80%. Если же для анализа использовать результат, полученный только на 21-23 день после осеменения, то точность определения снижается до 72% [137].

1.3.2.2. Иммуноферментный анализ (ИФА)

Впервые использовать фермент вместо изотопов в иммуноанализе было предложено в работах [138] и [139]. Уже в 1975 году был разработан первый ИФА для определения ПГ в плазме крови [140]. При проведении ИФА на последней стадии образуется окрашенный продукт окислительно-восстановительной реакции, цвет которого определяется используемым субстратом. В качестве метки использовали щелочную фосфатазу [141], β -галактозидазу [142-144], ПХ [145, 146] и пенициллиназу [147]. В результате реакции фермента с субстратным раствором происходило окрашивание реакционной смеси. Интенсивность окраски обратно пропорциональна содержанию ПГ в анализируемом образце [148].

Поскольку ПГ является гаптенем, для разработки ИФА важным является выбор производной ПГ, которая используется для выделения сыворотки антител и для получения конъюгата ПГ с ферментом. Это обуславливается тем, что при конкуренции анализируемого ПГ в пробе и меченого ПГ за фиксированное количество центров

связывания антител, иммобилизованных на поверхности, может легко происходить замещение одного компонента на другой, в случае если их константы аффинности антител будут сильно различны. Ранее было показано, в гетерогенном конкурентном ИФА аффинность антисыворотки по отношению к гомологичному конъюгату с ферментом в 10 раз ниже, чем к ПГ, меченного тритием [149]. Прогестерон, меченный тритием был аналогичен ПГ, содержащемуся в пробе с константой связывания 10^{10} M^{-1} . Данный факт был объяснен в работе [145]. Было показано, что стерический фактор строения молекулы анализируемого вещества, меченного ферментом, оказывает заметное влияние на величину константы аффинности. Данные метки могут выступать менее эффективными конкурентами для анализируемого компонента в реакции. Одним из самых эффективных и широко используемых производных ПГ применяемых в ИФА является 11 α -гемисукцинат ПГ. В качестве иммуногена для получения антисыворотки на ПГ используют конъюгаты: гемисукцинат 11 α -гидроксипрогестерона с БСА [150], 11 α -гемисукцинат ПГ с БСА [151], 3-О-карбоксиметилоксимпрогестерона с БСА [152], 7 α -карбоксииэтилтиоэфир ПГ с БСА [153]. Для образования конъюгата ПГ с ферментом используют следующие производные ПГ: 3-О-карбоксиметилоксимпрогестерон, 11 α -гемисукцинат ПГ, 11 α -карбоксиметилэфир ПГ, 6 β -гемисукцинат ПГ [154], 6 β -гидроксигемисукцинат ПГ [155]. В работе [154] провели сравнение использования в анализе конъюгатов вышеперечисленных производных ПГ. Высокой аффинностью обладал конъюгат 11 α -гемисукцинат ПГ с ПХ, который являлся гомологичным иммуногену, используемому для получения сыворотки антител.

При поведении ИФА ПГ в качестве основной схемы проведения используют схему, когда антитела к ПГ сорбируют на носителе, на следующей стадии добавляют анализируемый образец и конъюгат ПГ, меченный ферментом. Дж. Митчелл в своей работе предложил альтернативную схему проведения ИФА ПГ [156]. В данном случае на пористом носителе сорбируют белковый конъюгат ПГ, далее добавляют анализируемый образец и антитела, специфичные к ПГ. После инкубации добавляют вторичные антитела, меченные ферментом.

Для определения концентраций ПГ в молоке существует несколько подходов. Первые методы ИФА для определения ПГ проводили путем экстракции ПГ из цельного молока [157], обезжиренного молока [143] и молочного жира [146]. В 1982 году был разработан метод ИФА, позволяющий напрямую определять ПГ в цельном молоке [158,

159]. Также для определения ПГ применялись различные методики разбавления образца. Так, например, в работе [150] при проведении анализа образцы молока разбавляли в 5 раз раствором KCl. Предел обнаружения такого метода для определения ПГ составил 0,07 нг/мл. В работе [156] разработан ИФА для определения ПГ, в котором образцы молока разбавляли фосфатным буфером, содержащим 0,02% тимерозаля, 0,1% БСА. Предел обнаружения для данного метода определения ПГ в молоке составил 0,4 пкг/мл. В работе [160] было показано, что количество ПГ, которое содержится в жировой фракции молока в 50-100 раз выше, чем в водной фракции молока. Поэтому, для получения стандартных растворов ПГ для удаления ПГ из молока используют методику с использованием активированного угля, описанную в работе [161]. К образцу молока добавляют активированный уголь и при перемешивании инкубируют в течение 2 часов. Далее полученную смесь центрифугируют, жировую фракцию удаляют, а обезжиренное молоко используют в дальнейшем для приготовления стандартных растворов. Другой метод проведения ИФА в молоке описан в работе [146]. В данном методе аликвоты молока разделяли петролейным эфиром на водную и жировую фазы. ПГ экстрагировали из жировой фазы в системе метанол-вода. Далее ПГ высушивали при 40°C и в дальнейшем использовали для приготовления стандартных растворов. В работе [162] для выделения ПГ на первом этапе была выделена жировая фракция молока путем центрифугирования. Далее молочный жир в пробирке помещали в водяную баню с температурой 90°C на 5-10 мин. В пробирке образовывался желтый раствор молочного жира, который экстрагировали по методике, приведенной в работе [146]. Уровни ПГ измеряли методом ИФА с применением вторичных антител. Данные методы оказались более чувствительными, и вероятность ошибки в концентрации ПГ была минимальна. Существуют также методы определения ПГ в молочной сыворотке. В работе [163] был разработан прямой ИФА для определения ПГ в молоке и молочной сыворотке. Суть пробоподготовки заключалась в добавлении к образцу молока специального раствора, который ускорял процесс сворачивания молока. Молоко свертывалось, далее его нагревали до 40°C и центрифугировали 10 мин при 3000*g. Полученное обезжиренное молоко использовали в анализе. Предел обнаружения такого метода определения ПГ в молоке составил 1 пкг/мл.

В последние годы в ИФА предложена технология с использованием магнитных частиц. Специфические антитела иммобилизуют на аминомодифицированных

магнитных частицах с помощью глутаральдегида. В работе [164] при определении ПГ в цельном молоке коров удалось повысить чувствительность на порядок по сравнению с классическим методом ИФА.

При определении ПГ в плазме крови для пробоподготовки применяют методы аналогичные определению ПГ в молоке: экстракция ПГ, разбавление образцов, использование активированного угля. Чаще всего проводят экстракцию ПГ из образцов сывороток крови. Как было показано в работах [165-167] при простом разведении образцов сывороток крови чувствительность определения ПГ значительно снижается.

Метод ИФА ПГ используют в молочных хозяйствах для определения стельности, скрытых причин бесплодия, в том числе возможной гипофункции яичников, лютеиновой кисты, персистентного желтого тела, оценки овуляции и диагностики ранней эмбриональной смертности [168]. Было показано, что при определении стельности методом ИФА точность диагностики для положительных результатов составляет от 67,3 до 84,5%, и для отрицательных результатов 87,7-100% [169-173]. Для определения стельности методом ИФА на ранних сроках на 18-21 день характерно наличие ложноположительных результатов. Главной причиной является эмбриональная смертность. В работе [174] определяли стельность коров методом ИФА на 18 и 22 сутки после осеменения. Из 34 исследованных образцов молока у 6 коров уровень ПГ на 18 сутки был высокий, а на 22 сутки заметно снизился. Для данных коров методом УЗИ была подтверждена эмбриональная смерть плода. В работах [174, 175] показано, что на ранних сроках на 18-19 день после осеменения, используя метод ИФА можно со 100% вероятностью определять нестельных коров. Однако для определения времени овуляции, наблюдаемые значительные вариации по времени снижения уровня ПГ, мешают точному установлению времени овуляции. Мониторинг снижения уровня ПГ можно применять в совокупности с традиционными методами для повышения точности определения времени овуляции [176].

Таким образом, преимущество ИФА заключается в высокой чувствительности к ПГ в широком диапазоне концентраций. Также данный метод удобен для скрининга множества образцов, что позволяет значительно сократить время проведения анализов.

1.3.2.3. Флуоресцентный иммуноанализ

Флуоресцентный иммуноанализ позволяет определять ПГ как в молоке, так и в плазме крови. Он обладает большей чувствительностью по сравнению с РИА. Гормоны

меченые лантаноидами химически гораздо стабильнее, чем соединения с радиоактивной и ферментной меткой. В работе [177] разработан флуоресцентный иммуноанализ для определения ПГ в сыворотке крови и в молоке. Перед проведением анализа сыворотку крови инкубировали с активированным углем при перемешивании. Так как концентрация ПГ в молоке выше, чем в сыворотке крови, количество образца при анализе молока использовали в 2 раза меньше чем при анализе сыворотки. В данном методе в качестве меченого реагента применяли ПГ, меченный европием. Предел обнаружения при проведении такого анализа составил 0,65 нг/мл при определении ПГ в сыворотке крови и при определении в молоке - 2,72 нг/мл.

1.3.2.4. Биосенсоры для определения ПГ

Под термином «биосенсор» понимают устройство, в котором чувствительный слой, содержащий биологический материал, непосредственно реагирующий на присутствие определяемого компонента, генерирует сигнал, функционально связанный с концентрацией этого компонента. Конструктивно биосенсор представляет собой комбинированное устройство, состоящее из двух преобразователей: биохимического и физического, находящихся в тесном контакте друг с другом. Наличие в устройстве биоматериала с уникальными свойствами позволяет с высокой селективностью определять нужные соединения в сложной по составу смеси, не прибегая к дополнительным операциям, связанных с использованием других реагентов или пробоподготовкой.

В основе работы биосенсоров для определения ПГ лежит специфическое узнавание антителами исследуемого компонента. Один из первых биосенсоров для определения ПГ в молоке представлял собой автоматизированную версию иммуноферментного анализа [178]. Устройство включало в себя насос для микроинъекций, насосы для прокачки жидкости, фотодиоды для измерения сигнала и компьютер для автоматизации процесса. Такой биосенсор представляет собой тестовый блок, где находятся резервуары для стандартного раствора ПГ с нулевой концентрацией и раствора образца. Объем резервуаров рассчитан на проведение 10 тестовых циклов. Исходящий сигнал рассчитывается, как процент связывания анализируемого антигена с антителом. Быстрота анализа требует точной и надежной работы насосов. Одним из недостатков данного метода является потеря активности фермента из-за его взаимодействия с полистиролом, которым покрыт резервуар. Также с каждым

последующим циклом наблюдается довольно высокий фон, из-за накопления остатков используемого конъюгата с пероксидазой.

В работе [179] представлен другой тип биосенсора, который основан на измерении иммунореакции через изменение плотности заряда, что происходит, когда антитела покрывающие мембрану, осажденные на ион-селективном униполярном транзисторе, реагируют с заряженным антигеном. Путем использования конкурентного связывания ПГ и заряженного комплекса ПГ-лизоцим было продемонстрировано, что данный метод, может быть применим для определения незаряженных молекул. Однако нужной чувствительности для определения ПГ в заданном диапазоне концентраций в молоке достигнуто не было.

В 1998 году был разработан амперометрический биосенсор для определения ПГ в молоке, основанный на снижении связывания ПГ, меченного щелочной фосфатазой с антителами, иммобилизованными на поверхности углеродных электродов, в присутствии ПГ в образце молока. В качестве субстрата применяли нафтил фосфат, при этом 1-нафтол, генерируемый в процессе реакции окислялся электрохимически, что продуцировало сигнал, величиной обратно пропорциональной концентрации ПГ в молоке [180]. В работе [181] разработан электрохимический иммуносенсор на основе непрямого конкурентного иммуноанализа, состоящий из иммобилизованного белкового конъюгата ПГ, специфических антител к ПГ и вторичных антител, меченных ПХ. В качестве субстрата использовали 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Предел обнаружения составил 0,16 нг/мл.

Особую группу биосенсоров составляют устройства, основанные на явлении затухающих волн, среди которых выделяют явление поверхностного плазмонного резонанса и флуоресценцию полного внутреннего отражения. Данные технологии основаны на возникновении плазмонов, квази-частиц, которые возникают при квантовании плазмонных колебаний, что может быть сравнимо с фотонами в световой волне. Когда плазмон сталкивается с молекулой, характеристики, зависящие от молекулярной массы, изменяются и могут быть измерены [182].

Биосенсор для определения ПГ в молоке, основанный на явлении поверхностного плазмонного резонанса, представлял собой чип, на поверхности которого ковалентно иммобилизовали ПГ. В качестве носителя использовали карбоксиметилдекстран. Фиксированное количество моноклональных антител на ПГ, смешивали с

анализируемым образцом и количество несвязавшихся антител определяли, используя анализ биомолекулярного взаимодействия антител с иммобилизованным на поверхности сенсора ПГ. Предел обнаружения ПГ в молоке с помощью такого сенсора составил 8,6 нг/мл [182]. В работе [183] была проведена модификация данного биосенсора путем формирования самособирающегося монослоя, который представлял собой поверхность, состоящую из золотых наночастиц и покрытую смесью специфических реагентов, на которой иммобилизовали конъюгат ПГ. Также было выяснено, что для определения низкомолекулярных веществ огромную роль играет размер частиц золота, так при использовании частиц достаточно большого размера возникают стерические затруднения при проведении иммунохимической реакции. Поэтому в данной работе использовали наночастицы размером 10 нм, тем самым чувствительность данного метода удалось повысить, предел обнаружения ПГ в молоке составил 4,9 нг/мл.

В работе [184] разработан биосенсор, основанный на явлении флуоресценции полного внутреннего отражения. Он состоит из лазерного диода, оптического волокна, абсорбционных фильтров и фотодиодов. Лазерный пучок фокусируется на предметном стекле и проходит вдоль чувствительной зоны оптического датчика через полное внутреннее отражение. Флуоресценция, вызываемая мгновенными полями отраженных пятен, затухает рядом с поверхностью чипа. Испускаемый свет собирается благодаря полимерному оптическому волокну и детектируется при помощи фотодиодов. Измерительный цикл включает в себя промывание системы биосенсора, и параллельно образец молока, разбавленный в 10 раз, автоматически инкубируется с раствором антител. Для получения оптимального сигнала в данном методе требуются высокоаффинные антитела. Иммобилизованный слой аминодекстрана используют для предотвращения неспецифического связывания. На поверхности сенсора ковалентно иммобилизовано производное ПГ. Далее комплекс ПГ-антитело медленно наносится на поверхность сенсора, чтобы позволить антителам связаться с поверхностью сенсора. С помощью буферного раствора сенсор промывают и измеряют сигнал флуоресценции. Данный метод позволяет определять ПГ в цельном молоке, без специальной пробоподготовки. Один измерительный цикл длится всего 12 мин. Предел обнаружения такого биосенсора составляет 1 нг/мл [185].

1.3.2.5. Быстрые методы определения ПГ

В настоящее время в различных областях широкое распространение получили так называемые быстрые тесты, в большинстве своем основанные на принципе ЛПИА. Данный метод основан на движении раствора исследуемого образца по порам мембраны вдоль ее поверхности, которое сопровождается образованием на разных участках мембраны специфических иммунокомплексов, визуализированных как окрашенные полосы. В случае определения ПГ используется конкурентная схема анализа, при которой происходит конкурентное взаимодействие меченого и немеченого ПГ с центрами связывания антител. При этом интенсивность окрашенной полосы в тестовой зоне обратно пропорциональна концентрации ПГ.

Определять концентрацию ПГ в коровьем молоке нужно довольно быстро и непосредственно на ферме или в хозяйствах. При этом, чтобы диагностировать стельность коров достаточно полуколичественного анализа. В данном случае важно знать выше или ниже заданного значения лежит концентрация ПГ. Поэтому для данных целей очень важна разработка быстрых тестов, которые можно было бы использовать в условиях лабораторных условий. В литературе представлено только несколько работ по определению ПГ методом ЛПИА. Причем только в одной из них удалось получить результаты при определении ПГ в молоке.

В работе [186] разработан метод ЛПИА для определения ПГ в молоке. Метод основан на конкурентной схеме анализа с использованием моноклональных антител, специфичных к ПГ и конъюгата прогестерон-овальбумин (ПГ-ОВА), меченого золотыми наночастицами. Моноклональные антитела к ПГ иммобилизованы в виде узкой тестовой полосы на пористой мембране. После нанесения раствора антител, мембрану высушивают при комнатной температуре и обрабатывают раствором, содержащим 3% БСА, 5% сахарозы и 0,1% азида натрия. При проведении анализа смесь образца с конъюгатом ПГ-ОВА, меченого золотыми наночастицами наносят на тест-полоску. Количество меченого конъюгата, которое связалось в тестовой зоне, детектируют с помощью фотометрического сканирования. В работе были использованы моноклональные антитела, очищенные с помощью аффинной хроматографии с использованием белка А, и золотые частицы размером 40 нм. Предел обнаружения для данного метода определения ПГ в молоке составил 5 нг/мл.

В работе [187] описан метод определения ПГ с использованием метки на основе коллоидного углерода. В тестовой зоне был иммобилизован конъюгат ПГ-ОВА. В лунку планшета вносили смесь раствора образца, первичных и вторичных антител, меченных углеродными наночастицами. Тест-полоску погружали в лунку, содержащую полученную смесь. После того, как раствор впитался, полоску высушивали при комнатной температуре. Величина IC_{50} для данного метода составила 0,6 мкг/мл в буферной системе.

За последний год в мире появилось несколько коммерчески доступных быстрых тестов для определения ПГ в коровьем молоке. Система eProCheck (Германия) – первый прибор в мире, способный автоматически количественно анализировать уровень ПГ в молоке или в сыворотке крови [188] (Рис.10). Тестирование может проводиться непосредственно в хозяйстве ветеринарным врачом. Он основан на проведении метода ИФА в кинетическом режиме. Набор рассчитан на 86 анализов. Одновременно можно тестировать от 1 до 7 проб. Уровень концентрации гормона оценивается по изменению окраски фермент-субстратной реакции. Это изменение окраски автоматически проверяется в системе eProCheck при помощи датчика. Далее после оценки проб результаты отражаются на специальном дисплее. Одновременно можно провести анализ 7 образцов молока. Время проведения такого анализа составляет 20 мин.



Рис. 10. Система eProCheck для определения ПГ в коровьем молоке.

Фирмой CambridgeVeterinarySciences разработан набор реагентов OvucheckCowside™ (Великобритания), предназначенный для определения уровня ПГ в коровьем молоке непосредственно в молочных хозяйствах. В этом наборе используются микротитровальные лунки с предварительно адсорбированными моноклональными антителами к ПГ. Анализ выполняется менее чем за 45 мин. Для проведения анализа необходимо добавить определенное количество анализируемого образца или стандарта в соответствующее число используемых лунок. Затем в лунки добавляют конъюгат ПГ с щелочной фосфатазой, инкубируют при комнатной температуре 15 мин и добавляют

раствор субстрата. Данный набор позволяет визуально различить концентрации ПГ от 2 до 10 мг/мл.

Также существует быстрый тест на основе ИФА фирмы UbioQuickVet, производимый в Индии. Данный тест также основан на методе ИФА, проводимом в кинетическом режиме. Он позволяет проводить качественный анализ на ПГ, как в молоке, так и в сыворотке крови. Тест представляет собой кассету, в которой имеется две лунки для контрольного и исследуемого образца (Рис.11). При проведении анализа в соответствующие лунки добавляют растворы образца и контроля. Инкубируют в течение 20 минут и добавляют субстратный раствор. Через 10-15 минут считывают результат. Время проведения анализа составляет 30 мин.



Рис. 11. Быстрый тест на основе ИФА (Индия) для определения ПГ.

Быстрый тест Bovipreg (Канада) представляет собой метод ЛПИА с коллоидным золотом в качестве метки для определения ПГ в молоке. В основе метода лежит конкурентная схема анализа. В данном случае интенсивность окраски тестовой полосы обратно пропорциональна содержанию ПГ в молоке. Для проведения анализа необходимо нанести 2-3 капли образца на тест-полоску, или погрузить тест-полоску в образец. Результат считывают через 5-10 мин. В Великобритании также разработан ЛПИА ПГ фирмой Ridgeway Science, в котором оценка интенсивности тестовой линии проводится путем сравнения с интенсивностью контрольной линии. В работе [189] было показано, что точность определения стельности по сравнению с ИФА методом составляет 95% для молочных образцов с содержанием ПГ < 2 нг/мл, и 97% для образцов с содержанием ПГ > 10 нг/мл. Однако отечественных аналогов подобных тестов пока не существует. Поэтому необходимой задачей является разработка отечественных быстрых тестов для определения ПГ в коровьем молоке.

Согласно анализу литературных данных, метод ИФА на данный момент является одним из наиболее предпочтительных для количественной оценки ПГ в пробе, ввиду высокой чувствительности определения ПГ в широком диапазоне концентраций и возможности проведения анализа множества образцов, в отличие от остальных

рассмотренных методов. Так метод РИА позволяет измерять довольно низкие концентрации ПГ порядка 10^{-2} нг/мл, но его применение ограничено использованием короткоживущих радиоактивных меток. Биосенсоры ограничены в применении из-за небольшого количества одновременно проводимых анализов. Также для метода ИФА дорогое оборудование не всегда необходимо, так как результат может быть оценен с помощью визуальной детекции. Но все же для полуколичественного определения ПГ наиболее оптимальными являются быстрые методы анализа на основе метода ЛПИИА. Однако в настоящее время в мире разработаны лишь несколько коммерческих быстрых тестов для определения ПГ, при этом отечественных аналогов еще не существует.

В этой связи основной практической задачей, решаемой в данной работе, является разработка простых и высокочувствительных экспресс-методов иммунохимического анализа ПГ в молоке коров, которые могут быть использованы непосредственно в молочных хозяйствах для ранней диагностики стельности коров. В качестве возможных путей решения проблемы предложено использовать две системы, основанные на принципах ЛПИИА и ИФиА.

Для достижения поставленной конечной цели требовалось решить следующие задачи:

- разработать эффективные схемы и форматы проведения экспресс-определения ПГ в молоке коров на основе принципов ЛПИИА и ИФиА;
- получить и охарактеризовать иммунохимические реагенты разрабатываемых аналитических тест-систем, содержащих различные возможные виды меток;
- изучить закономерности протекания иммунохимических реакций в проточном режиме в пористых мембранах различной структуры, являющихся компонентами аналитических устройств;
- разработать методики проведения ЛПИИА и ИФиА и отработать способы количественной регистрации результатов определения ПГ;
- оптимизировать условия проведения разработанных схем экспресс-иммуноанализа ПГ в водных растворах и молоке для достижения необходимых для анализа диапазонов определения концентраций и времени анализа;
- апробировать разработанные тест-системы на образцах цельного молока реальных молочных хозяйств с целью раннего выявления стельности коров;
- провести сравнительную оценку результатов разработанных экспресс-тестов, с результатами, полученными с использованием стандартных наборов реагентов для количественного ИФА ПГ в молоке.

ГЛАВА II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Материалы и методы исследования

2.1.1. Химические реагенты, материалы и биологические препараты

В работе были использованы следующие реагенты:

- Цитрат натрия, БСА, белок А, натриевая соль казеина, натриевая соль биотин-3-сульфо-N-гидроксисукцинимидного эфира, дициклогексилкарбодиимид, N – гидроксисукцинимид, декстрансульфат, мол.вес 8000, 3-О-карбоксиметилоксим ПГ (3-О-КМО-ПГ) («Sigma», США);
- карбонат, одно- и двузамещенные фосфаты калия, сахароза («Helicon», Россия);
- золотохлористоводородная кислота («Fluka», Швейцария);
- твин 20, тритон X100 («MP Biomedicals», Франция);
- овальбумин («Реахим», Россия);
- стрептавидин («Имтек», Россия);
- субстратный раствор, содержащий 3, 3',5, 5'-тетраметилбензидин (ТМБ) и H₂O₂, готовый к использованию («Иммунотех», Россия);
- серная кислота, этанол абсолютный, метанол, все «осч» («Химмед», Россия);
- диметилформаид «хч» («Лабтех», Россия)
- пероксидаза хрена («Яринвест», Россия).

При иммобилизации антител против ПГ в аналитической зоне мембран использовали кроличью поликлональную антисыворотку, полученную против конъюгата гемисукцината 11 α -гидроксиПГ с гемоцианином [190].

Образцы цельного молока были предоставлены ГП «Ермолино» и АПК «Никулино».

В работе использовали следующие буферные растворы:

- 0,01 М К-фосфатный, рН=7,0 (ФБ);
- 0,01 М К-фосфатный, 0,15 М NaCl, рН=7,4 (ФБС);
- 0,01 М К-фосфатный, 0,15 М NaCl, 0,05% твин 20, рН=7,4 (ФБСТ);
- 0,01 М Na-карбонатный, рН=9,5 (КБ);
- 0,01 М боратный, рН=8,6 (ББ)

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

Стандартные растворы ПГ для анализа готовили последовательным разбавлением из исходного раствора ПГ (1 мг/мл в этаноле).

В работе использовали полистироловые 96-луночные планшеты фирмы «Nunc MaxiSorb» (Дания).

Для изготовления мультимембранных тест-полосок были использованы следующие материалы:

- аналитические нитроцеллюлозные мембраны фирмы MDI (Индия) – CNPC (размер пор 15 мкм), CNPF (размер пор 5, 8, 10 мкм), CNPH;
- аналитические иммунофльтрационные мембраны фирмы MDI (Индия): CLW-040-SH34 (размер пор 0,45 мкм), CLW-040-SH34 (размер пор 0,80 мкм), CNJ-X1 (размер пор 0,45 мкм);
- мембраны для нанесения конъюгата - PT-5 (MDI, Индия));
- мембраны для нанесения образца - MAPDS-0300 (Arista Biologicals, США);
- впитывающие мембраны - AP045, AP080 (MDI, Индия).

2.1.2. Оборудование

Измерения оптической плотности продукта ферментативной реакции проводили на многоканальном спектрофотометре для 96 – луночных планшетов (“Anthos 2010”, Австрия). Измерения оптической плотности проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-1202 («Shimadzu», Япония). Гель-фильтрацию проводили на колонке PD-10 (GE Healthcare, Великобритания).

Нанесение антител на мембрану производили при помощи автоматического диспенсера бесконтактного типа BioDot XYZ 3050 (BioJet Quanti 3000, BioDot, США).

Резак гильотинового типа Index Cutter-I, (A-Point Technologies, США) использовали для резки тест-полосок (шириной 4 мм).

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

Количественное определение интенсивности окраски аналитической и контрольных зон тест-полоски проводили при помощи сканера Epson Perfection V700 Photo (Seiko-Epson, Япония) с разрешением 600 точек на дюйм в 24-битном цвете (RGB). Анализ полученных цифровых изображений (в формате.tif) проводили с использованием программы Scion Image (http://www.scioncorp.com/pages/scion_image_windows.htm).

Размер частиц золота определяли на кафедре криоэлектроники Физического факультета МГУ на сканирующем электронном микроскопе фирмы Carl Zeiss, Германия.

2.1.3. Методы исследования

Выделение иммуноглобулиновой фракции антисыворотки

Иммуноглобулиновую фракцию антисыворотки выделяли двойным осаждением сухим безводным сульфатом аммония. К 1 мл антисыворотки добавляли 0,18 г сухого безводного сульфата аммония. Инкубировали при перемешивании в течение 30 минут. Полученный препарат центрифугировали и удаляли надосадочную жидкость. Далее осадок растворяли в 1 мл ФБС и снова повторяли процедуру осаждения сульфатом аммония. Избыток сульфата аммония удаляли с помощью гель-фильтрации. Концентрацию антител определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм, используя коэффициент молярного поглощения $\varepsilon = 1.35 \text{ г}^{-1} * \text{л} * \text{см}^{-1}$. Концентрация антител составила 1,9 мг/мл. Полученные растворы антител хранили в аликвотах по 10 мкл при -20°C .

Получение конъюгата 3-О-КМО-ПГ с овалбумином (ОВА)

Схема синтеза приведена на Рис.12.

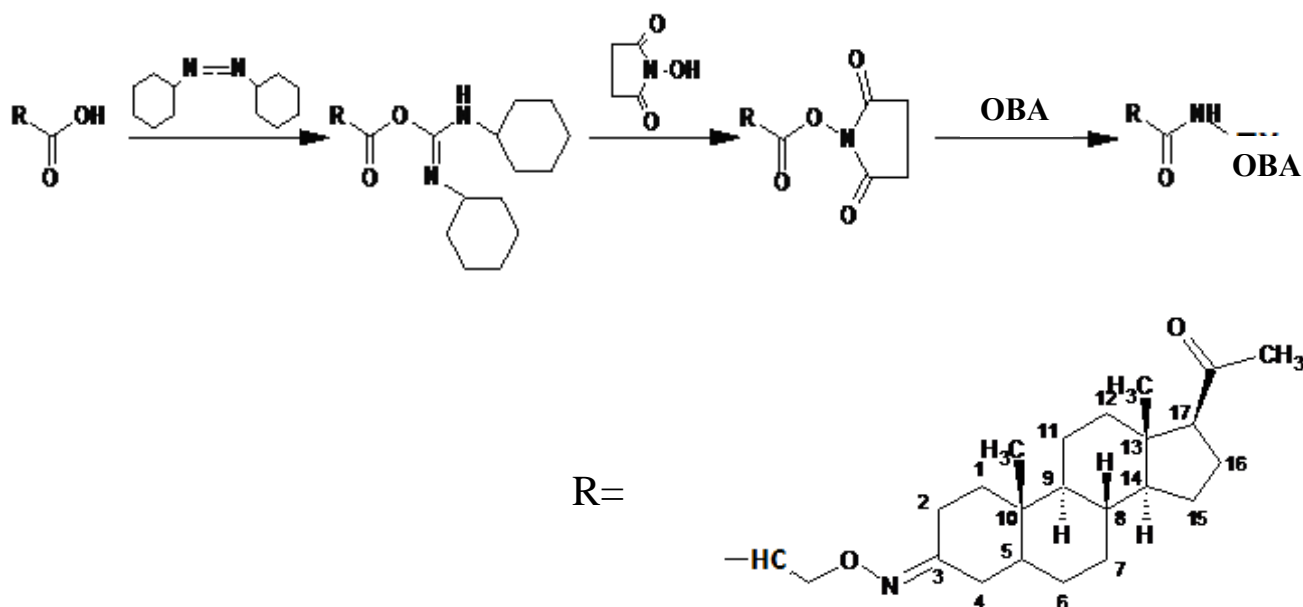


Рис. 12. Схема синтеза конъюгата 3-О-КМО-ПГ с овалбумином (ОВА).

2,91 мг (7,5 мкмоль) 3-О-КМО-ПГ растворили в 500 мкл ДМФА. К полученному раствору при перемешивании добавили 1,73 мг (15 мкмоль) N-гидроксисукцинимид и

3,09 мг (15 мкмоль) дициклогексилкарбодиимида. Реакционную смесь инкубировали 4 часа при перемешивании при комнатной температуре. Затем выдерживали ночь при +4°C. На следующий день раствор, содержащий 3-О-КМО-ПГ центрифугировали, и 170 мкл супернатанта добавили по каплям к 20 мг (0,5 мкмоль) ОВА в 1,5 мл ББ при перемешивании. Реакционную смесь перемешивали в течении 2 часов при комнатной температуре. Затем выдерживали ночь при +4°C. Далее полученный раствор снова центрифугировали, и супернатант очищали методом диализа. Концентрация полученного конъюгата составила 10 мг/мл.

Получение наночастиц коллоидного золота

Растворы коллоидного золота с заданным размером частиц получали по методу Френса [35]. К 99 мл бидистиллированной воды добавили 1 мл 1%-ного раствора золотохлористоводородной кислоты. Раствор при перемешивании нагревали до кипения, после чего быстро добавляли 2 мл 1%-ного водного раствора цитрата натрия. Раствор кипятили с обратным холодильником 15 минут при перемешивании, затем охлаждали до комнатной температуры в темном месте. Измеряли спектр поглощения раствора в диапазоне длин волн 400-700 нм.

Выбор оптимального рН и концентрации конъюгата ПГ-ОВА для получения препаратов, меченных коллоидным золотом

Для выбора оптимальных значений рН и концентрации конъюгата ПГ-ОВА для получения стабильных препаратов ПГ-ОВА, меченных наночастицами золота, проводили титрование. Для этого готовили серию растворов коллоидного золота с различными значениями рН от 5,5 до 9,0 с шагом 0,5 и 5 растворов конъюгата ПГ-ОВА в ФБ последовательным разведением в два раза с концентрацией от 800 мкг/мл до 50 мкг/мл. В лунки полистиролового планшета в горизонтальном направлении вносили раствор конъюгата ПГ-ОВА (10 мкл/лунка). Затем в вертикальном направлении в лунки внесли по 100 мкл раствора коллоидного золота с различным рН. После инкубации в течение 15 минут в каждую лунку добавляли по 20 мкл 10% раствора хлорида натрия. Для определения количественного эффекта стабилизации вычисляли разность оптического поглощения раствора на 520 нм и 580 нм ($A_{520}-A_{580}$). По графику зависимости разности оптических поглощений от концентрации конъюгата ПГ-ОВА определяли значения рН и минимальные концентрации конъюгата ПГ-ОВА,

необходимые для получения стабильных и функционально-активных препаратов ПГ-ОВА, меченных наночастицами золота.

Получение ПГ-ОВА, меченного золотыми наночастицами

К 10 мл раствора коллоидного золота с pH=5,5 добавляли 1 мл раствора конъюгата ПГ-ОВА с концентрацией 50 мг/мл и перемешивали в течение 15 минут. Для удаления несвязавшегося конъюгата ПГ-ОВА раствор центрифугировали 20 минут при 11000g и температуре +4°C. Супернатант удаляли, осадок растворяли в 1 мл ФБ, содержащего 0,1% БСА, 10% сахарозы и 0,01% азид натрия. Полученный раствор конъюгата наносили на образцы стекловолоконной мембраны 4x4 мм и высушивали при комнатной температуре в течение ночи.

Получение конъюгата 3-О-КМО-ПГ с ПХ

Схема синтеза приведена на Рис.13.

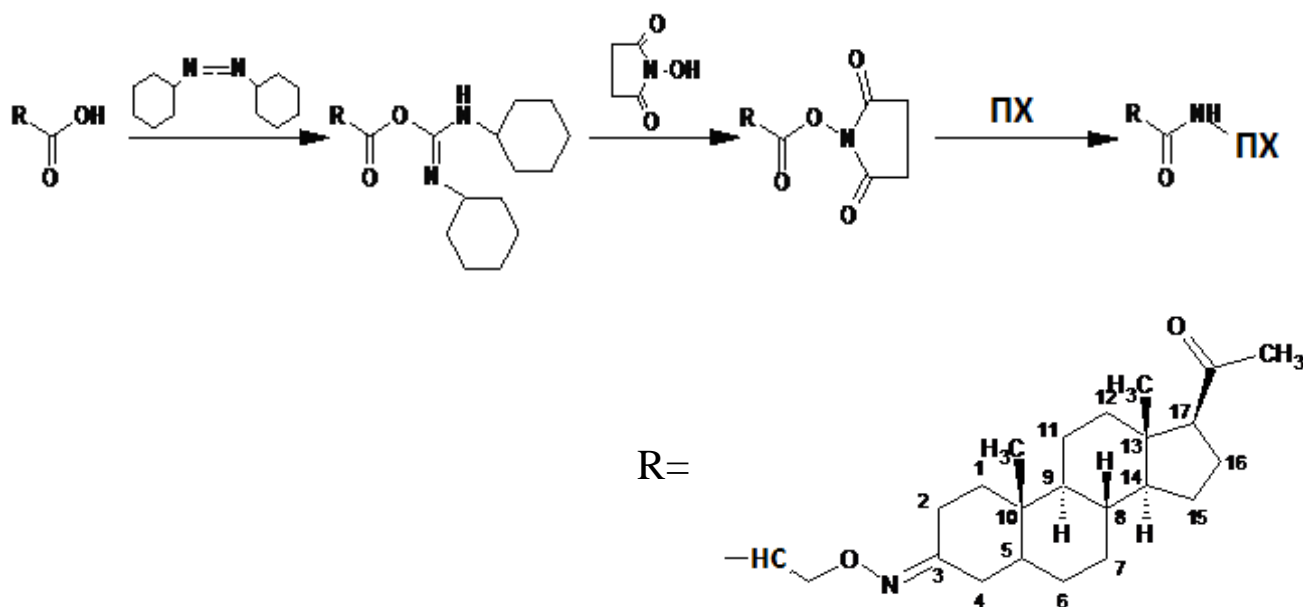


Рис. 13. Схема получения конъюгата 3-О-КМО-ПГ с ПХ.

2,6 мг (6,7 мкмоль) 3-О-КМО-ПГ растворили в 300 мкл ДМФА. К полученному раствору при перемешивании добавили 2,68 мг (13 мкмоль) дициклогексилкарбодиимида и 0,93 мг (0,008 ммоль) N-гидроксисукцинимид. Реакционную смесь инкубировали 2 часа при перемешивании при комнатной температуре. Затем выдерживали ночь при +4°C. На следующий день раствор, содержащий 3-О-КМО-ПГ, центрифугировали, и 100 мкл супернатанта добавили к 2 мг ПХ в 200 мкл ББ при перемешивании. Реакционную смесь перемешивали в течении 2 часов. Далее полученный раствор снова центрифугировали, и супернатант очищали

методом гель-фильтрации. Оптическую плотность полученного конъюгата измеряли при 403 нм. Концентрация конъюгата по ПХ составила 1,3 мг/мл.

Компоновка тест-полоски

С помощью программируемого автоматического диспенсера на аналитическую нитроцеллюлозную мембрану наносили растворы специфических реагентов. Для ЛПИИА с коллоидным золотом в качестве метки наносили антитела в концентрации 0,2 мг/мл или белок А в концентрации 0,1 мг/мл. Для ЛПИИА с ферментной меткой антитела наносили в концентрации 0,015 мг/мл. Растворы специфических реагентов наносили в буфере ФБС. Для формирования контрольной зоны на расстоянии 5 мм от аналитической зоны наносили раствор иммуноглобулиновой фракции антител, полученных против ПХ, в концентрации 0,025 мг/мл. Использовали следующие параметры насоса для нанесения образцов: размер капли - 30 нл, шаг - 0,3 мм, скорость - 50 мм/сек. Высушивание полосок проводили в течение 24 ч при +37°С.

Проведение ЛПИИА с коллоидным золотом в качестве метки

Собирали тест-полоски (75x4 мм) в соответствии со схемой на рис. 1. Готовые тест-полоски помещали на горизонтальную поверхность. Пропускание реагентов осуществляли двумя способами: 1 – в случае, когда в тестовой зоне сорбированы антитела, на мембрану для нанесения образца добавляли 120 мкл стандартного раствора ПГ; 2 - в случае, когда в виде тестовой полосы нанесен белок А, на мембрану для нанесения образца добавляли смесь 120 мкл стандартного раствора ПГ и 5 мкл раствора антител с концентрацией 0,01 мг/мл. Все растворы используемых реагентов готовили в ФБСТ. После того, как раствор полностью впитался, тест-полоски высушивали при комнатной температуре. Затем проводили сканирование результатов и анализировали полученные цифровые изображения с использованием программы Scion Image.

По полученным данным строили градуировочные графики в абсолютных значениях, где по оси ординат откладывали интенсивность тестовых линий полосок и в относительных значениях, где по оси ординат откладывали величину $V/V_0=(I/I_0)*100\%$, где I_0 – интенсивность тестовой полосы при концентрации ПГ 0 нг/мл, I – интенсивность тестовой полосы, а по оси абсцисс откладывали значения концентрации стандартного раствора ПГ.

Определение ферментативной активности препарата конъюгата ПГ-ПХ, высушенного на мембране

Пероксидазную активность полученного препарата проверяли следующим образом: мембрану с нанесенным конъюгатом ПГ-ПХ помещали в лунку со 100 мкл ФБ и инкубировали ее в течение 30 мин при перемешивании. Далее мембраны вынимали из лунок, добавляли 50 мкл ТМБ и инкубировали в течение 5 минут. Реакцию останавливали, добавляя 50 мкл 0,2 М серной кислоты, и измеряли оптическую плотность.

Проведение ЛПИФА

Собирали тест-полоски (75x4 мм) в соответствии со схемой на рис.1, не используя мембрану для конъюгата. Пропускание реагентов осуществляли горизонтально: на аналитическую мембрану наносили смесь 120 мкл стандартного раствора ПГ и 10 мкл конъюгата ПГ-ПХ. После того, как раствор впитался, помещали аналитическую мембрану в пробирку с 500 мкл раствора ТМБ, содержащего 10% декстрансульфата, и инкубировали 5 мин при перемешивании. После окрашивания тест-полоски высушивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем проводили сканирование результатов и анализировали полученные цифровые изображения с использованием программы Scion Image. Результаты интерпретировали аналогично методу ЛПИА.

Подготовка тест-кассеты для ИФиА

Готовили мембраны для ИФиА размером 2*2 см. На мембраны в зону тестового пятна одноканальным микродозатором наносили раствор специфических антител к ПГ в объеме 0,5 мкл с разведением 1/1500 в ФБС. Аналогичным образом наносили антитела к ПХ с разведением 1/1000 в зону контрольного пятна. Мембраны высушивали при 37°C в течение 30 минут. Далее мембраны инкубировали в растворе ФБС, содержащем 1% казеина в течение 30 мин при комнатной температуре при перемешивании. Обработанные мембраны высушивали в течение 45 минут при 37°C.

Проведение ИФиА

Собирали тест-кассету как показано на рис.5. На аналитическую мембрану наносили смесь реагентов: 100 мкл стандартного раствора ПГ и 10 мкл меченого конъюгата ПГ. После того как раствор впитался, добавляли 100 мкл промывочного буферного раствора ФБСТ. В случае использования ПХ в качестве метки, далее добавляли 400 мкл субстратного раствора ТМБ, содержащего 10% декстрансульфата.

Через 5 минут проводили как инструментальную, так и визуальную регистрацию сигнала путем сканирования тестовых пятен на мембранах и анализа полученных цифровых изображений с использованием программы Scion Image. Результаты интерпретировали аналогично методу ЛПИА.

Подготовка образцов молока к анализу

Образцы молока инкубировали при 37°C в течение 30 мин, далее интенсивно перемешивали и использовали в анализе.

Проведение ИФА

В лунках полистиролового планшета сорбировали антитела в КБ с выбранной концентрацией (150 мкл/лунка, инкубация ночью при +4°C), после инкубации лунки промывали раствором ФБСТ (3x150 мкл/лунка) и добавляли по 10 мкл стандартного раствора ПГ или образца и по 100 мкл раствора конъюгата ПГ-ПХ с выбранной концентрацией. После инкубации (37°C, 1 час), удаляли не связавшиеся реагенты промывкой раствором ФБСТ (3x150 мкл/лунка), а затем добавляли 100 мкл раствора ТМБ и инкубировали 15 мин при КТ. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл раствора 0,2 М серной кислоты. Результаты реакции оценивались на спектрофотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. По полученным данным строили градуировочные графики, где по оси ординат откладывали интенсивность окраски в единицах оптической плотности или величину $V/V_0=(I/I_0)*100\%$, а по оси абсцисс откладывали значения концентрации стандартного раствора ПГ.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Разработка ЛПИА для определения ПГ

Целью данной работы является разработка новых высокочувствительных методов иммунохимического экспресс-анализа низкомолекулярного гормона ПГ, и создание тест-систем для полуколичественного определения ПГ в цельном коровьем молоке в заданном диапазоне концентраций (<10 нг/мл) для раннего диагностирования стельности коров. Для выполнения поставленной задачи первоначально было предложено использовать принцип ЛПИА. В основе метода лежит совмещение принципов проточного твердофазного иммуноанализа и хроматографии на бумаге, в связи, с чем метод часто называют иммунохроматографическим. Устройство для проведения анализа представляет собой узкую тест-полоску шириной 4-6 мм и длиной около 7 см, состоящую из прочно фиксированных на пластиковой подложке нескольких примыкающих друг к другу пористых мембран, по которым вследствие капиллярных сил самопроизвольно движется поток жидкости, содержащей анализируемый образец (рис.1). Пористые мембранные носители содержат заранее иммобилизованные в них реакционные компоненты, позволяющие выявлять наличие в анализируемой смеси определяемого соединения по окрашиванию тестовой зоны аналитической области мембраны.

Последовательность расположения соприкасающихся между собой мембран включает мембрану для нанесения образца, мембрану для биоконъюгата наночастиц золота, аналитическую мембрану (как правило, на основе нитрата целлюлозы) и впитывающую мембрану, выполняющую для протекающей жидкости роль дополнительного отсасывающего микронасоса. Мембраны для образца и конъюгата представляют собой целлюлозные или стекловолоконные высокопористые материалы с минимальной сорбционной способностью по отношению к компонентам жидкости, способные быстро впитывать в себя анализируемый образец и перемещать его к аналитической мембране.

В качестве визуального детектирующего агента в ЛПИА, как правило, используют наночастицы золота. Благодаря малым (нанометровым) размерам золотых наночастиц, покрытых антителами, иммунохимическая реакция в порах мембраны протекает в псевдогомогенном растворе с высокими скоростями, в связи с чем весь

анализ занимает время 5-10 минут. Поэтому на первом работы предстояло решить следующие задачи: получить наночастицы золота и стабильные препараты наночастиц золота с ПГ, разработать и оптимизировать метод ЛПИА для определения ПГ с меткой коллоидного золота.

3.1.1. Получение наночастиц золота и ПГ-ОВА, меченного золотыми наночастицами

3.1.1.1. Получение и характеристика наночастиц золота

Для получения наночастиц золота был выбран метод Френса [35], который заключается в восстановлении золотохлористоводородной кислоты (ЗХВК) цитратом натрия. Данный метод позволяет получать гомогенные по составу наночастицы золота заданного диаметра (от 8 до 40 нм) в зависимости от количества добавляемого восстановителя. Кроме того, метод прост в исполнении и не требует каких-либо особых условий проведения реакции. При добавлении цитрата натрия к кипящему 0,01% раствору ЗХВК происходит изменение цвета раствора со светло-желтого на серый, затем фиолетовый, и, наконец, насыщенно-красный.

На Рис. 14 приведены спектры поглощения двух полученных препаратов. Исходя из положения максимумов полученных спектров (518 и 528 нм) в соответствии с данными работы [39] были определены средние значения диаметра полученных наночастиц золота - для первого образца он составил значение 16 нм, для второго 35 нм.

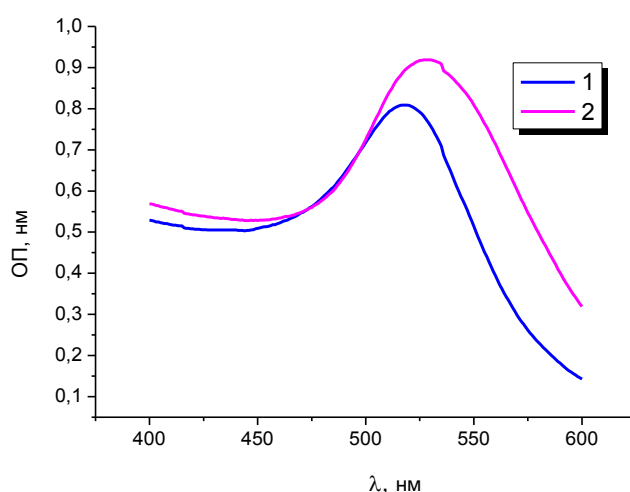


Рис. 14. Спектр поглощения раствора коллоидного золота для частиц размером 16 нм (1) и 35 нм (2).

Проведенное электронно-микроскопическое исследование подтверждает полученные данные по размерам синтезированных золотых наночастиц. На фотографии, полученной с помощью сканирующего электронного микроскопа, изображены полученные наночастицы золота со средним диаметром около 35 нм, имеющие сферическую форму и гомогенное распределение по размерам (Рис. 15). Коллоидный раствор наночастиц золота далее хранился при температуре +4°C в темном месте и оставался стабильным в течение как минимум трех месяцев.

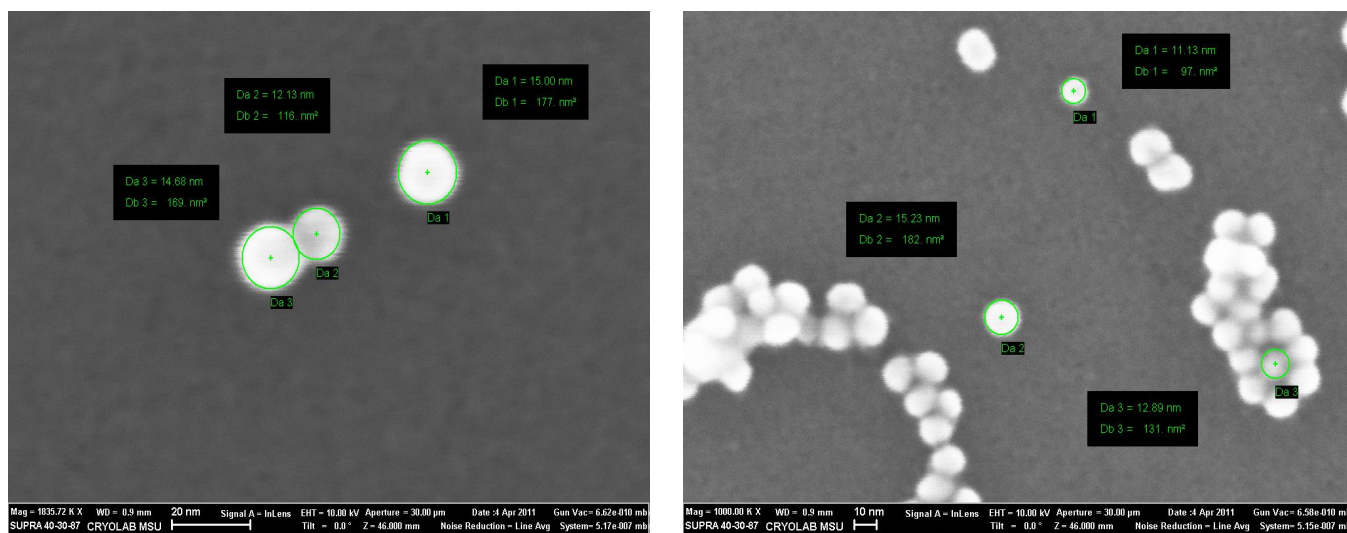


Рис. 15. Фотографии наночастиц золота, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа ($d=16$ нм).

3.1.1.2. Получение ПГ-ОВА, меченного наночастицами золота

При разработке проточного ЛПИА ПГ в качестве основной возможной схемы анализа использовали конкурентную схему, а в качестве меченного золотом реагента - ПГ. Так как ПГ низкомолекулярное вещество, то для сохранения возможности его взаимодействия с антителами золотыми наночастицами метили конъюгат ПГ с высокомолекулярным белком овальбумином (ОВА).

3.1.1.3. Выбор оптимального рН и концентрации конъюгата ПГ-ОВА

Для выбора оптимальных значений рН раствора золотых наночастиц и концентрации конъюгата ПГ-ОВА в процессе получения конъюгатов золотых наночастиц с ПГ-ОВА проводили титрование растворов конъюгата ПГ-ОВА растворами коллоидного золота с различными значениями рН. Для определения количественного эффекта стабилизации против агрегации к полученным конъюгатам ПГ-ОВА с

золотыми частицами добавляли 1%-ный раствор хлорида натрия. Высокая ионная сила раствора приводила к частичной коагуляции наночастиц золота, сопровождающейся появлением пика при длине волны 580 нм. Вычисляли разность оптического поглощения раствора на 520 нм и 580 нм ($A_{520}-A_{580}$), величина которой коррелировала со стабильностью наночастиц против агрегации частиц в растворе. Следует отметить, что изменение величины pH практически не влияет на стабилизацию конъюгата. При получении ПГ-ОВА, меченного наночастицами золота, происходит физическая адсорбция макромолекул белка на поверхности коллоидных частиц золота. Полярные группы макромолекул белка, хорошо гидратируются и образуют вокруг коллоидных частиц золота мощные гидратные оболочки, которые препятствуют коагуляции наночастиц (адсорбционно-сольватный фактор). Кроме того, только в присутствии белковых стабилизаторов золь золота может быть после нанесения на пористую подложку (например, из стекловолокна) и высушивания снова быстро и полностью переведен в коллоидный раствор. Последнее обстоятельство особенно важно в ЛПИА, где все используемые компоненты аналитической системы предварительно нанесены на различные участки мембранного поликомпозиата и высушены.

В изученном диапазоне нагрузки золя по конъюгату ПГ-ОВА в пределах 5-80 мг/мл золя минимальная насыщающая концентрация конъюгата ПГ-ОВА определяется выходом изотермы адсорбции на плато, и в данном случае она составила 50 мг/мл (Рис.16). Далее эту концентрацию конъюгата ПГ-ОВА использовали при получении ПГ-ОВА, меченного наночастицами золота.

Подобная зависимость была получена и для наночастиц золота с размером 35 нм. Поэтому и в том и в другом случае, оптимальным был выбран pH=5,5 и минимальная концентрация конъюгата ПГ-ОВА 50 мг/мл.

Для предотвращения коагуляции наночастиц золота в процессе нанесения и высушивания конъюгата на стекловолоконной мембране в раствор добавляли 0,1 % БСА и 10% сахарозы. По литературным данным стабилизирующий эффект сахарозы связан с дополнительной защитой гидратных оболочек вокруг наночастиц золота за счет удержания молекул воды [38].

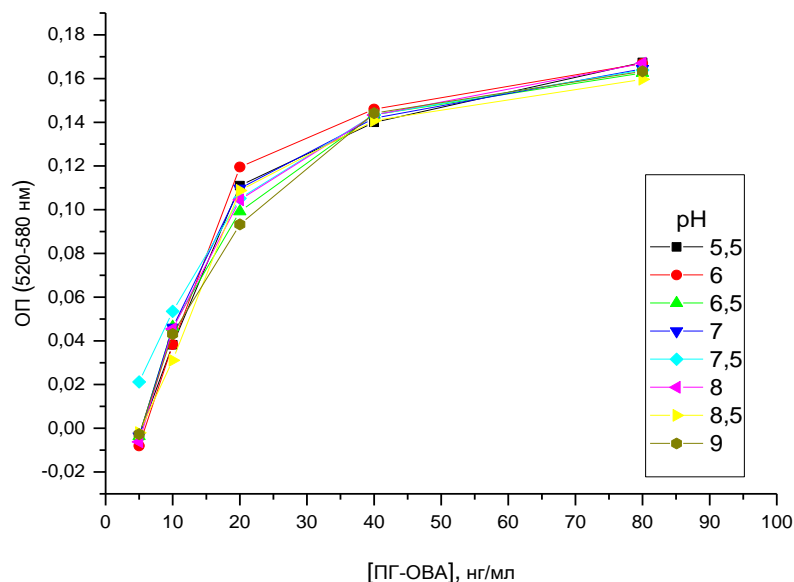


Рис. 16. Зависимости разности оптического поглощения от концентрации ПГ-ОВА для разных значений pH.

В результате проведенного эксперимента были подобраны оптимальные условия и были получены стабильные против агрегации препараты ПГ-ОВА, меченные наночастицами коллоидного золота.

3.1.2. Оптимизация условий проведения ЛПИИ с использованием наночастиц золота для определения ПГ

Для проведения ЛПИИ с коллоидным золотом использовали схему, когда в тестовой зоне сорбированы специфические антитела к ПГ (Рис.17). В тестовой и контрольных зонах аналитической мембраны иммобилизованы поликлональные антитела к ПГ и антитела к овалбумину (ОВА), а на мембране для конъюгата сорбирован комплекс золотых наночастиц с ПГ-ОВА. После нанесения анализируемого образца на начальный участок тест-полоски, в случае отсутствия ПГ в пробе происходит связывание конъюгата ПГ-ОВА, меченного золотыми наночастицами, со специфическими антителами в тестовой зоне, приводящее к ее окрашиванию. При наличии ПГ в пробе происходит конкурентное взаимодействие свободного ПГ и конъюгата ПГ-ОВА, меченного золотыми наночастицами, с центрами связывания специфических антител. В таком случае в тестовой зоне количество связанного с антителами меченного золотом ПГ-ОВА уменьшается, при этом интенсивность окраски или аналитического сигнала обратно пропорциональна концентрации ПГ в пробе.

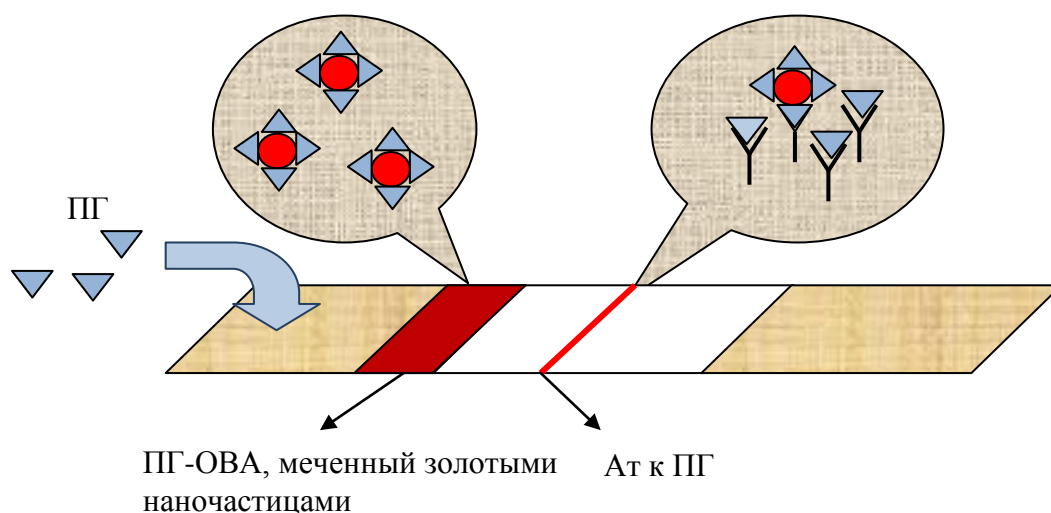


Рис. 17. Схема проведения ЛПИА с коллоидным золотом в качестве метки.

3.1.2.1. Выбор концентраций реагентов

Оптимизация конкурентного метода анализа заключается в выборе оптимального соотношения концентраций иммобилизованных антител и ПГ-ОВА, меченного золотыми наночастицами для обеспечения конкуренции между меченым и немеченым антигеном за связывание с активными центрами антител (Рис. 18).

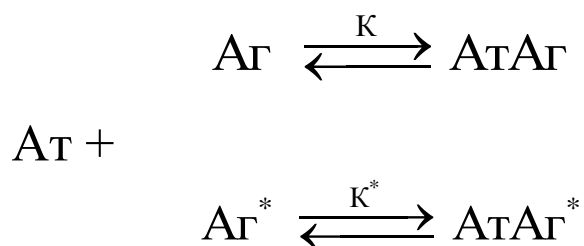


Рис. 18. Общая схема реакций в конкурентном анализе.

В соответствии с теоретическими предсказаниями при выборе оптимального соотношения концентраций реагентов следует принимать во внимание следующие моменты. Конкурентный анализ проводится в условиях фиксированных концентраций иммобилизованных антител и меченого антигена и изменяющейся концентрации свободного антигена. Концентрация меченого антигена при фиксированной концентрации иммобилизованных антител должна приблизительно соответствовать величине 20-50% связывания конъюгата с иммобилизованными антителами при условии равенства констант связывания активных центров антител с меченым и свободным антигенами. Для повышения чувствительности метода возможно уменьшение концентрации иммобилизованных антител, однако данное уменьшение ограничивается требованием к возможности осуществления детекции аналитического сигнала, который

регистрируется при выбранных концентрациях антител и меченого антигена. Его необходимо зарегистрировать достоверно, то есть с хорошей воспроизводимостью.

Для выбора оптимальных концентраций антител компоновали тест-полоски согласно рис.1, в тестовой зоне аналитической мембраны сорбировали антитела к ПГ в концентрациях 0,09; 0,19 и 0,38 мг/мл. Далее на мембрану для образца добавляли смесь буферного раствора и конъюгата ПГ-ОВА в объеме от 2,5 до 20 мкл на тест-полоску. Таким образом, были получены кривые титрования при различных концентрациях специфических компонентов. Из анализа полученных кривых следует, что при увеличении концентрации сорбированных антител и количества ПГ-ОВА, меченого коллоидным золотом (с 2,5 мкл до 10 мкл раствора на полоску) происходит увеличение интенсивности регистрируемого сигнала и наклона градуировочного графика на начальном отрезке (рис. 19). Однако в случае использования в анализе большого количества ПГ-ОВА, меченого коллоидным золотом, наблюдалось появление фонового сигнала, что сильно затрудняет визуальную оценку результатов анализа во внелабораторных условиях.

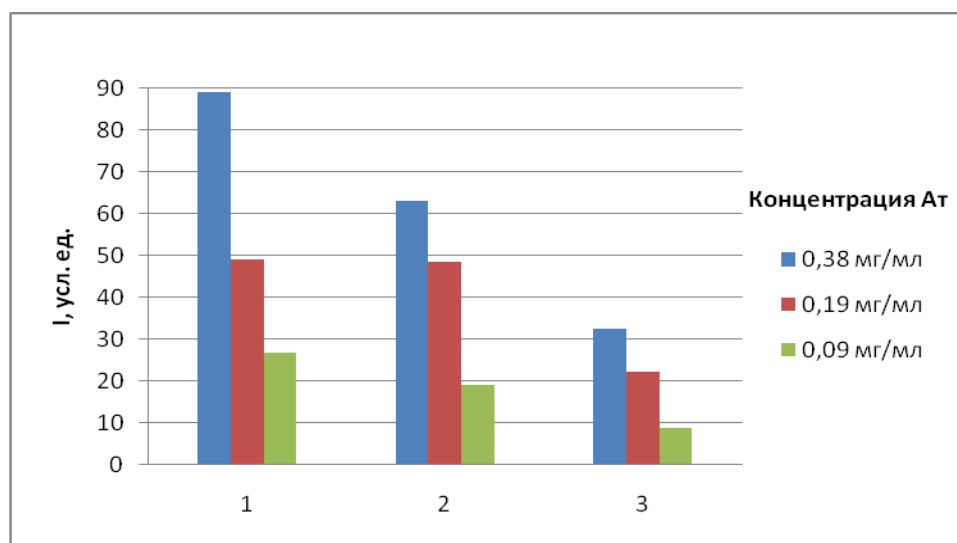


Рис. 19. Титрование антител. Объем ПГ-ОВА, меченого золотыми наночастицами: 1 - 10 мкл, 2 - 5 мкл, 3 - 2,5 мкл.

Аналогичные эксперименты были проведены для золотых наночастиц размером 16 нм. Таким образом, для дальнейшей разработки метода оптимальными были выбраны следующие условия получения тест-полосок: разведение рабочего раствора антител с концентрацией 1,9 мг/мл в 10 раз как для золотых наночастиц размером 16 нм, так и для

частиц размером 35 нм, и количество, наносимого рабочего раствора конъюгата для золотых частиц с размером 16 нм – 7 мкл, и для частиц размером 35 нм – 2,5 мкл.

В результате были получены калибровочные зависимости для золотых наночастиц размером 16 и 35 нм. На рис. 20 видно, что калибровочные зависимости для золотых наночастиц размером 35 и 16 нм практически идентичны. Однако при использовании в анализе наночастиц золота размером 35 нм требуется меньший объем ПГ-ОВА, меченного коллоидным золотом, и соответственно при этом снижается фоновый сигнал. Поэтому дальнейшая оптимизация метода анализа проводилась с использованием золотых наночастиц размера 35 нм.

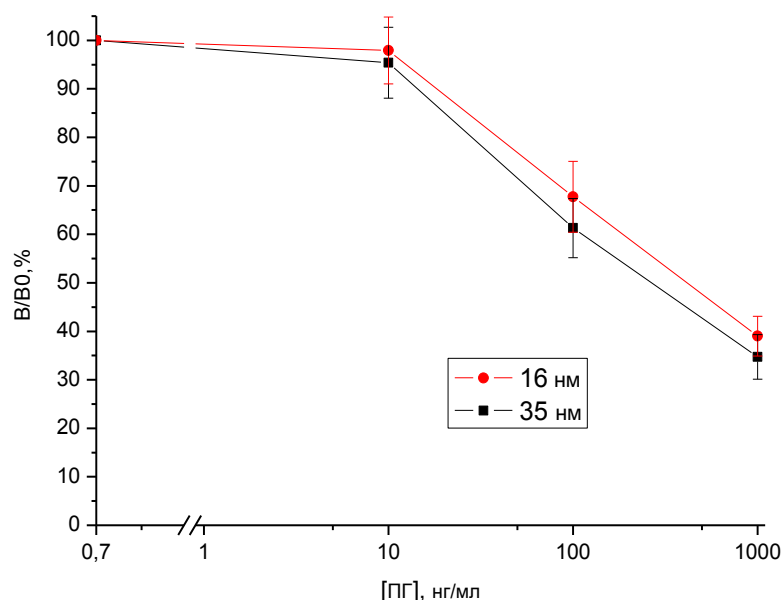


Рис. 20. Калибровочные зависимости ЛПИА ПГ, полученные для золотых наночастиц с размерами 16 нм и 35 нм.

Из полученной калибровочной зависимости видно, что диапазон определяемых концентраций при использовании золотых наночастиц в качестве метки не позволяет определять ПГ в концентрациях ниже 10 нг/мл.

3.1.2.2. Выбор схемы проведения анализа

На следующем этапе работы была рассмотрена модифицированная схема анализа, где в качестве тестовой линии нанесен белок А в концентрации 0,1 мг/мл (Рис.21).

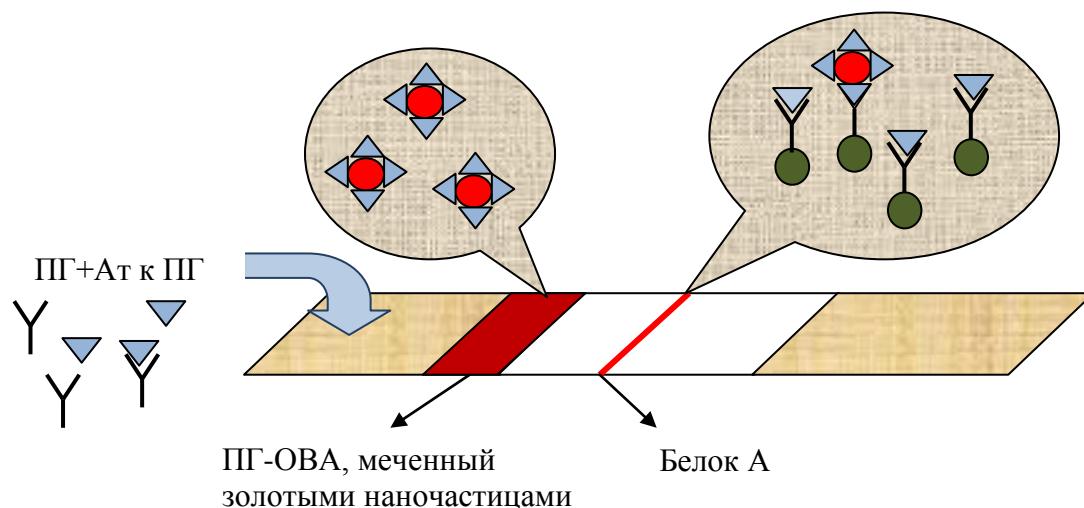


Рис. 21. Модифицированная схема проведения ЛПИА с белком А, иммобилизованным тестовой зоне, и коллоидным золотом в качестве метки.

Белок А широко применяется в биохимических исследованиях, так как хорошо связывает иммуноглобулины млекопитающих, особенно иммуноглобулины класса G. При этом белок А взаимодействует с тяжелыми участками цепи Fc-фрагмента молекулы IgG. Особенность данной схемы заключается в следующем.

Таблица 4. Схемы проведения ЛПИА с коллоидным золотом в качестве метки.

Схема анализа	Количество, используемых реагентов
	[Ат] = 0,2 мг/мл
	[Ат]=0,01 мг/мл [Белок А]=0,1 мг/мл
	○ - свободный ПГ в пробе ● - белок А

Все реагенты: меченый и немеченый ПГ, а также антитела, специфичные к ПГ пропускаются по тест-полоске одновременно, поэтому создаются условия истинной конкуренции между меченым и немеченым реагентами за центры связывания антител, которые присутствуют в растворе (Таблица 4). Далее антитела, содержащие золотые

наночастицы, количество которых обратно пропорционально концентрации свободного ПГ в пробе, связываются Fc-фрагментом с белком А, что обеспечивает их эффективное удерживание в зоне тестовой линии.

На Рис. 22 видно, что угол наклона калибровочной зависимости для сорбции белка А в аналитической зоне больше чем угол наклона кривой при прямой сорбции антител. Соответственно, при использовании белка А в качестве тестовой линии величина IC_{50} -концентрация ПГ, при которой ингибирование составляет 50%, составляет 100 нг/мл, а при прямой сорбции антител – 500 нг/мл. Такое различие объясняется тем, что при сорбции белка А в аналитической зоне и дальнейшее добавление раствора антител при проведении анализа приводит к более направленной посадке антител, в отличие от прямой сорбции антител, при которой антитела сорбируются хаотично. Но даже такая схема проведения анализа не позволяет сдвинуть калибровочную зависимость в область более низких концентраций ПГ, необходимую для дальнейшего практического использования тест-системы в ветеринарной диагностике.

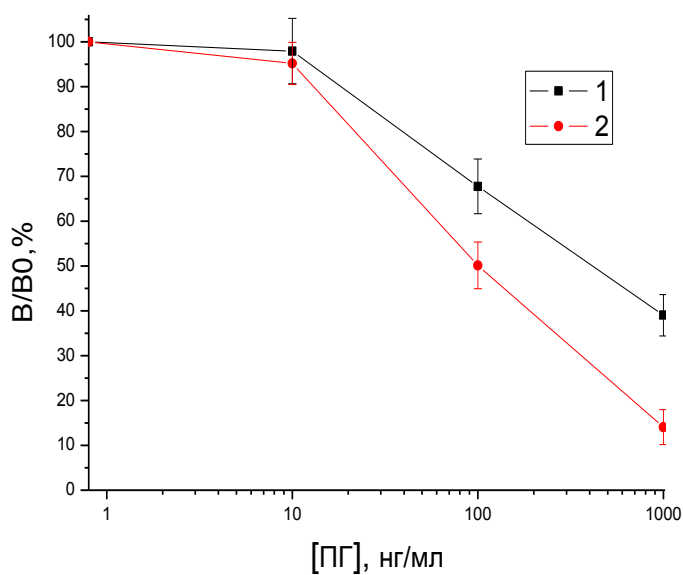


Рис. 22. Калибровочные зависимости ЛПИИ ПГ для сорбированных в аналитической зоне: 1- антител, специфичных к ПГ (0,2 мг/мл) и 2 - белка А (1 мг/мл).

В результате проведенных опытов было выяснено, что при использовании в качестве метки коллоидного золота чувствительности такого анализа недостаточно для определения ПГ в концентрациях ниже 10 нг/мл. Это объясняется тем, что в данной конкурентной схеме анализа используются довольно высокие концентрации антител

(0,2 мг/мл). Снижение концентрации антител, которое теоретически должно приводить к улучшению предела обнаружения, в данном случае невозможно, так как она ограничена необходимостью проведения визуальной оценки величины сигнала. Кроме того, этой же причиной обусловлена и невозможность использования меньших концентраций конъюгата золотых частиц с ПГ, также теоретически приводящая к уменьшению предела обнаружения в конкурентной схеме анализа. Поэтому для дальнейшей разработки быстрого теста для определения ПГ в нужном для практики более низком диапазоне концентраций было предложено использовать в латеральном иммуноанализе ферментную метку, детекцию которой можно проводить в гораздо меньших концентрациях по сравнению с золотыми наночастицами. Такой вид ЛПИА с использованием ферментной метки стали в дальнейшем называть латеральным проточным иммуноферментным анализом (ЛПИФА).

3.1.3. Оптимизация условий проведения ЛПИФА для определения ПГ

Для разработки метода ЛПИФА в качестве метки использовали фермент – пероксидазу хрена. Схема проведения анализа основана на конкурентном взаимодействии меченого ПГ и ПГ, содержащегося в пробе, с центрами связывания Ат, иммобилизованных в тестовой зоне (Рис.23). В контрольной зоне были иммобилизованы Ат к ПХ. В качестве меченого реагента использовали конъюгат ПГ с ПХ. Конъюгат синтезировали карбодиимидным методом реакцией 3-О-карбоксиметилксим ПГ с ПХ, который является одним из наиболее распространенных способов связывания гаптен, содержащих карбоксильную группу, с белками.

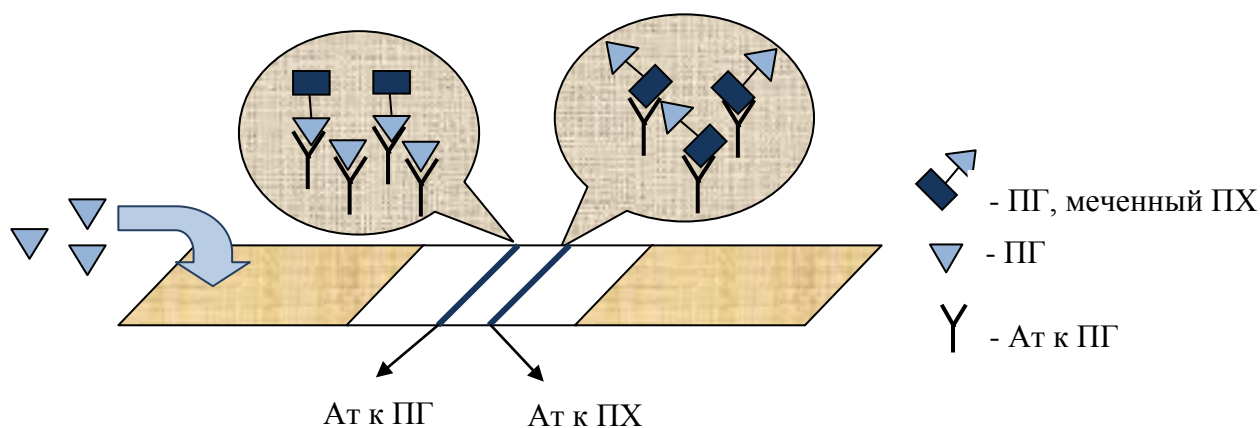


Рис. 23. Схема проведения ЛПИФА ПГ.

3.1.3.1. Изучение условий регистрации аналитического сигнала

В данной тест-системе окрашивание тестовой линии происходит в процессе протекания дополнительной стадии – реакции окисления пероксидом субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), катализируемого ПХ. Использование в субстратной смеси декстран сульфата значительно снижает растворимость продукта окисления ТМБ за счет его комплексообразования, что позволяет локализовать окрашенный продукт ферментативного окисления в тестовой линии [191]. Для сравнения был проведен эксперимент по окрашиванию фермента на мембране в отсутствии и присутствии декстрансульфата. В первом случае наблюдается довольно высокий фоновый сигнал, при этом окраска тестовой линии обладает низкой интенсивностью, и контуры линии размыты, что затрудняет визуальную детекцию результата. Во втором случае, наблюдается снижение фонового сигнала, тестовая линия более четкая и интенсивность сигнала заметно выше, чем в первом случае.

Первоначально была установлена пропорциональность между интенсивностью образующейся окраски тестовой линии и количеством фермента, локализованного в тестовой линии устройства (Рис.24). Эксперимент проводили по следующей схеме:

1. Наносили аликвоту раствора фермента с заданной концентрацией на мембрану;
2. Инкубировали мембраны в растворе субстрата в течение 5 мин;
3. Сканировали мембрану с тестовой зоной и измеряли интенсивность окраски с интервалом 5 мин в течение часа.

Было отмечено, что интенсивность окрашивания тестовой зоны в течение первых 20 минут измерения незначительно уменьшалась, что объясняется высыханием мембраны на воздухе, но затем, сигнал, полученный с высушенной мембраны, в течение часа практически не изменялся (Рис. 24).

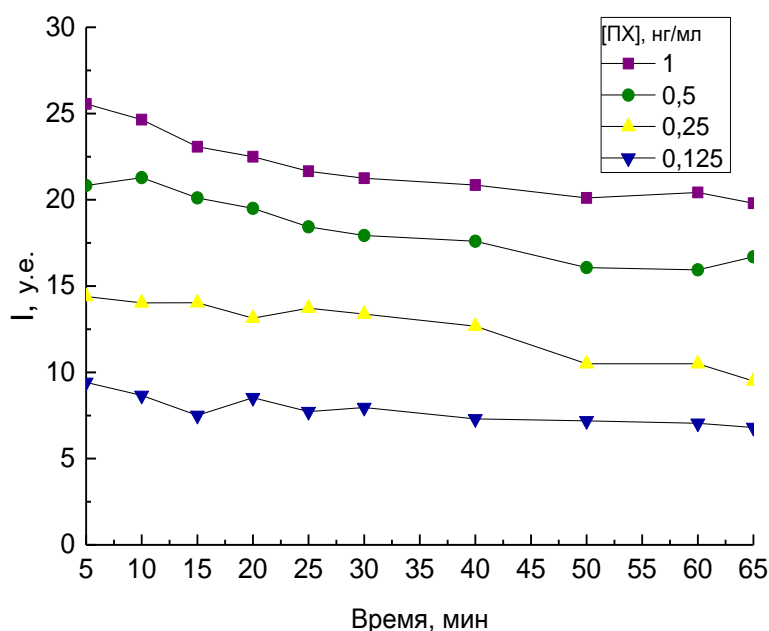


Рис. 24. Зависимость интенсивности аналитического сигнала от времени для разных концентраций ПХ.

Было показано, что измеряемый аналитический сигнал остается стабильным в течение часа после окрашивания тест-полоски при различных концентрациях ПХ (Рис.25). Таким образом, было установлено, что для количественной интерпретации результатов анализа можно измерять интенсивность окрашивания через 5 минут после добавления субстратного раствора и высыхания полоски.

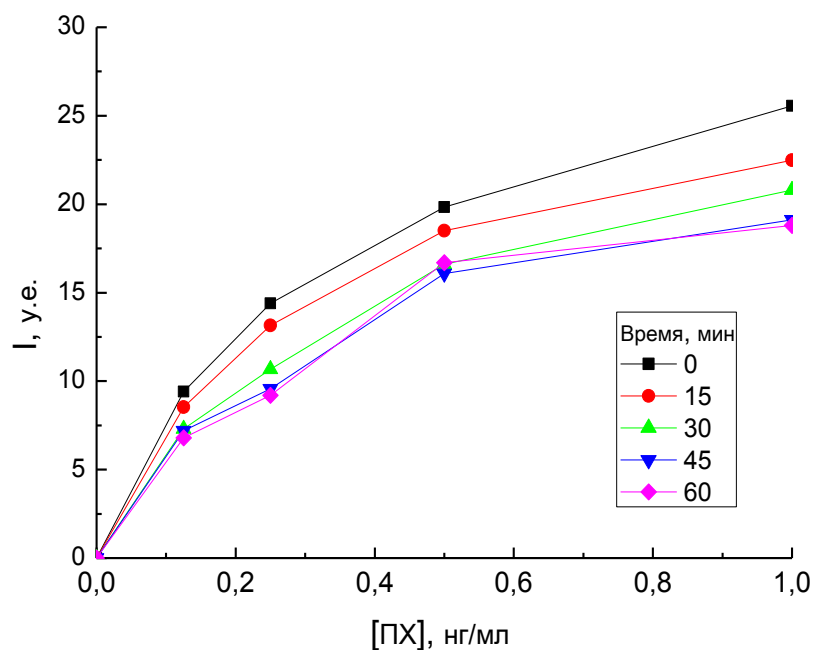


Рис. 25. Зависимость интенсивности аналитического сигнала от концентрации ПХ.

3.1.3.2. Варианты проведения анализа

Исходя из литературных данных, ЛПИА тест-полоску при проведении анализа, возможно, располагать как вертикально, помещая ее в лунку с образцом [186, 187], так и горизонтально, нанося образец на конец тест-полоски [54, 55, 192]. Поэтому было проведено сравнение вертикального и горизонтального способов проведения анализа. При вертикальном проведении анализа готовую полоску помещали в лунку полистиролового планшета с анализируемым раствором. В случае горизонтального проведения анализа буферный раствор наносили на мембрану для нанесения образца. Было выяснено, что для вертикального проведения анализа требуется на 10-15 минут больше времени по сравнению с горизонтальным проведением анализа. Поэтому для дальнейшей разработки ЛПИА был выбран горизонтальный вариант проведения анализа.

3.1.3.3. Выбор концентраций реагентов

На данном этапе работы были получены кривые титрования при различных концентрациях специфических реагентов (Рис. 26). При этом руководствовались теми же принципами, что и при выборе концентраций реагентов для ЛПИА с меткой на основе коллоидного золота. Обычно выбирают концентрации реагентов,

обеспечивающих максимальный сигнал ферментативной активности в пределах 20-30 усл.ед. Из анализа полученных кривых следует, что при увеличении концентрации конъюгата ПГ-ПХ происходит увеличение интенсивности регистрируемого сигнала и наклона кривой титрования на начальном отрезке. Однако в случае использования в анализе высокой концентрации меченого ПГ наблюдалось появление фонового сигнала, что говорит об избыточном количестве несвязавшегося конъюгата ПГ-ПХ. Таким образом, для дальнейших экспериментов в качестве оптимальных концентраций реагентов была выбрана концентрация антител 15,2 мкг/мл при разведении конъюгата в 30000 раз.

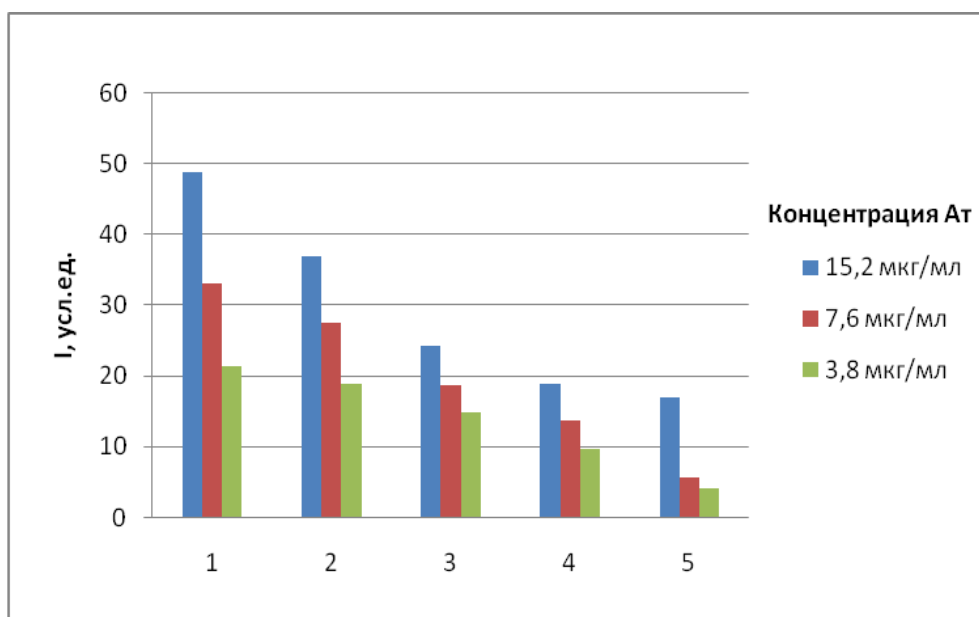
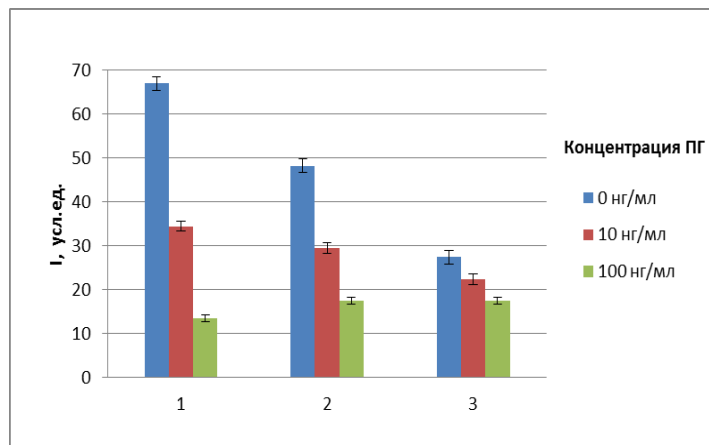
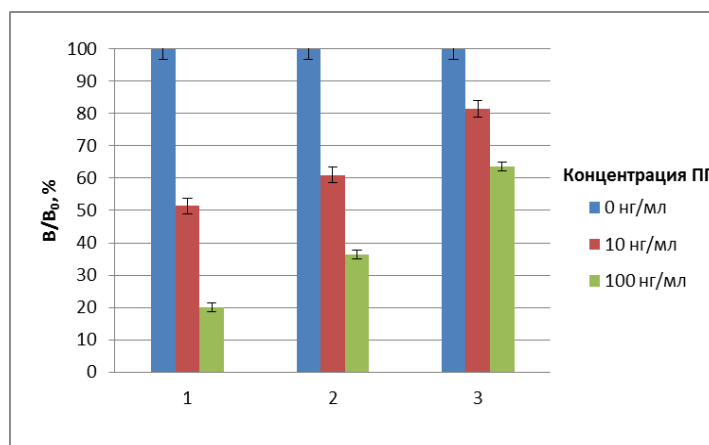


Рис. 26. Титрование антител при разведении конъюгата: 1 – 1/7500, 2 – 1/15000, 3 – 1/30000, 4 – 1/50000, 5 – 1/100000.

Для подбора оптимальных концентраций реагентов выбирали различные соотношения концентраций конъюгата и иммобилизованных антител: концентрацию конъюгата ПГ-ПХ, соответствующую 50% связывания, а также избыток и недостаток концентрации конъюгата ПГ-ПХ, попадающие в диапазон 30 – 80% связывания. Таким образом, были получены зависимости интенсивности тестовой линии от концентрации ПГ для выбранных концентраций иммунореагентов для каждого из трех случаев. Как видно из полученных данных (Рис.27), при уменьшении концентрации конъюгата наблюдается снижение абсолютного аналитического сигнала, что приводит к снижению чувствительности анализа.



(А)



(Б)

Рис. 27. Зависимость интенсивности окрашивания тестовой линии ЛПИФА ПГ от концентрации ПГ с ферментной меткой в абсолютных (А) и относительных (Б) единицах. Концентрация антител и разведение конъюгата ПГ с ПХ: 1 – Ат 15,2 мкг/мл, ПГ-ПХ 1/30000; 2 – Ат 7,6 мкг/мл, ПГ-ПХ 1/15000; 3 – Ат 3,8 мкг/мл, ПГ-ПХ 1/75.

3.1.3.4. Оптимизация условий нанесения конъюгата ПГ-ПХ на мембрану для конъюгата

Для упрощения процедуры проведения анализа, важно чтобы большинство компонентов тест-системы находилось в составе тест-полоски в иммобилизованном виде. На следующем этапе работы оптимизировали нанесение конъюгата ПГ-ПХ на мембрану для конъюгата. Конъюгат наносили на специальную мембрану в соответствующей концентрации и высушивали при комнатной температуре в течение ночи. Было показано, что такое высушивание конъюгата ПГ-ПХ в буферных растворах ФБСТ или ФБС на мембране, приводило к полной потере ферментативной активности конъюгата ПГ-ПХ. Поэтому были предприняты попытки стабилизировать конъюгат ПГ-ПХ, используя добавки различных компонентов к буферной системе. Как известно из литературных данных, для стабилизации белковых препаратов на мембранах

используют дисахариды, такие как сахароза и трегалоза [54]. Поэтому раствор конъюгата ПГ-ПХ в буфере ФБСТ, содержащем 10% сахарозы; 10% трегалозы; 10% сахарозы и 1% БСА, наносили на мембрану и высушивали при комнатной температуре. Далее проверяли активность полученного препарата. Однако, в результате высушивания конъюгата в данных условиях также наблюдалось заметное снижение интенсивности сигнала, как и случае высушивания конъюгата в буферном растворе без добавок.

В ходе дальнейшей работы был рассмотрен другой метод сушки - лиофилизация. Мембраны, с нанесенным конъюгатом ПГ-ПХ, лиофильно высушивали в растворах ФБ, ФБС и ФБСТ с содержанием сахарозы от 0 до 30%. В результате при проверке активности полученных препаратов аналитический сигнал на следующий день после лиофильного высушивания снижался примерно в 1,5 раза для всех буферных растворов. Как видно из Рис. 28, после лиофилизации при концентрациях сахарозы 5-20% наблюдается максимальная оптическая плотность. В качестве оптимальной была выбрана концентрация сахарозы 10%.

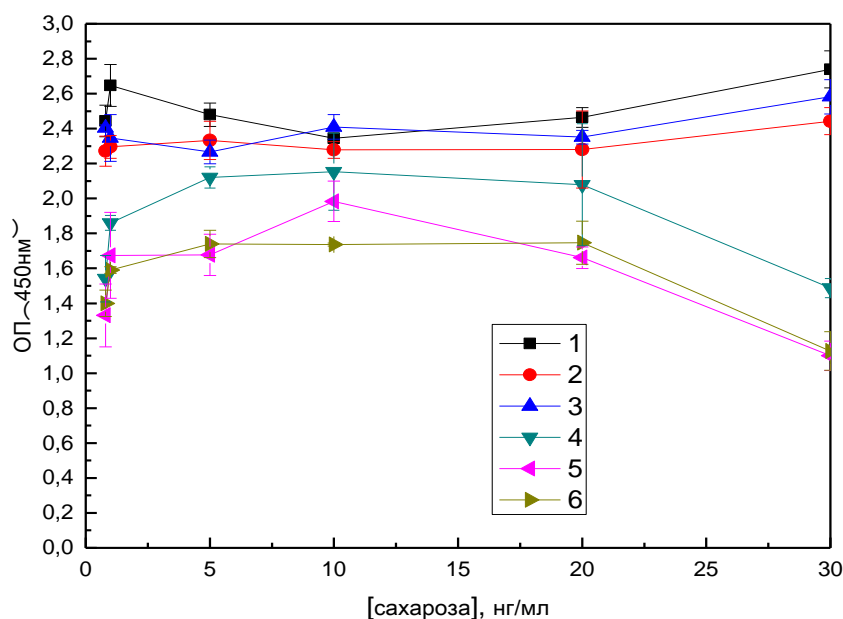


Рис. 28. Зависимость оптической плотности продукта ферментативной реакции от концентрации сахарозы для конъюгата ПГ-ПХ в буфере: 1 - ФБ, 2 - ФБС, 3 - ФБСТ до лиофилизации; 4 - ФБ, 5 - ФБС, 6 - ФБСТ после лиофилизации.

На следующем этапе работы лиофилизовали конъюгат ПГ-ПХ в растворе, содержащем 10% сахарозы и различные концентрации БСА от 0 до 1% в буфере ФБ и

ФБС. В результате полученных данных была подобрана оптимальная концентрация БСА – 1%, для которой наблюдался наибольший аналитический сигнал получаемого препарата.

Тем не менее, оказалось, что все полученные лиофильно высушенные препараты теряли ферментативную активность при хранении (Рис.29). Уже на 4-5 сутки после высушивания аналитический сигнал в готовой аналитической системе падал практически до нуля. Из всех рассмотренных подходов ни один из них не позволил получить стабильный препарат конъюгата ПГ-ПХ в высушенном виде, который может использоваться для изготовления тест-полосок. Поэтому при проведении анализа конъюгат ПГ-ПХ использовали в жидком виде.

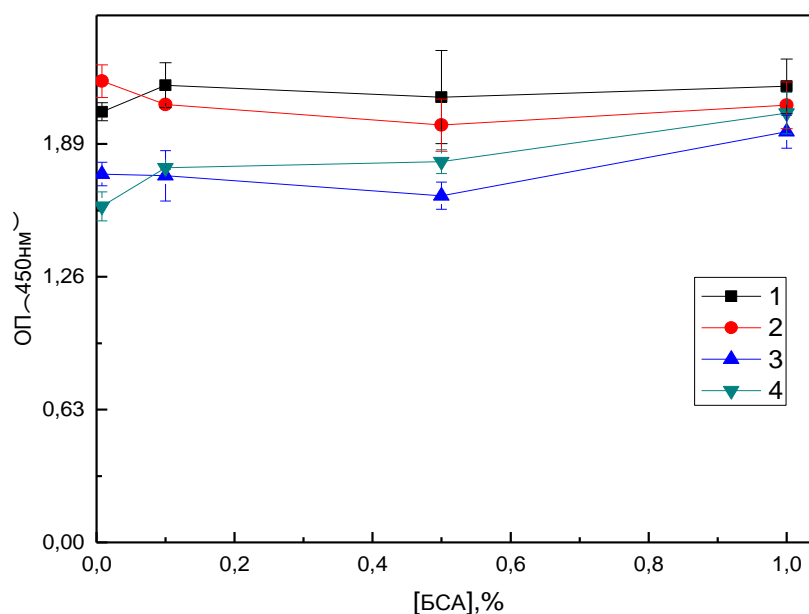


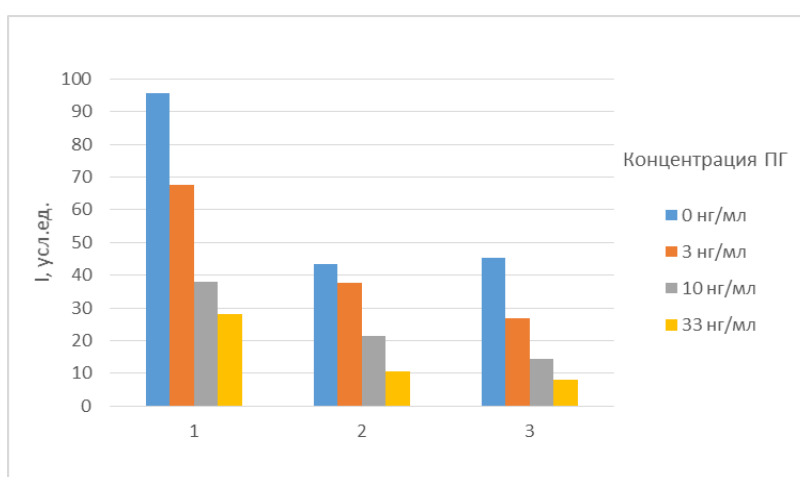
Рис. 29. Зависимость оптической плотности продукта ферментативной реакции от концентрации БСА для конъюгата ПГ-ПХ в буфере: 1 - ФБ, 2 - ФБС до лиофилизации; 3 - ФБ, 4 - ФБС после лиофилизации.

3.1.3.5. Выбор способа нанесения реагентов

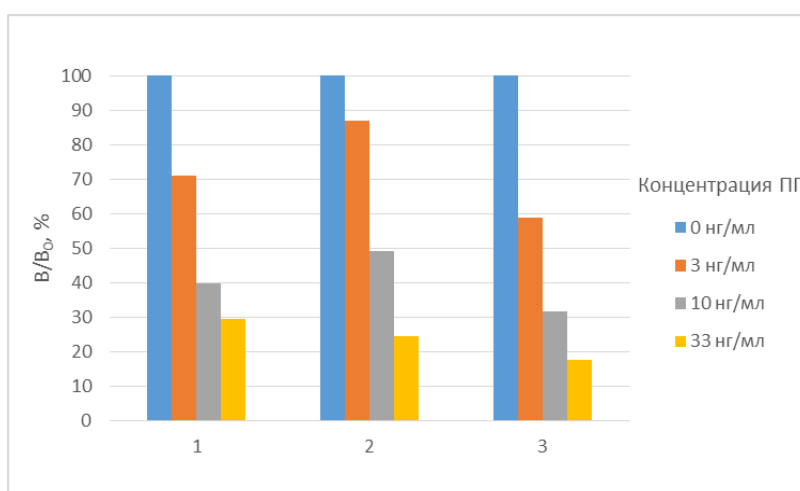
Было рассмотрено несколько способов нанесения реагентов на тест-полоску. Одним из вариантов является нанесение раствора пробы непосредственно на аналитическую зону мембраны, или нанесение пробы на мембрану для образца. Также при нанесении реагентов можно варьировать объем наносимого образца, т.е. его разведение. Ниже в Таблице 5 приведены рассмотренные схемы.

Таблица 5. Способы нанесения реагентов на тест-полоску.

№	Место нанесения пробы	Схема анализа
1	Аналитическая мембрана	смесь 10 мкл ПГ+10 мкл ПГ-ПХ наносят на аналитическую мембрану, далее наклеивают мембрану для образца, на которую наносят 120 мкл раствора ФБСТ
2	Мембрана для образца	смесь 60 мкл ПГ+10 мкл ПГ-ПХ+50 мкл ФБСТ наносят на мембрану для образца
3	Мембрана для образца	смесь 10 мкл ПГ-ПХ +120 мкл ПГ наносят на мембрану для образца



(А)



(Б)

Рис. 30. Зависимость интенсивности окрашивания тестовой полоски в ЛПИФА ПГ от концентрации ПГ для различных способов нанесения реагентов в абсолютных (А) и относительных (Б) величинах.

На Рис. 30 видно, что для схемы №1 наблюдается повышение аналитического сигнала в 2 раза, это связано с высокой локальной концентрацией конъюгата ПГ-ПХ в области тестовой линии. При добавлении реагентов на мембрану для образца, создается равномерный поток реагентов, равномерное распределение концентраций реагентов в объеме. Если учитывать, что в дальнейшем данная тест-система будет применяться к образцам цельного молока, то при добавлении молока непосредственно в аналитическую зону, получение визуального результата будет затруднено, так как молоко имеет довольно сложный состав. Поэтому при добавлении образца предпочтительно его нанесение на специальную мембрану для образца, где будут задерживаться крупные частицы жира, а также другие компоненты молока, которые препятствуют визуальной регистрации сигнала. Исходя из Рис.30 Б наилучшей чувствительностью обладает тест-система, где реагенты нанесены согласно схеме №3.

3.1.3.6. Выбор схемы проведения анализа

В работе было рассмотрено три схемы проведения анализа: первая - в тестовой зоне иммобилизованы антитела к ПГ, вторая - в тестовой зоне иммобилизован белок А, и третья – в тестовой зоне иммобилизован стрептавидин (Таблица 6).

Таблица 6. Схемы проведения анализа.

№	Схема проведения анализа	Условные обозначения
1		- Ат к ПГ - ПГ-ОВА, меченный ПХ
2		- свободный ПГ в пробе - белок А
3		- стрептавидин - биотинированные Ат к ПГ

Последние две схемы обычно применяют для увеличения чувствительности анализа. В случае использования белка А повышение чувствительности связано с

направленной посадкой антител за Fc фрагмент на сорбированный на мембране белок А. При использовании стрептавидина, применяют биотинилированные Ат, при этом чувствительность анализа повышается за счет высокой константы связывания ($\sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$) комплекса стрептавидин-биотин [193, 194].

Как видно из полученных стандартных кривых ЛПИФА, реализованного для каждой из указанных схем (Рис.31), рассмотренные подходы не позволяют получить выигрыш в чувствительности за счет изменения схемы проведения анализа. Калибровочные зависимости для каждой из схем практически идентичны. Поэтому для дальнейшей разработки метода ЛПИФА применяли наиболее простую схему 1 с прямой сорбцией антител.

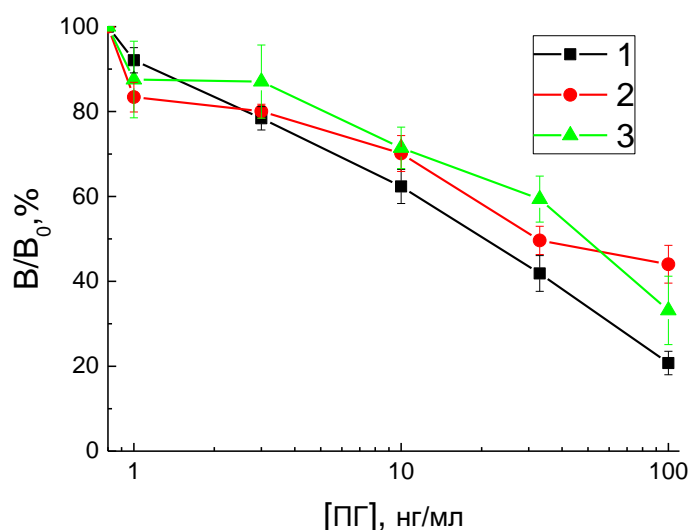


Рис. 31. Калибровочные кривые ЛПИФА ПГ для трех схем проведения анализа, где в тестовой зоне иммобилизованы: 1 – Ат к ПГ, 2 – белок А, 3 – стрептавидин.

3.1.3.7. Оптимизация стадии окрашивания тест-полоски

Так как при разработке ЛПИФА используется ферментная метка, то проведение данного вида анализа по сравнению с обычным ЛПИА усложняется присутствием дополнительной стадии – окрашивания тест-полоски субстратным раствором, т.е. проведение фермент-субстратной реакции. В литературе описано два способа окрашивания тест-полоски. Основными подходами являются так называемая "cross-flow" хроматография [54, 55, 192], т.е. окрашивание тест-полоски в горизонтальном направлении, и второй - нанесение субстратного раствора непосредственно на мембрану для образца [195], т.е. окрашивание в вертикальном направлении. Также в работе японских авторов предложена модифицированная форма тест-полоски, где для

нанесения субстрата существует специальная зона на тест-полоске, при этом раствор реагентов непосредственно наносится на аналитическую зону мембраны [196-198]. Нами был проведен анализ двух основных способов окрашивания мембраны, а также вариант, когда после нанесения субстратного раствора добавляют реагент для остановки фермент-субстратной реакции. Рассмотрено три варианта окрашивания тестовой зоны: окрашивание тест-полоски в пробирке с готовым субстратным раствором ТМБ и пероксида, содержащим декстрансульфат, непосредственное прямое нанесение субстратного раствора на аналитическую мембрану, и окрашивание тест-полоски в пробирке с раствором ТМБ с последующим промыванием тест-полоски водой, для остановки субстратной реакции (Рис.32).

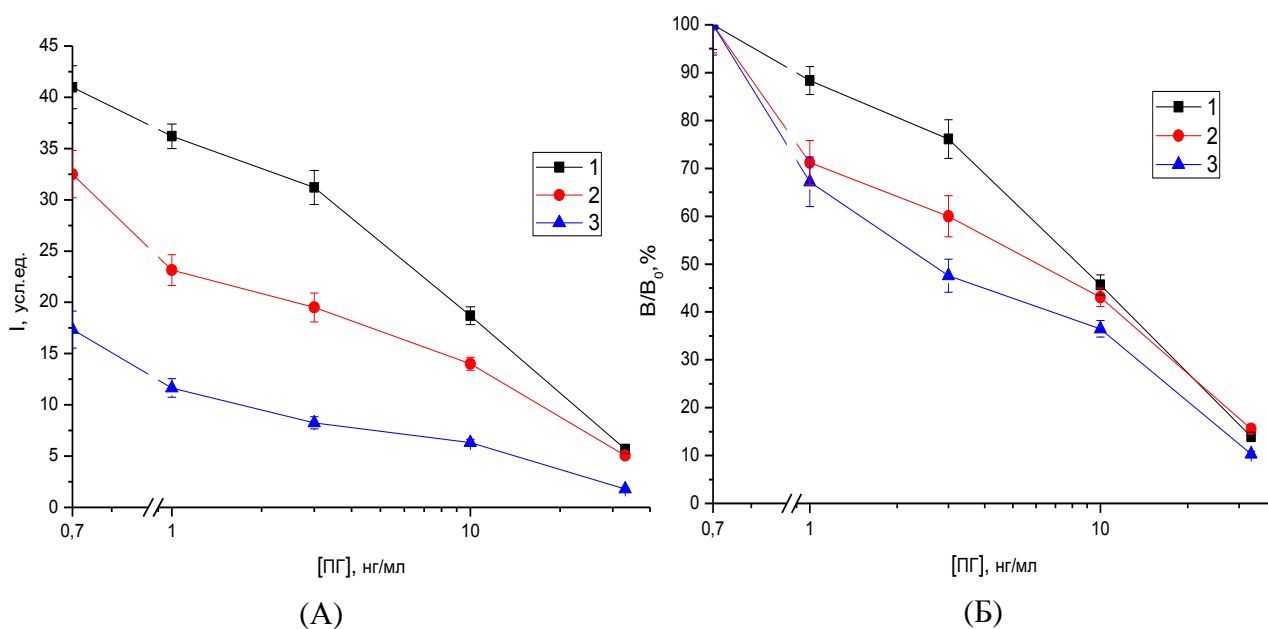


Рис. 32. Калибровочные зависимости ЛПИФА ПГ для различных способов окрашивания тест-полоски: 1 - окрашивание в пробирке с субстратным раствором, содержащим декстрансульфат, 2 - нанесение субстратного раствора на аналитическую мембрану, 3 - окрашивание в пробирке с субстратным раствором с последующей промывкой водой.

При сравнении этих методов окрашивания было выяснено, что при прямом нанесении субстратного раствора на поверхность аналитической мембраны наблюдается высокий фоновый сигнал, а также неравномерность окрашивания тестовой зоны. При инкубировании тест-полоски в пробирке, содержащей раствор ТМБ с декстрансульфатом в течение 5 минут наблюдается равномерное окрашивание тестовой

и контрольных зон и низкий фоновый сигнал. При последующем инкубировании тест-полоски в растворе H_2O , интенсивность аналитического сигнала уменьшается в 2 раза. Возможно, это связано с частичным вымыванием субстратного раствора или растворимого продукта реакции из пор мембраны. Наиболее оптимальным для проведения анализа был выбран первый вариант окрашивания тест-полоски.

3.1.3.8. Выбор мембранных компонентов для создания тест-полоски

Выбор мембран при разработке аналитического метода, основанного на проведении реакции в латеральном потоке жидкости в мембране, является одним из наиболее ответственных моментов. Два главных фактора определяют эффективность работы теста - это скорость потока образца вдоль мембраны и механизм связывания анализируемого вещества и агента в тестовой зоне. Наибольшей сорбционной емкостью по отношению к антителам обладают нейлоновые (Рис.33Б) и нитроцеллюлозные мембраны (Рис.33А).

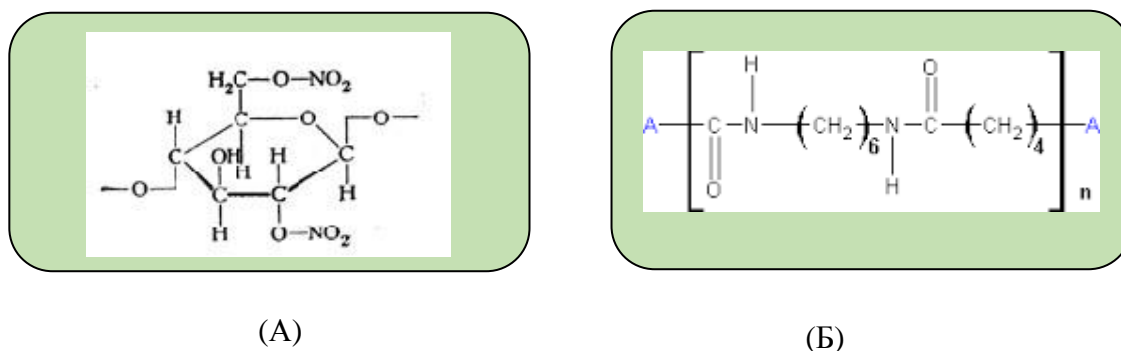


Рис. 33. Химический состав нитроцеллюлозной (А) и нейлоновой мембран (Б).

В ЛПИА традиционно применяют нитроцеллюлозные мембраны. Данные мембраны широко используются не только благодаря высокой способности связывать белки, а также, потому что иммобилизация белков на нитроцеллюлозной мембране имеет сорбционный характер за счет электростатического взаимодействия, создаваемого нитроэфирными группами, в то время как для иммобилизации белков на поверхности нейлоновых мембран требуется их предобработка, или активация мембраны. В работе были рассмотрены различные виды широко используемых на практике коммерческих нитроцеллюлозных аналитических мембран фирмы MDI (Индия). При выборе оптимальной мембраны рассматривались такие параметры как размер пор, степень

связывания белков, а также способность пропускать цельное молоко. В Таблице 7 показано, как зависят различные характеристики мембраны от размера пор.

Таблица 7. Зависимость характеристик анализа от размера пор аналитической мембраны.

Характеристика	Размер пор аналитической мембраны (время протекания образца)		
	5-8 мкм (180-220 с)	10-12 мкм (110-150 с)	15 мкм (70-90 с)
Чувствительность	Высокая	Средняя	Низкая
Скорость потока	Низкая	Средняя	Высокая
Время анализа	Более длительное	Среднее	Короткое
Вид тестовой линии	Четкая	Четкая	Относительно нечеткая

Например, при увеличении размера пор увеличивается скорость потока жидкости в мембране, соответственно уменьшается время анализа. Результаты показывают, что вид тестовой и контрольной линии становится менее четким при увеличении размера пор, что затрудняет визуальную детекцию результата (Рис.34). Мембраны с меньшим размером пор имеют большую площадь поверхности, и позволяют связывать гораздо большее количество детектируемого агента в тестовой зоне, что способствует регистрации их в меньшем количестве и созданию более чувствительного анализа.

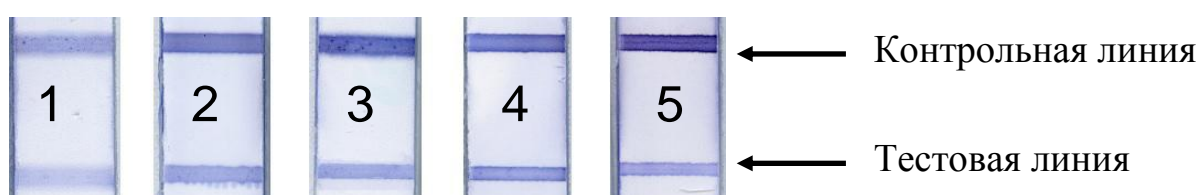


Рис. 34. Вид тестовой и контрольной линии для разных видов аналитических мембран (MDI, Индия): 1 – CNPC (15 мкм), 2 – CNPH (12 мкм), 3 – CNPF (10 мкм), 4 – CNPF (8 мкм), 5 – CNPF (5 мкм).

Для тест-систем с разными аналитическими мембранами были получены калибровочные зависимости при одинаковом разведении конъюгата ПГ-ПХ и одинаковой концентрации антител. Как видно на Рис. 35 при использовании мембран CNPH и CNPF (средний диаметр пор 8 мкм) наблюдается повышение аналитического сигнала приблизительно в 1,5 раза. Для мембраны CNPH данное повышение можно

объяснить наиболее высокой сорбционной емкостью среди рассматриваемых мембран, которая заявлена производителем. Для мембраны CNPF (8 мкм) увеличение аналитического сигнала также связано с увеличением сорбционной емкости при уменьшении размера пор. Для мембраны CNPC (15 мкм) наоборот наблюдается уменьшение аналитического сигнала. Это связано с достаточно большим размером пор мембраны, что приводит к снижению эффективности связывания свободного ПГ в пробе с антителами в тестовой зоне.

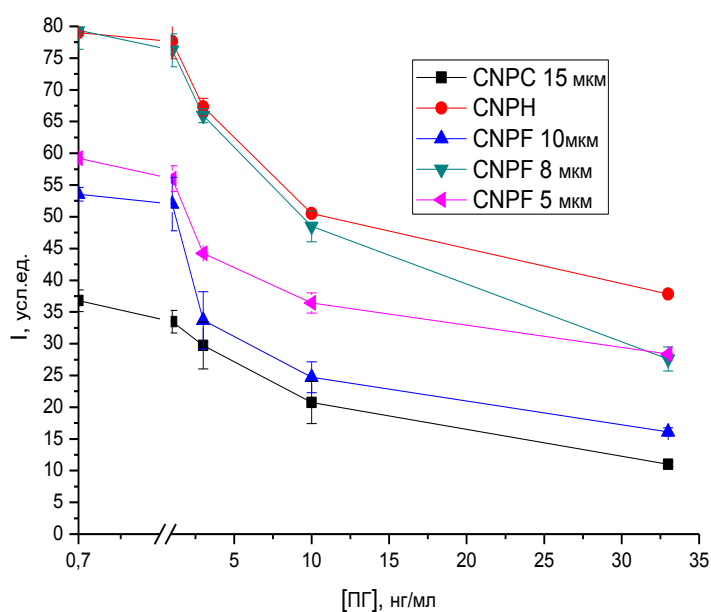


Рис. 35. Калибровочные кривые для тест-систем ЛПИФА ПГ с различными аналитическими мембранами в одинаковых условиях проведения эксперимента.

Для сравнения эффективности тест-систем с различными аналитическими мембранами были подобраны условия, чтобы измеряемая интенсивность аналитического сигнала составляла ~35-40 усл.ед. Таким образом, были получены калибровочные зависимости для всех типов используемых мембран (Рис.36). Наилучшую чувствительность показали мембраны с размером пор 8 мкм и 10 мкм.

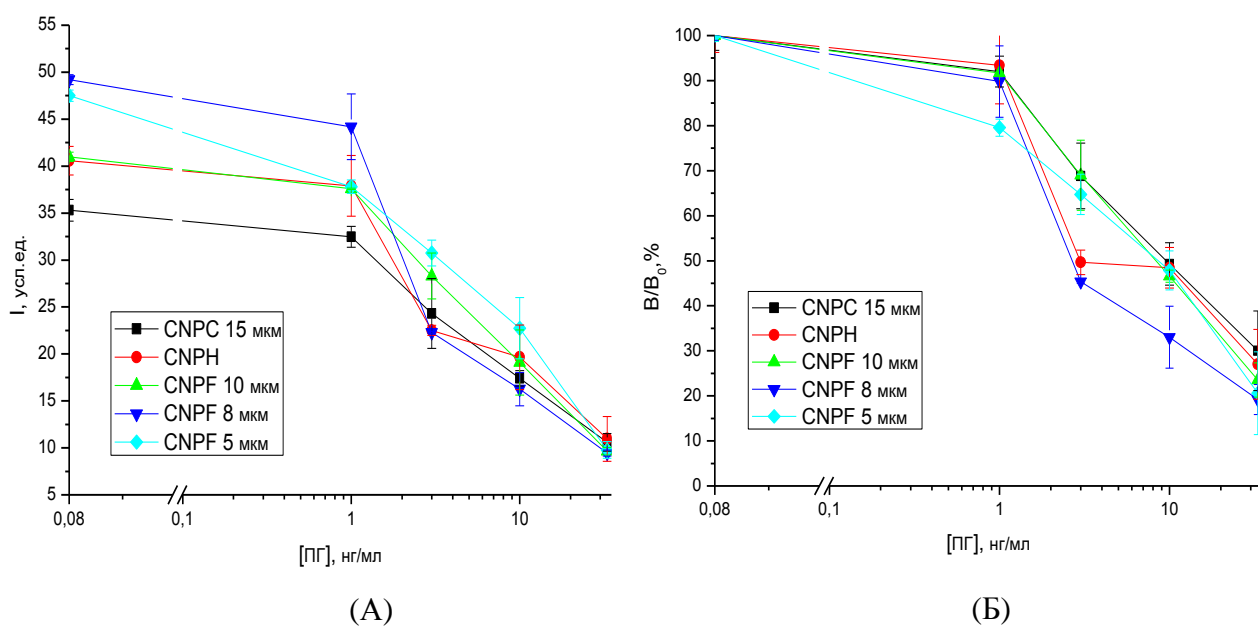


Рис. 36. Калибровочные кривые для тест-систем ЛПИФА ПГ с разными аналитическими мембранами.

Для формирования равномерного потока образца по тест-полоске необходимо подобрать также оптимальную мембрану для нанесения образца. На данном этапе было рассмотрено 6 видов мембран для нанесения образца, которые различаются по своей структуре и компонентам, входящих в их состав (Таблица 8).

Таблица 8. Виды мембран для нанесения образца.

№	Название мембраны	Химический состав мембраны
1	WF	Полиэфир
2	FR1 (0,35 мм)	Стекловолокно
3	FR1 (0,6 мм)	Стекловолокно
4	GFB-R7L (0,35 мм)	Стекловолокно, обработанное детергентом
5	GFB-R4 (0,35 мм)	Стекловолокно
6	Arista Biologicals	Стекловолокно

На Рис. 37 показано, как в зависимости от типа мембраны меняется чувствительность анализа. Например, для концентрации ПГ 10 нг/мл процент

ингибирования в случае мембраны FR1 с толщиной 0,6 мм достигает 80%, и в случае аналогичной мембраны FR1, но с толщиной 0,35 мм, процент ингибирования составил 60%. Мембрана R7 в своем составе содержит детергент, поэтому в данном случае образец движется по мембране быстрее, и процент ингибирования для концентрации ПГ 10 нг/мл снижается до 55 %. Таким образом, на протекание анализа влияют такие факторы как толщина мембраны, наличие детергентов в составе, а также материал, из которого изготовлена мембрана. Как видно из представленной диаграммы (Рис.37), наилучшей чувствительностью обладает система, где в качестве мембраны для образца используется мембрана Arista Biologicals. Данный эксперимент проводился в буферной системе, содержащей ПГ.

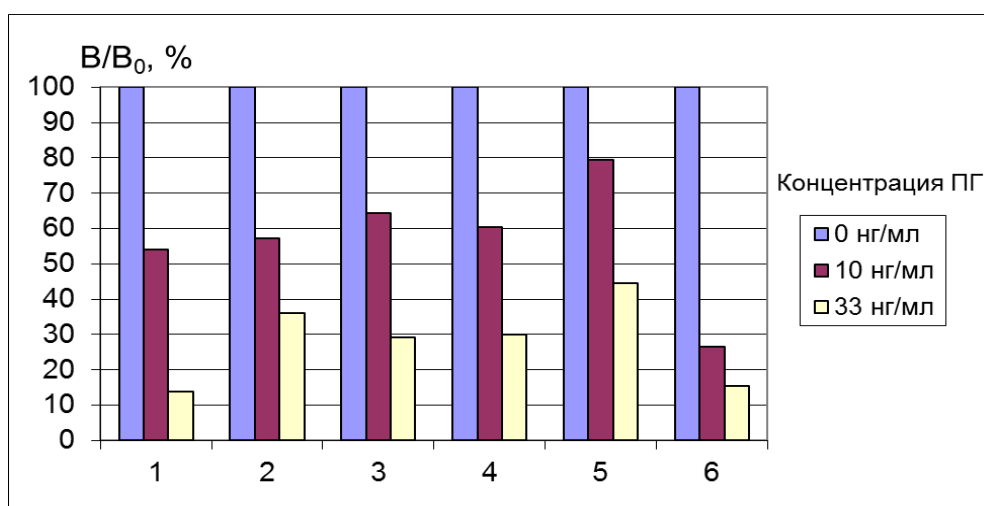


Рис. 37. Зависимость относительной интенсивности сигнала от концентрации ПГ для разных типов мембран для нанесения образца.

Конечной целью данной работы является проведение анализа ПГ в молоке коров. Молоко имеет сложный состав и, кроме того, состав молока, в частности жирность, может варьироваться от животного к животному [115]. Вариабельность исследуемых образцов может оказывать большое влияние на проведение анализа и, как следствие, на определение анализируемого вещества, в частности, гетерогенный состав образца может затруднять протекание образца по мембранам, что создает дополнительные трудности при работе с реальными образцами [199]. Поэтому для каждой комбинации аналитической мембраны и мембраны для нанесения образца проводили анализ на реальных образцах молока. Использовали следующую общую схему: были созданы всевозможные комбинации аналитических мембран и мембран для нанесения образца, и на каждую тест-полоску наносили одинаковый объем свежего образца молока. Далее

через 10 минут после нанесения, измеряли расстояние, которое прошел образец по тест-полоске. Для тест-полосок, где в качестве аналитической мембраны использовали мембрану с размером пор 5 мкм наблюдалась очень низкая скорость потока образца, его фронт едва достигал тестовой зоны аналитической мембраны. Аналогичная ситуация наблюдалась и для мембраны с размером пор 8 мкм. Однако уже для мембраны с размером пор 10 мкм наблюдалось значительное увеличение скорости потока, соответственно сокращалось время анализа ~ в 1,5 раза, и фронт образца доходил до конца тест-полоски. Таким образом, для дальнейшей разработки анализа выбрали оптимальную мембрану с размером пор 10 мкм. На Рис.38 представлен результат данного эксперимента.

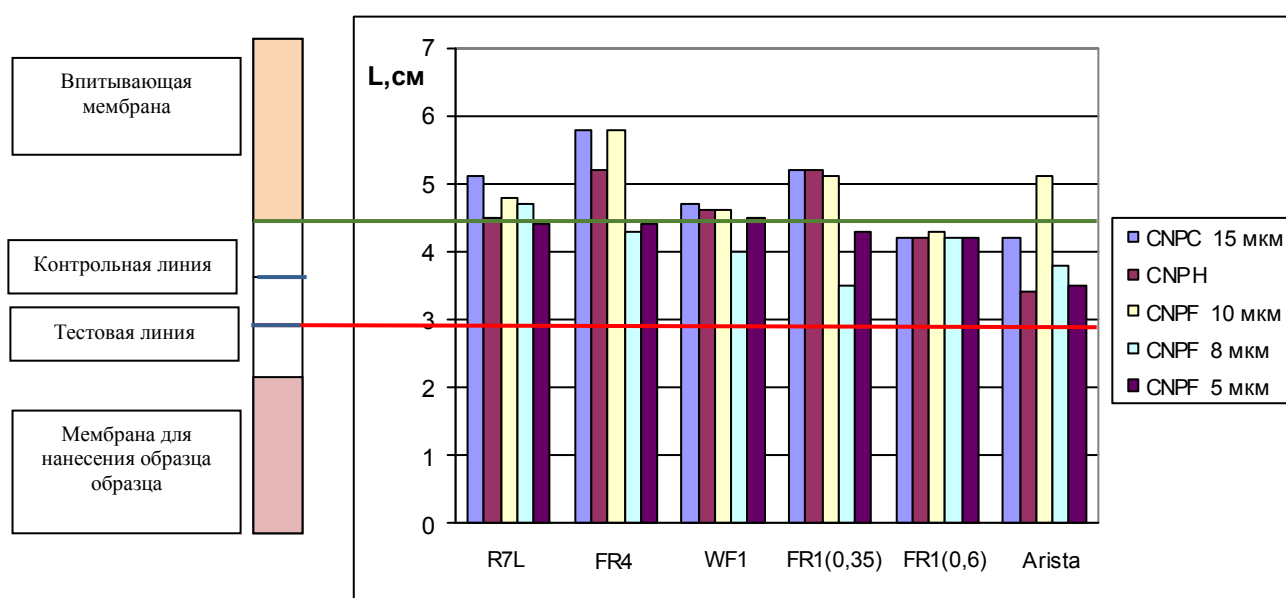


Рис. 38. Протекание образца молока по тест-полоске для различных комбинаций аналитической мембраны и мембраны для нанесения образца.

Видно, что для комбинаций с аналитической мембраной CNPF 5 мкм, фронт образца практически не доходит до впитывающей мембраны, которая обеспечивает равномерный поток. Следовательно, это затруднит при анализе визуализацию результата, а также будет искажать реальные результаты, так как не весь анализируемый ПГ достигнет тестовой линии. Аналогичная ситуация наблюдается для комбинации, где в качестве мембраны для нанесения образца используют мембрану FR1 (0,6). Наилучший результат достигается при использовании комбинации аналитических мембран: CNPC, CNPH, CNPF 10 мкм и мембран для нанесения образца: R7, R4, WF1, FR1 (0,35). На предыдущем этапе работы в качестве оптимальной была выбрана аналитическая мембрана CNPF 10 мкм. Поэтому далее провели сравнение по

чувствительности анализа следующих комбинаций: CNPF 10 мкм + R7, CNPF 10 мкм + R4, CNPF 10 мкм + WF1, CNPF 10 мкм + FR1 (0,35). Исходя из данных по чувствительности для данных комбинаций, была выбрана комбинация аналитической мембраны CNPF 10 мкм и мембраны для нанесения образца R7. На основе выбранных мембранных компонентов была создана тест-система для определения ПГ в молоке коров.

3.1.3.9. Влияние содержания белков на проведение анализа

Коровье молоко состоит на 83—88 % воды и на 11 — 18 % сухого вещества, в которое входят 3,8—6 % жира, 2—5 % азотистых веществ, 4—5 % молочного сахара (лактоза), 0,6—0,8 % минеральных веществ, 0,1—0,2 % лимонной кислоты [200]. Из азотистых веществ встречаются казеин — 2 — 4 %, молочный глобулин — менее 0,1, молочный альбумин — 0,2—0,6, других небелковых азотистых веществ — 0,05—0,2 %. В работе было рассмотрено, каким образом присутствие белков в анализируемом растворе оказывает влияние на чувствительность анализа. Эксперимент проводили на примере белка БСА. Как видно, из представленной калибровочной зависимости (Рис.39), присутствие белка в системе не оказывает существенного влияния на чувствительность анализа.

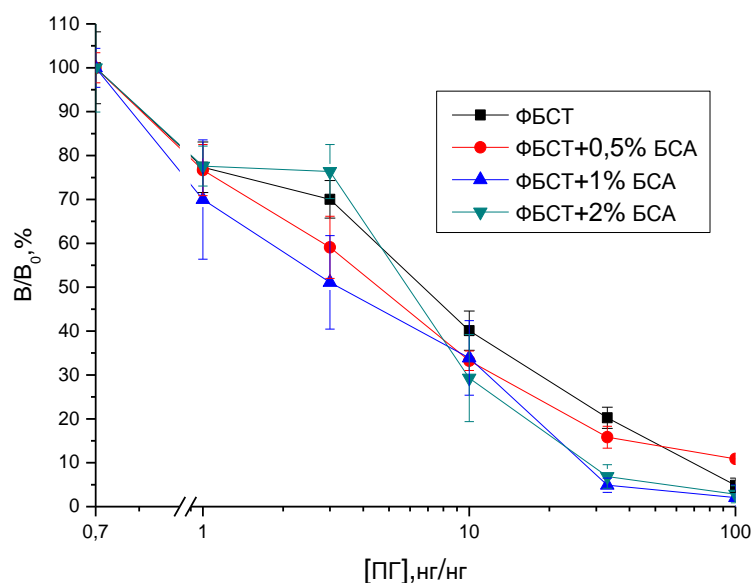


Рис. 39. Калибровочные зависимости ЛПИФА ПГ для разного содержания БСА в рабочем буфере.

Таким образом, в результате проведенной оптимизации был разработан метод ЛПИФА для определения ПГ в буферном растворе в диапазоне концентраций от 2 до 40 нг/мл. Для создания тест-полоски в качестве аналитической использовали мембрану CNPF с размером пор 10 мкм, мембрану для образца GBF- R7L, содержащую в своем составе детергент (MDI, Индия). Для разработанного метода ЛПИФА была получена калибровочная зависимость для определения ПГ (Рис.40).

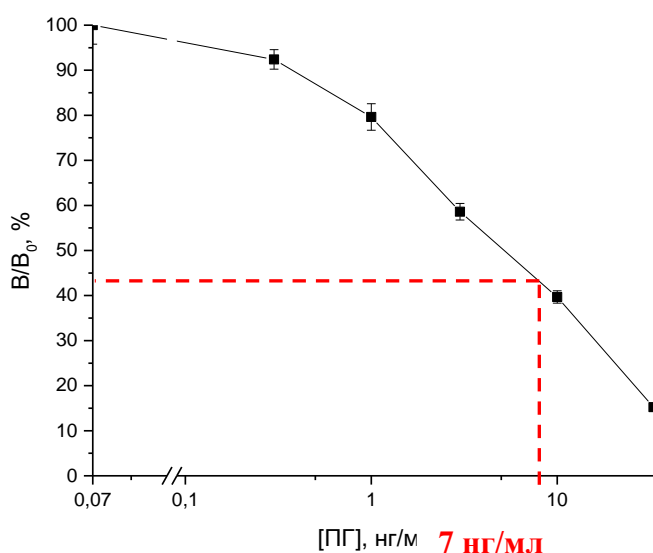


Рис. 40. Калибровочная зависимость ЛПИФА ПГ.

Определение концентрации ПГ проводили следующим образом: на мембрану для образца наносили смесь анализируемого образца объемом 120 мкл и 10 мкл меченого реагента, когда раствор впитался (~10 мин), тест-полоску помещали в пробирку с субстратом для проведения ферментативной реакции (Рис.41). Сигнал регистрировали визуально через 5 минут. Предел обнаружения метода составил 0,8 нг/мл. Рабочий диапазон определяемых концентраций ПГ составил 2-40 нг/мл.

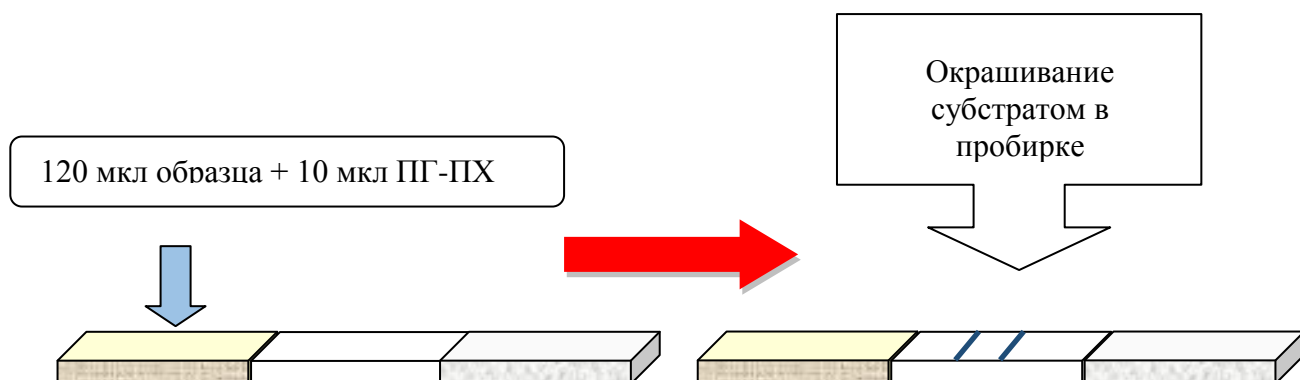


Рис. 41. Схема проведения ЛПИФА с ферментной меткой.

На Рис. 42 представлен визуальный результат, соответствующий полученной калибровочной зависимости. Из диапазона определяемых концентраций на рисунке видно, что диагностика стельности при использовании данной тест-системы может проводиться по принципу «да-нет». Стельными считаются те коровы, в молоке которых концентрация ПГ более 7 нг/мл. В данном случае визуальная регистрация может быть легко осуществлена, так как при концентрации ПГ 7 нг/мл тестовая линия имеет слабую окраску.

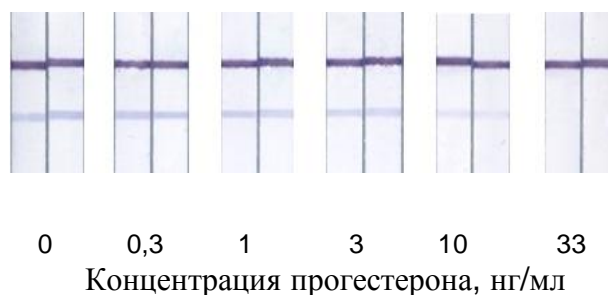


Рис. 42. Визуальный результат калибровочной зависимости ЛПИА ПГ.

В заключении проведем сравнение разработанных методов ЛПИА с коллоидным золотом в качестве метки, стандартного ИФА и ЛПИФА (Таблица 9). Как видно из Рис.43, линейный диапазон определяемых концентраций для методов ИФА и ЛПИФА несущественно отличаются друг от друга. При этом проточные методы имеют существенное преимущество по времени проведения анализа. Также разработанный метод ЛПИФА позволяет проводить анализ в «полевых» условиях, что крайне важно для практического использования быстрого теста для определения стельности коров.

Таблица 9. Основные характеристики методов определения ПГ.

Метод анализа	Диапазон определяемых концентраций, нг/мл	IC ₅₀ , нг/мл	Время проведения анализа
ЛПИА (метка - коллоидное золото)	>30	110	10-15 мин
ИФА	0,5 – 20	1	1,5 часа
ЛПИФА	2 – 40	6	15-20 мин

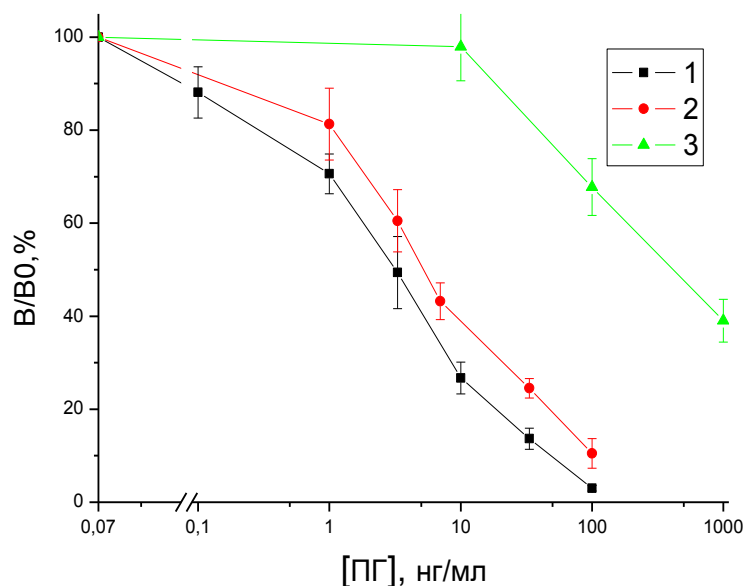


Рис. 43. Стандартные кривые определения ПГ в молоке различными методами: 1 – ИФА; 2 – ЛПИФА; 3 – ЛПИИА (метка – коллоидное золото).

Разработанный метод ЛПИФА позволяет определять ПГ в концентрациях менее 10 нг/мл. Чувствительность метода сравнима с традиционным методом ИФА, при этом существенно сокращается время анализа и упрощается процедура проведения, что позволяет применять разработанные тест-полоски для определения ПГ во внелабораторных условиях.

3.1.3.10. Практическое использование метода ЛПИФА для анализа ПГ в молоке с целью определения стельности

Для выяснения возможности использования разработанного экспресс-метода анализа ПГ для раннего определения стельности использовали пробы цельного молока, отобранные как у стельных коров, так и нестельных, находящихся на разных стадиях полового цикла. Перед проведением анализа в лаборатории образцы молока инкубировали при температуре 37°C в течение 30 мин. Далее непосредственно перед нанесением на тест-полоску образец интенсивно встряхивали и смешивали с аликвотой конъюгата ПГ-ПХ, после чего полученную смесь наносили на тест-полоску. Эффективность разработанной тест-системы для количественного определения ПГ в молоке коров была подтверждена сравнением с высокочувствительным методом ИФА. Методом ЛПИФА и ИФА было проанализировано 47 образцов. Было показано, что данные хорошо коррелируют друг с другом (Рис. 44), т.е. разработанный экспресс-тест

ЛПИФА ПГ может также применяться для количественной оценки содержания ПГ в молоке.

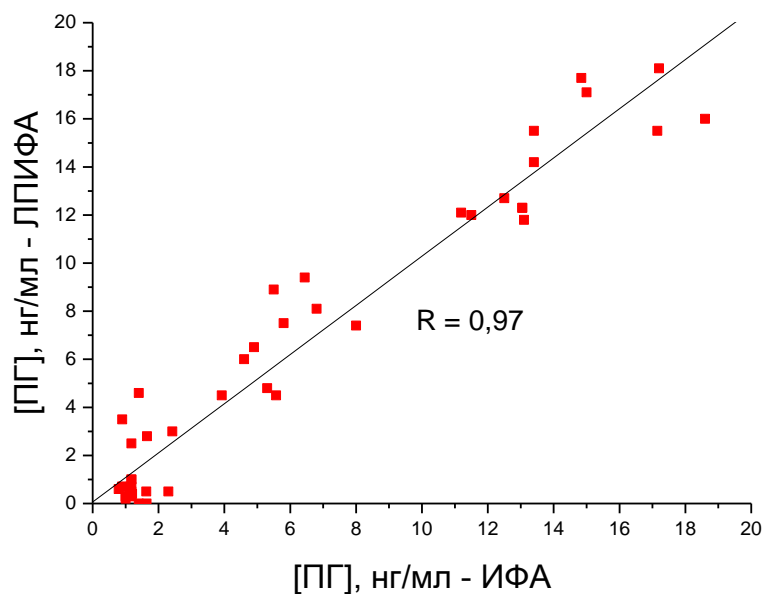


Рис. 44. Корреляция методов ИФА и ЛПИФА.

Для выявления стельности в качестве стандартного метода использовали данные, полученные ректальным методом. Результаты исследований с описанием определяемых диагностических параметров тест-системы приведены в Таблице 10.

Таблица 10. Определение стельности с использованием метода ЛПИФА и ректального исследования.

		ЛПИФА исследование		Всего
		Нестельные	Стельные	
Ректальное исследование	Нестельные	A=21	B=0	A+B=21
	Стельные	C=4	D=22	C+D=26
	Всего	A+C=25	B+D=22	47

Чувствительность $D/(C+D) = 84\%$

Специфичность $A/(A+B) = 100\%$

Прогностическая ценность положительного результата $D/(B+D) = 100\%$

Прогностическая ценность отрицательного результата $A/(A+C) = 80\%$

Диагностическая точность $(A+D)/(A+B+C+D) = 91\%$

Методом ЛПИФА было определено 46,8% от общего числа образцов как принадлежащие стельным животным, что было подтверждено ректальным методом. 44,7% образцов были диагностированы как принадлежащие нестельным животным. Для 8,5% образцов были получены несовпадающие результаты. Методом ЛПИФА данные образцы были определены как нестельные с низким содержанием ПГ, в то время как методом ректального исследования данные животные определили, как стельных. Одним из объяснений данного явления является ранняя эмбриональная смерть плода. Для сравнительной характеристики разработанного ЛПИФА метода с традиционным ректальным исследованием были определены такие диагностические параметры как чувствительность метода, специфичность, диагностическая точность и прогностическая ценность метода. Так как было выявлено 8,5% ложноотрицательных образцов, чувствительность метода составила 84%, и специфичность теста – 100%. Прогностическая ценность для положительного результата составила 100%, и для отрицательного результата – 80%.

Таким образом, разработанный метод ЛПИФА позволяет количественно определять уровень ПГ в цельном молоке коров в диапазоне от 2 до 40 нг/мл, а также позволяет проводить полуколичественный анализ с целью определения стельности у коров. При этом чувствительность теста составила 84%, а специфичность - 100%. Время проведения анализа составляет 20 мин. Процедура его проведения проста и не требует специальных навыков и оборудования, что позволяет применять разработанную тест-систему непосредственно в молочных хозяйствах.

3.2. Разработка метода ИФиА для определения ПГ

Метод ИФиА относится к группе экспресс-тестов, которые позволяют проводить анализ биологически важных веществ без специальной пробоподготовки и оборудования во внелабораторных условиях. Принцип метода также основан на использовании пористых мембран с иммобилизованными специфическими компонентами, однако основное отличие заключается в строении тест-системы и направлении движения анализируемого образца. Устройство для проведения ИФиА представляет собой тест-кассету, состоящую из аналитической мембраны и расположенной с ней в непосредственном контакте по всей поверхности адсорбционной мембраны. а поток реагентов распространяется в вертикальном направлении (перпендикулярном по отношению к плоскости поверхности мембраны) под действием капиллярных сил и сил тяжести. Тестовая и контрольная зона в таких тест-системах представлены в виде специальных зон разного формата, как представлено на Рис.45.

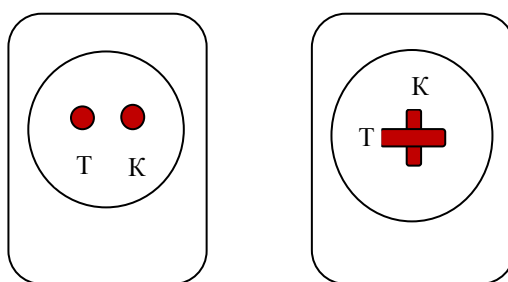


Рис. 45. Виды аналитической зоны тест-кассеты для проведения ИФиА, где Т – тестовая зона и К – контрольная зона.

Одним из основных преимуществ ИФиА является высокая скорость прохождения реагентов через мембрану, благодаря небольшой толщине мембран и вертикального направления движения потока жидкости время анализа меньше чем, например, в ЛПИА. Перевод иммунохимических реакций из кинетического режима в равновесный осуществляется за счет объема образца, протекающего через аналитическую мембрану. Также для метода ИФиА является возможным проведения стадии промывания аналитической мембраны от несвязавшихся реагентов, что позволяет снизить фоновый сигнал и получать более четкие воспроизводимые результаты.

3.2.1. Оптимизация условий проведения ИФиА ПГ с коллоидным золотом в качестве метки

3.2.1.1. Выбор концентраций реагентов

Для разработки ИФиА ПГ использовали схему анализа, при которой в тестовой зоне аналитической мембраны иммобилизованы поликлональные антитела к ПГ (Рис.46). В качестве метки применяли конъюгат ПГ-ОВА, меченный золотыми наночастицами диаметром 20 нм. Оптимальная концентрация конъюгата ПГ-ОВА и рН раствора коллоидного золота составляет 50 мг/мл и 5,5 соответственно, что было показано в предыдущей главе при разработке ЛПИА с коллоидным золотом в качестве метки.



Рис. 46. Схема проведения ИФиА с коллоидным золотом в качестве метки.

Выбор оптимального соотношения концентраций реагентов проводили согласно принципу, описанному в предыдущей главе: концентрация меченого антигена при фиксированной концентрации иммобилизованных антител должна соответствовать точке приблизительно 50%-ного связывания конъюгата с иммобилизованными антителами при условии равенства констант связывания активных центров антител с меченым и свободным антигенами. Концентрация антител должна быть подобрана таким образом, чтобы можно однозначно визуально регистрировать аналитический сигнал с хорошей воспроизводимостью. Из анализа полученных данных следует, что при одновременном увеличении концентрации сорбированных антител и количества конъюгата ПГ-ОВА, меченного коллоидным золотом (с 12,5 мг/мл до 50 мг/мл на полоску) происходит увеличение интенсивности регистрируемого сигнала (Рис.47). При этом при переходе от концентрации антител 0,05 мг/мл к 0,1 мг/мл интенсивность сигнала возрастает практически в 3 раза, в тоже время при повышении концентрации антител от 0,1 до 0,25 мг/мл, такого резкого повышения не наблюдается. Интенсивность окраски тестовой зоны при концентрации антител 0,05 мг/мл крайне мала и визуально

практически не регистрируется, в случае высокой концентрации антител 0,25 мг/мл наблюдается избыток антител, сорбированных на мембране. Об это свидетельствует появление характерного ярко окрашенного ободка вокруг тестового пятна. В результате были выбраны следующие условия: концентрация антител – 0,1 мг/мл, и концентрация конъюгата ПГ-ОВА, меченного коллоидным золотом, - 25 мг/мл, концентрация антител – 0,1 мг/мл, и объем конъюгата ПГ-ОВА, меченного коллоидным золотом, - 50 мг/мл, концентрация антител – 0,25 мг/мл, и объем конъюгата ПГ-ОВА, меченного коллоидным золотом, - 25 мг/мл.

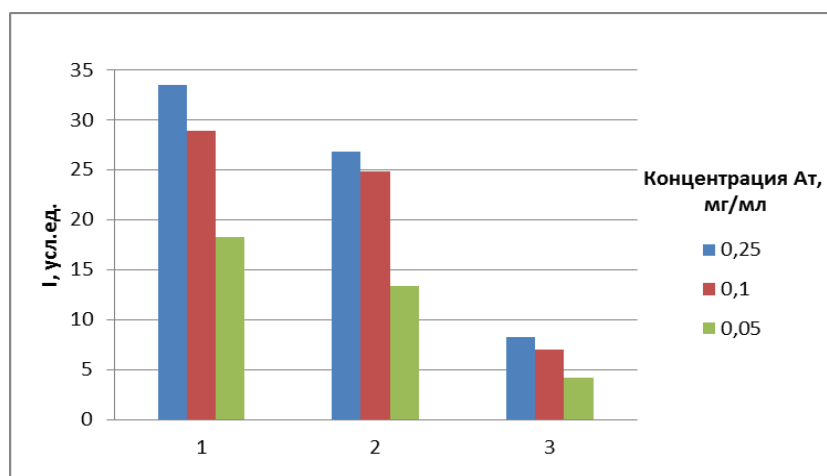


Рис. 47. Титрование антител при концентрации конъюгата ПГ-ОВА, меченного золотыми наночастицами: 1 – 50 мг/мл, 2 – 25 мг/мл, 3 – 12,5 мг/мл.

При добавлении образца на мембрану свободный ПГ в анализируемой пробе связывается с антителами в тестовой зоне, оставшиеся свободные центры связывания антител приходятся на долю конъюгата ПГ-ОВА, меченного золотыми наночастицами, окраска в тестовой зоне или отсутствует, или слабая. В случае отсутствия в пробе ПГ, с антителами в тестовой зоне связывается конъюгат ПГ-ОВА, меченный золотыми наночастицами. При этом наблюдается интенсивная окраска тестовой зоны. Наблюдается обратная зависимость интенсивности аналитического сигнала от концентрации ПГ в пробе.

Для выбранных условий были получены зависимости относительной интенсивности аналитического сигнала от концентрации ПГ (Рис.48). Из полученных данных видно, что при уменьшении концентрации антител в тестовой зоне чувствительность анализа повышается незначительно. На представленной диаграмме видно, что данная тест-система не позволяет проводить определение уровня ПГ в концентрациях менее 7 нг/мл.

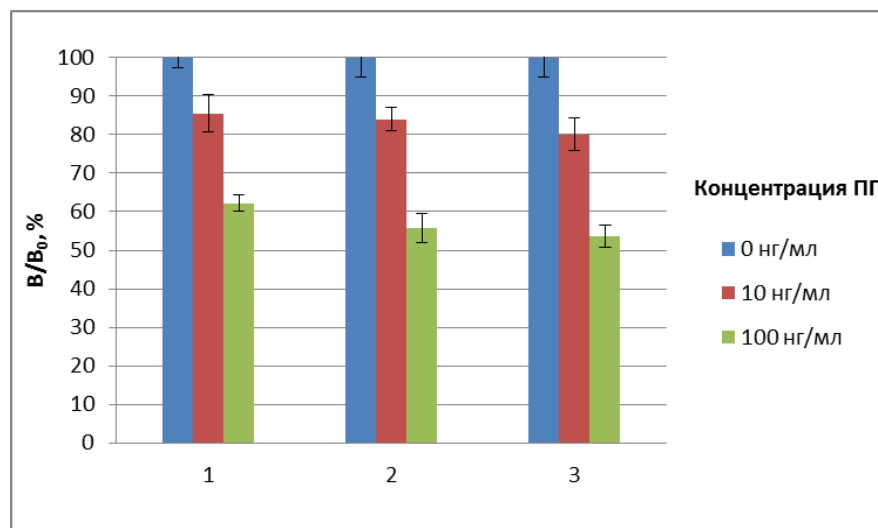


Рис. 48. Интенсивности наблюдаемого сигнала в тестовой зоне при различных значениях концентраций сорбируемых антител, разведениях конъюгата и концентрации ПГ. Концентрация антител и объем конъюгата ПГ–ОВА, меченного золотыми наночастицами: 1 - Ат– 0,25 мг/мл, ПГ-ОВА - 10 мкл; 2 - Ат– 0,1 мг/мл, ПГ-ОВА - 10 мкл, 3 - Ат– 0,1 мг/мл, ПГ-ОВА - 5 мкл.

Аналогично подходу, который был применен при разработке ЛПИА с коллоидным золотом в качестве метки, для смещения диапазона определяемых концентраций в область более низких концентраций была рассмотрена модификация схемы анализа, где в качестве тестовой линии нанесен белок А (Рис.49).



Рис. 49. Схема проведения ИФиА ПГ с коллоидным золотом в качестве метки, где в тестовой зоне иммобилизован белок А.

Все реагенты: конъюгат ПГ-ОВА, меченный золотыми наночастицами и свободный ПГ, содержащийся в анализируемой пробе, а также антитела, специфичные к ПГ пропускаются по тест-полоске одновременно, поэтому создаются условия истинной конкуренции между меченым и немеченым реагентами за центры связывания антител, которые присутствуют в растворе. Однако в данном случае также не наблюдалось увеличения чувствительности анализа (Рис.50).

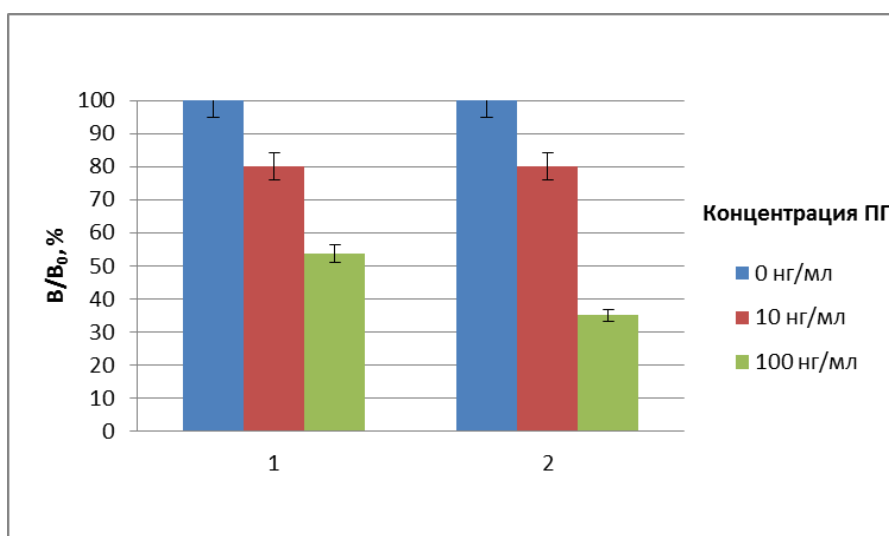


Рис. 50. Относительная интенсивность аналитического сигнала при разных концентрациях ПГ, полученная для сорбированных в аналитической зоне: 1- антител, специфичных к ПГ и 2 - белка А.

В обоих случаях, ПГ определяли в растворе в диапазоне концентраций до 100 нг/мл, что в несколько раз превышает предел, необходимый для детекции ПГ в молоке. Такая низкая чувствительность анализа при использовании наночастиц золота в качестве метки, обусловлена большим размером золотых наночастиц по сравнению с низкомолекулярным ПГ. Также в данном виде анализа используется относительно высокая концентрация антител (0,1 мг/мл), иммобилизованных на аналитической мембране и высокой концентрацией ПГ на поверхности золотых наночастиц. Так как концентрация ПГ на поверхности золотых наночастиц всегда выше концентрации ПГ, содержащегося в анализируемой пробе, это обстоятельство нарушает оптимальные условия конкурентного анализа, что приводит к снижению чувствительности. Следует отметить, что полученный результат согласуется с данными метода ЛПИА с коллоидным золотом. Поэтому для определения ПГ в концентрациях ниже 7 нг/мл, далее для разработки ИФиА также была использована ферментная метка.

3.2.2. Разработка метода ИФиА с ферментной меткой

Для разработки ИФиА с ферментной меткой в качестве меченого реагента использовали конъюгат производной ПГ с ПХ. В качестве основной схемы использовали конкурентную схему с иммобилизованными антителами в тестовой зоне (Рис.51).

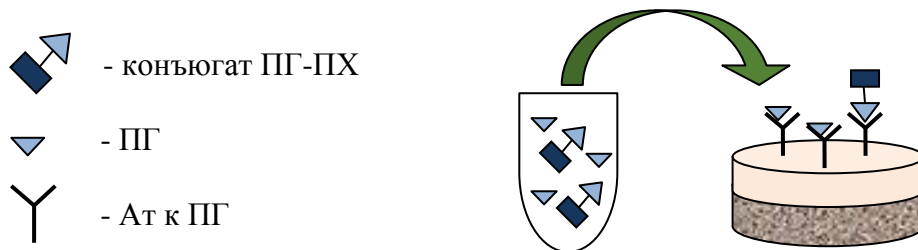


Рис. 51. Схема проведения ИФиА с ферментной меткой.

Для проведения анализа, собирали тест-кассету как показано на Рис. 52. В качестве аналитических мембран были рассмотрены нитроцеллюлозные мембраны фирмы MDI (Индия) и нейлоновые мембраны фирмы Pall (США).

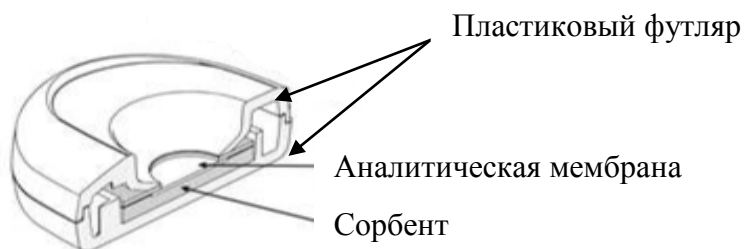
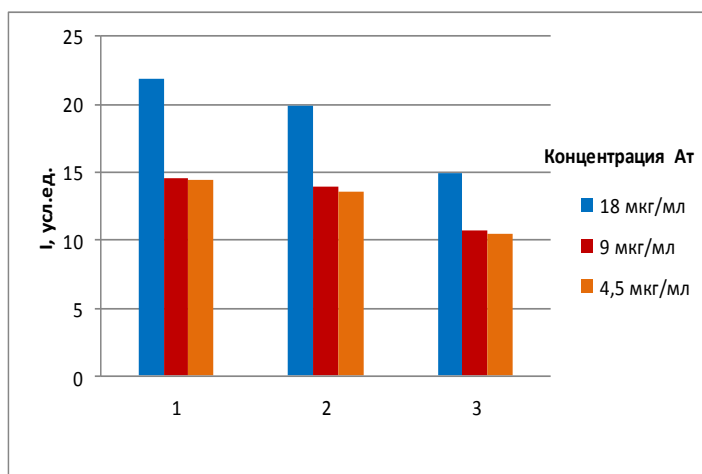


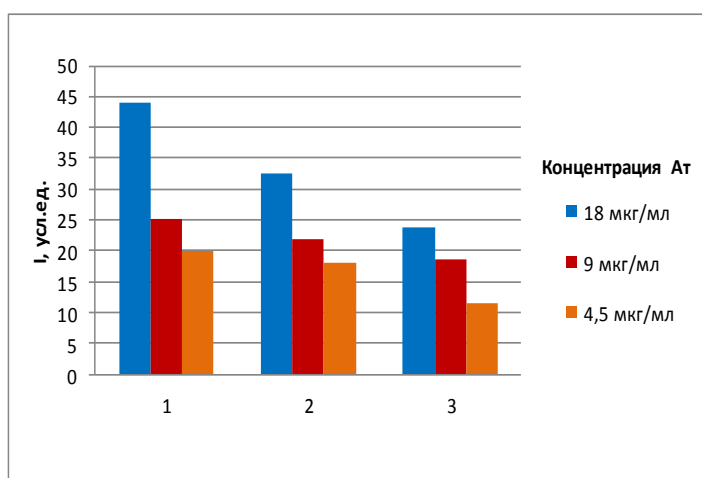
Рис. 52. Строение тест-кассеты для ИФиА.

3.2.2.1. Выбор концентраций реагентов

Были подобраны оптимальные концентрации антител к ПГ и конъюгата ПГ-ПХ для обеспечения конкурентной схемы анализа для каждой тест-системы с разной аналитической мембраной. На аналитической мембране в двух рядом расположенных круговых зонах иммобилизовали специфические антитела к ПГ и к ПХ. На Рис.53 представлены данные по влиянию концентраций антител и конъюгата ПГ-ПХ для нитроцеллюлозных аналитических мембран CNJ-X1 с размером пор 0,45 мкм и CLW-040-SH34 с размерами пор 0,45 мкм и 0,8 мкм на интенсивность регистрируемого сигнала. Результаты, полученные для мембраны CLW-040-SH34 с размером пор 0,8 мкм, совпадали с результатами, полученными для мембраны CLW-040-SH34 с размером пор 0,45 мкм. Для нейлоновых аналитических мембран наблюдалась плохая воспроизводимость результатов, поэтому в дальнейшем данные мембраны не принимались в рассмотрение.



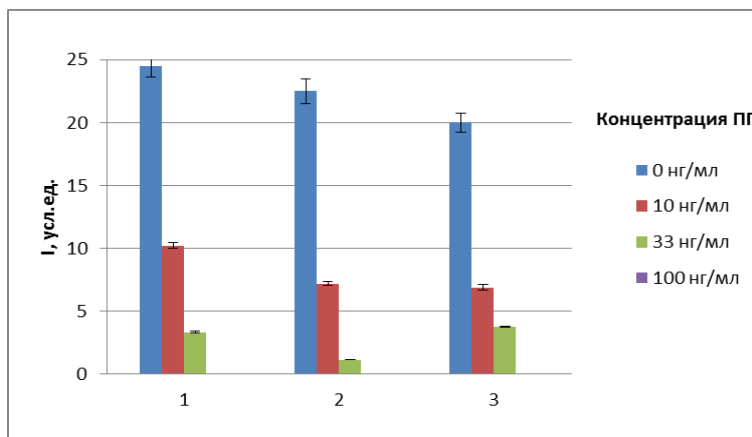
(А)



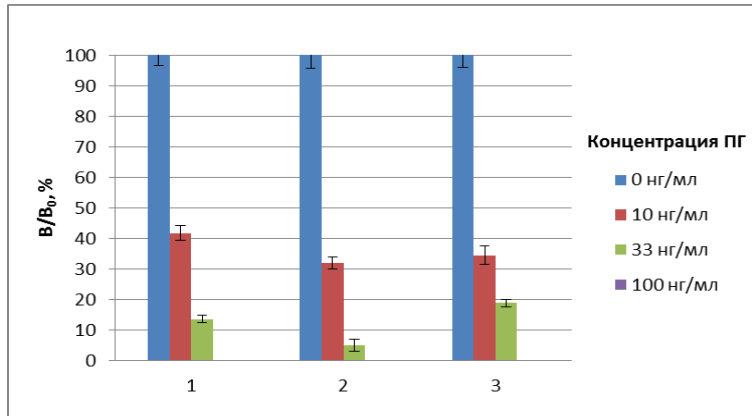
(Б)

Рис. 53. Интенсивности наблюдаемого сигнала в тестовой зоне при различных значениях концентраций сорбируемых антител и разведениях конъюгата ПГ-ПХ: 1- 1/7500, 2 – 1/15000, 3 – 1/30000 для мембран CNJ-X1 (А) и CLW – 040 –SH34(0,45 мкм) (Б).

Для подбора оптимальных концентраций реагентов рассматривали различные соотношения концентраций конъюгата и иммобилизованных антител: концентрацию конъюгата ПГ-ПХ, соответствующую 50% связывания, а также избыток и недостаток концентрации конъюгата ПГ-ПХ, попадающие в диапазон 30 – 80% связывания. Таким образом, были получены зависимости интенсивности аналитического сигнала от концентрации ПГ для выбранных концентраций иммунореагентов для каждого из трех случаев. В качестве примера на Рис. 54 приведены зависимости для аналитической мембраны CLW-040-SH34 (размер пор 0,45 мкм).



(А)



(Б)

Рис. 54. Интенсивности сигнала тестовой зоны ИФиА при разных концентрациях антител, конъюгата ПГ-ПХ и ПГ с ферментной меткой для мембраны CLW-040-SH34 (0,45 мкм) в абсолютных (А) и относительных (Б) единицах. Концентрация антител и разведение конъюгата ПГ-ПХ: 1 – Ат 18 мкг/мл, ПГ-ПХ 1/30000; 2 – Ат 9 мкг/мл, ПГ-ПХ 1/30000; 3 – Ат 4,5 мкг/мл, ПГ-ПХ 1/7500.

Как видно из полученных данных (Рис.54), при увеличении концентрации антител, иммобилизованных в тестовой зоне приводит к снижению чувствительности анализа, так для концентрации антител 9 мкг/мл величина процента ингибирования в точке 10 нг/мл значительно ниже, чем для концентрации антител 18 мкг/мл. При увеличении концентрации конъюгата ПГ-ПХ наблюдается повышение фонового сигнала, также снижение чувствительности анализа.

Таким образом, для дальнейших экспериментов в качестве оптимальных концентраций реагентов было выбрана концентрация антител 9 мкг/мл при разведении конъюгата ПГ-ПХ в 30000 раз.

3.2.2.2. Определение оптимальных характеристик регистрации протекания субстратной реакции на мембранах

Для того, чтобы разработать количественный метод проведения ИФиА прежде всего необходимо было подобрать условия проведения реакции, при которых величина интенсивности окраски реакционной зоны соответствовала количеству ферментной

метки, а, следовательно, и измеряемой концентрации ПГ в растворе. Была изучена зависимость интенсивности окрашивания тестовой зоны от времени для разных концентраций конъюгата ПГ-ПХ (Рис.55А). Установлено, что регистрируемый сигнал пропорционален концентрации ПГ-ПХ. Из Рис.55А видно, что наблюдается постепенное развитие окраски в тестовой зоне, что объясняется кинетикой протекания ферментативной реакции в порах мембраны. В течение 30 мин интенсивность окраски возрастает ~на 25%.

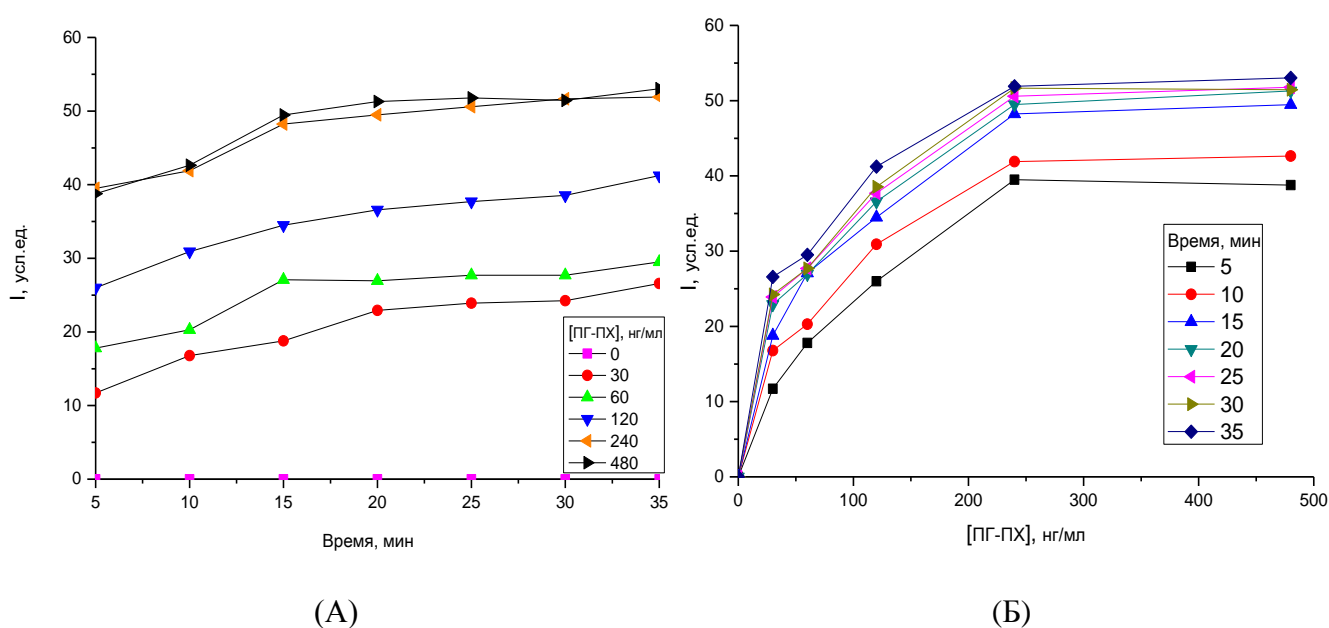


Рис. 55. Зависимость интенсивности сигнала для разных концентраций конъюгата ПГ-ПХ от времени (А) и от концентрации конъюгата ПГ-ПХ (Б).

Из анализа данных, представленных на Рис.56Б следует, что в диапазоне концентраций конъюгата ПГ-ПХ от 0 до 250 нг/мл интенсивность окраски тестовой зоны однозначно связана с количеством пероксидазы, содержащейся в порах мембраны. Следовательно, в этом диапазоне концентраций конъюгата ПГ-ПХ его количество будет соответствовать измеряемому количеству ПГ в растворе.

Как видно из Рис.56, после начального окрашивания мембраны под действием субстратного раствора, измеряемый аналитический сигнал, соответствующий интенсивности окрашивания, остается стабильным в течение, по крайней мере, одного часа. Регистрацию результата можно проводить как через 5 мин, после окрашивания мембраны, так и через час, так как пропорциональность результата сохраняется. Было показано, что при добавлении большего объема субстрата сигнал становится более

стабильным, а также полученные данные обладают меньшей вариабельность по сравнению с данными полученными при добавление небольшого объема субстрата (~100 мкл). Это свидетельствует о том, что при добавлении меньшего количества субстрата ферментативная реакция протекает медленнее, что замедляет процесс развития окраски тестовой и контрольных зон.

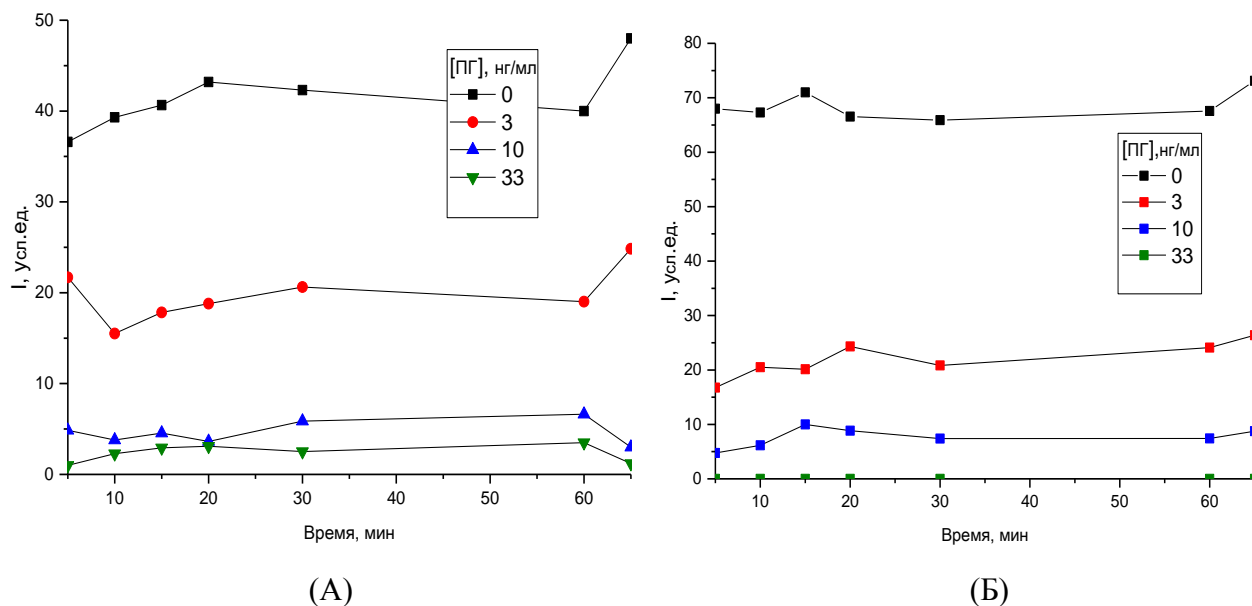


Рис. 56. Зависимость интенсивности сигнала от времени для различных объемов ТМБ: 100 мкл (А), 400 мкл (Б).

3.2.2.3. Оптимизация метода ИФиА ПГ с ферментной меткой

При проведении ИФиА в выбранных условиях наблюдается довольно высокий неравномерный фоновый сигнал, что существенно осложняет как инструментальную, так и визуальную оценку результата. Для устранения данной проблемы, при создании подобных тест-систем после иммобилизации антител, аналитическую мембрану, как правило, обрабатывают раствором белка. Белок в данном случае помогает устранить неспецифическое связывание реагентов на мембране. По литературным данным в качестве таких растворов применяют 1% раствор казеина в ФБС, 2% раствор БСА в ФБС, а также смесь 1% казеина и 1% БСА в ФБС и т.д [87-90]. Было проведено сравнение использования в анализе наиболее часто используемых растворов для обработки мембраны. На Рис. 57 показано, что приведенные калибровочные зависимости практически не отличаются друг от друга. Таким образом, в данной работе аналитическую мембрану обрабатывали 1% раствором казеина в ФБС.

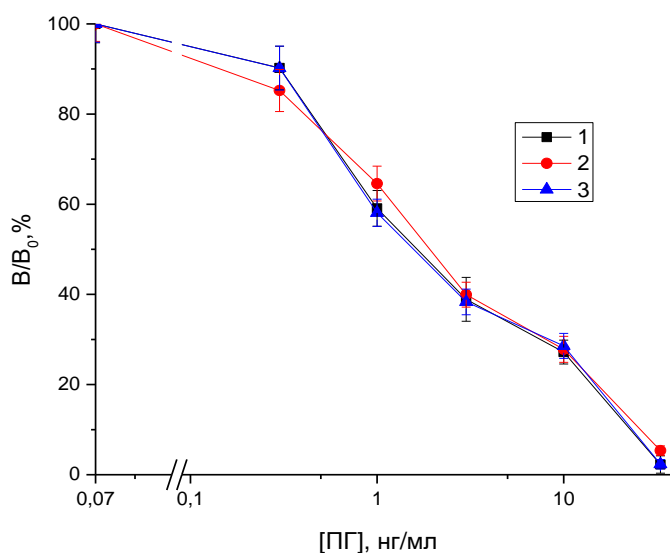
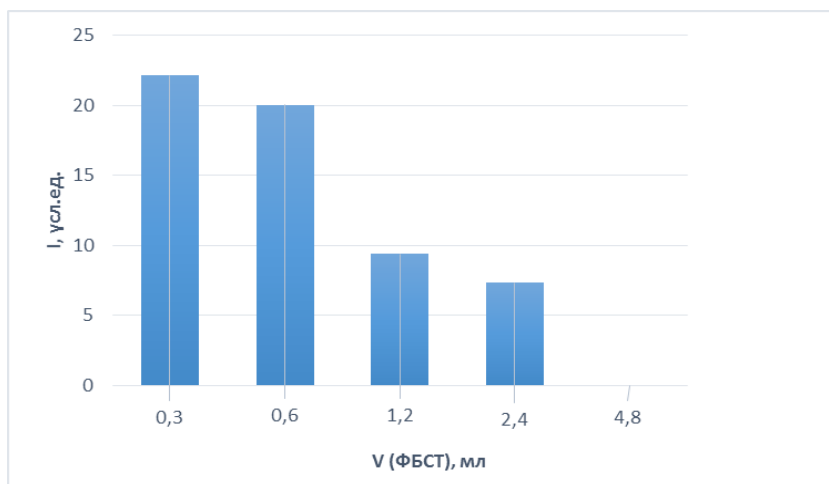


Рис. 57. Калибровочные зависимости ИФиА ПГ при использовании для обработки аналитической мембраны растворов ФБС, содержащих: 1 - 1% казеина; 2 – 2% БСА; 3 – 1% казеина+1% БСА.

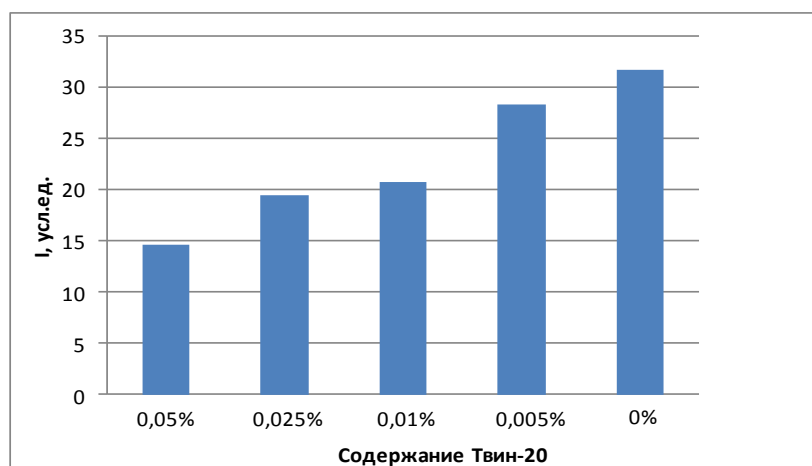
Одним из основных отличий метода ИФиА от метода ЛПИФА является наличие стадий промывки мембраны от несвязавшихся реагентов. При проведении ЛПИФА данная стадия может только усложнить процедуру проведения анализа, и она не совсем удобна при использовании тест-полосок. При проведении ИФиА все реагенты в определенном порядке наносятся в тестовое окно кассеты, поэтому в данном случае присутствие стадий промывки уместно и необходимо. Это позволяет снизить фоновый сигнал, посредством удаления несвязавшегося конъюгата ПГ-ПХ. Также при проведении анализа на реальных образцах, промывание мембраны позволяет удалить с поверхности мембраны компоненты образца, которые могут помешать при дальнейшем проведении анализа и затруднить получение визуального результата.

При проведении стадии промывания мембраны от несвязавшихся реагентов, важным является правильный выбор раствора, а также объема данного раствора, поскольку образование комплекса антиген-антитело является обратимым процессом. В качестве растворов для промывания мембран в данном виде анализа чаще всего применяют ФБСТ, ФБС. На Рис. 58А показано, что при использовании ФБСТ в качестве промывочного раствора в объемах более 500 мкл приводит к диссоциации образовавшегося комплекса антиген – антитело. В случае использования для промывания мембраны от несвязавшихся реагентов дистиллированной водой или раствор ФБС, диссоциации комплекса не наблюдается при использовании любого

объема раствора. На Рис.58Б показано, что увеличение детергента в системе приводит к диссоциации комплекса антиген-антитело при использовании критического объема промывочного раствора ~2,5 мл.



(А)



(Б)

Рис. 58. Влияние пропускаемого объема ФБСТ (А) и концентрации Твин-20 в промывочном растворе на интенсивность сигнала тестовой зоны в ИФиА ПГ (Б).

Также было изучено влияние стадии промывания аналитической мембраны на чувствительность анализа и на интенсивность аналитического сигнала (Рис.59). Для этого на аналитическую мембрану после нанесения смеси конъюгата ПГ-ПХ и раствора ПГ, на мембрану добавляли 100 мкл промывочного раствора. Было показано, что при промывании мембраны как раствором ФБС, так и ФБСТ наблюдается незначительное снижение аналитического сигнала (~20%) при концентрациях ПГ < 4 нг/мл. При этом необходимая для четкой визуализации сигнала низкая интенсивность тестовой зоны в области концентраций больше 10 нг/мл сохраняется.

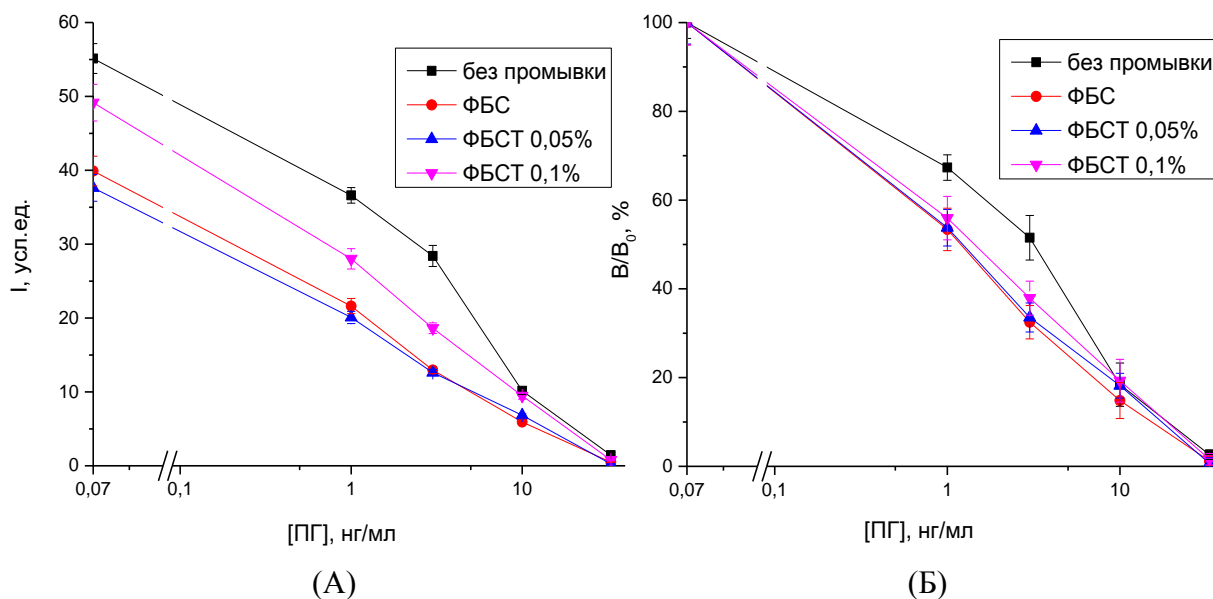


Рис. 59. Зависимость интенсивности аналитического сигнала от концентрации ПГ при разных условиях промывки мембраны в абсолютных (А) и относительных единицах (Б).

3.2.2.4. Выбор аналитической мембраны

В качестве аналитической мембраны в ИФиА, как правило, используют специальные пористые мембраны различной химической природы: нитроцеллюлозные, нейлоновые, стекловолоконные и т.д. Мембраны должны обладать следующими свойствами: возможностью прочной количественной иммобилизации специфических антител в тестовых зонах, сохраняющих способность эффективно связывать иммунореагенты, хорошими гидродинамическими и эксплуатационными свойствами (например, механической прочностью или устойчивостью к разрыву в процессе пропускания реагентов), отсутствием неспецифической сорбции меченых реагентов и низким фоновым сигналом при проведении ферментативной реакции. Помимо природы материала, из которого изготовлены мембраны, ключевой характеристикой для анализа является размер пор мембран. При увеличении размера пор, увеличивается скорость потока реагентов, а, следовательно, время взаимодействия реакционных компонентов уменьшается, что может переводить анализ в кинетический режим и оказывать существенное влияние на его чувствительность. Как уже отмечалось выше, в работе были исследованы нитроцеллюлозные мембраны и нейлоновые мембраны. Последние показали низкую воспроизводимость результатов, поэтому далее в работе не

рассматривались. Используемые нитроцеллюлозные мембраны отличались размером пор (0,45 мкм и 0,8 мкм) (Таблица 11).

Таблица 11. Виды и свойства коммерческих иммунофильтрационных мембран фирмы MDI (Индия).

№	Название мембраны	Состав	Размер пор
1	CNJ-X1	Нитроцеллюлоза	0,45 мкм
2	CLW-040-SH34	Нитроцеллюлоза, нанесенная на абсорбционную мембрану	0,45 мкм
3	CLW-040-SH34	Нитроцеллюлоза, нанесенная на абсорбционную мембрану	0,8 мкм

Кроме того, мембрана CLW-040-SH34 отличается от мембраны CNJ-X1 тем, что слой нитроцеллюлозы нанесен непосредственно на слой впитывающей мембраны. Для каждой из рассматриваемых мембран были получены зависимости интенсивности аналитического сигнала от концентрации ПГ (Рис.60). Наилучшими характеристиками обладает мембрана CLW-040-SH34 с размером пор 0,45 мкм (Рис. 60, мембрана №2). По-видимому, за счет более плотного прилегания аналитической мембраны к сорбенту обеспечивается более равномерный поток реагентов и уменьшается время проведения анализа.

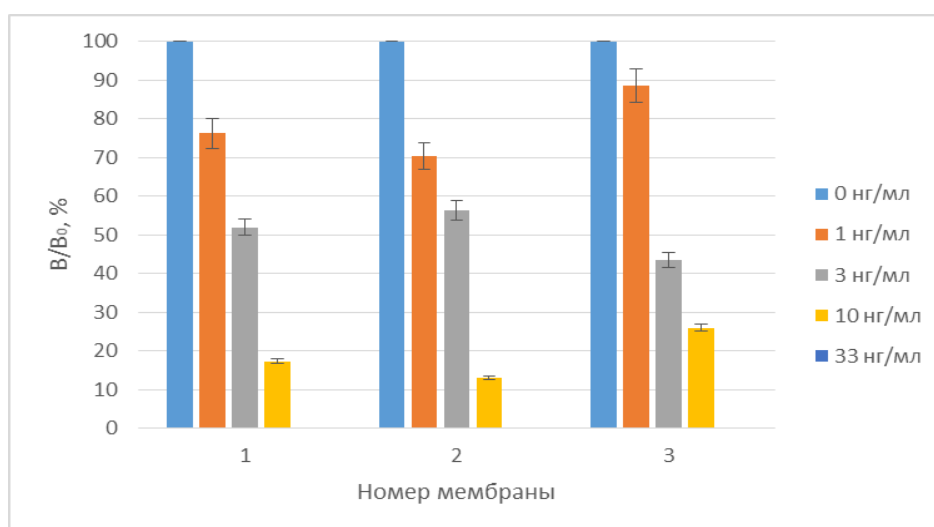


Рис. 60. Зависимость относительной интенсивности аналитического сигнала ИФиА от концентрации ПГ для разных аналитических мембран (1- мембрана CNJ-X1, 2 - CLW-040-SH34, 3 - CLW-040-SH34).

3.2.2.5. Влияние содержания белков в образце на проведение анализа

Поскольку анализируемый образец – молоко – содержит в своем составе около 4 % белков [115], было исследовано, какое влияние оказывает присутствие белков в буферной системе на интенсивность сигнала, а также на чувствительность анализа. В качестве модельного белка рассматривали БСА. На представленной диаграмме (Рис.61А) видно, что добавление белка приводит к снижению абсолютной интенсивности регистрируемого сигнала при концентрации ПГ - 3 нг/мл, при этом, практически не влияя на значение интенсивности при концентрации ПГ - 0 нг/мл. Исходя из анализа зависимости в относительных единицах, в случае отсутствия белка наблюдается большая разница в процентах ингибирования для концентраций 3 нг/мл и 10 нг/мл, что способствует однозначному визуальному определению. Таким образом, добавление различных концентраций БСА в рабочий буфер не оказывает значительного влияния на проведение анализа.

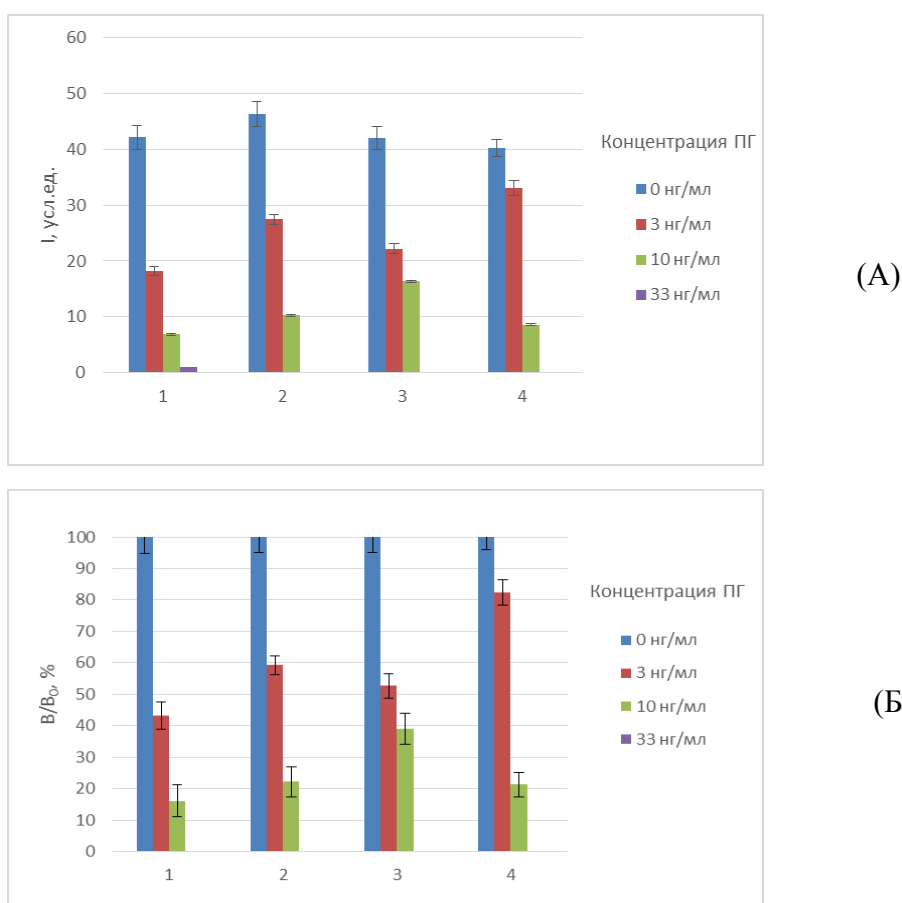


Рис. 61. Зависимость интенсивности аналитического сигнала от концентрации ПГ для содержания БСА в буферном растворе: 1 – 5%; 2 – 2,5%; 3 – 1%; 4 – 0% в абсолютных (А) и относительных единицах (Б).

В результате проведенной оптимизации был разработан метод ИФиА для определения ПГ в буферном растворе. Анализ проводится следующим образом: на аналитическую мембрану добавляют смесь 10 мкл конъюгата ПГ-ПХ и 120 мкл образца, после прохождения раствора сквозь мембрану добавляют 100 мкл промывочного буфера. На следующей стадии добавляют 400 мкл субстратного раствора и через 5 минут регистрируют визуальный результат. Предел обнаружения метода составил 0,4 нг/мл время анализа 15 минут. На Рис.62 представлена полученная калибровочная зависимость, из которой видно, что для концентрации ПГ более 7 нг/мл наблюдается минимальная величина аналитического сигнала, что позволяет применять данный метод для быстрого визуального анализа ПГ с целью раннего выявления стельности коров.

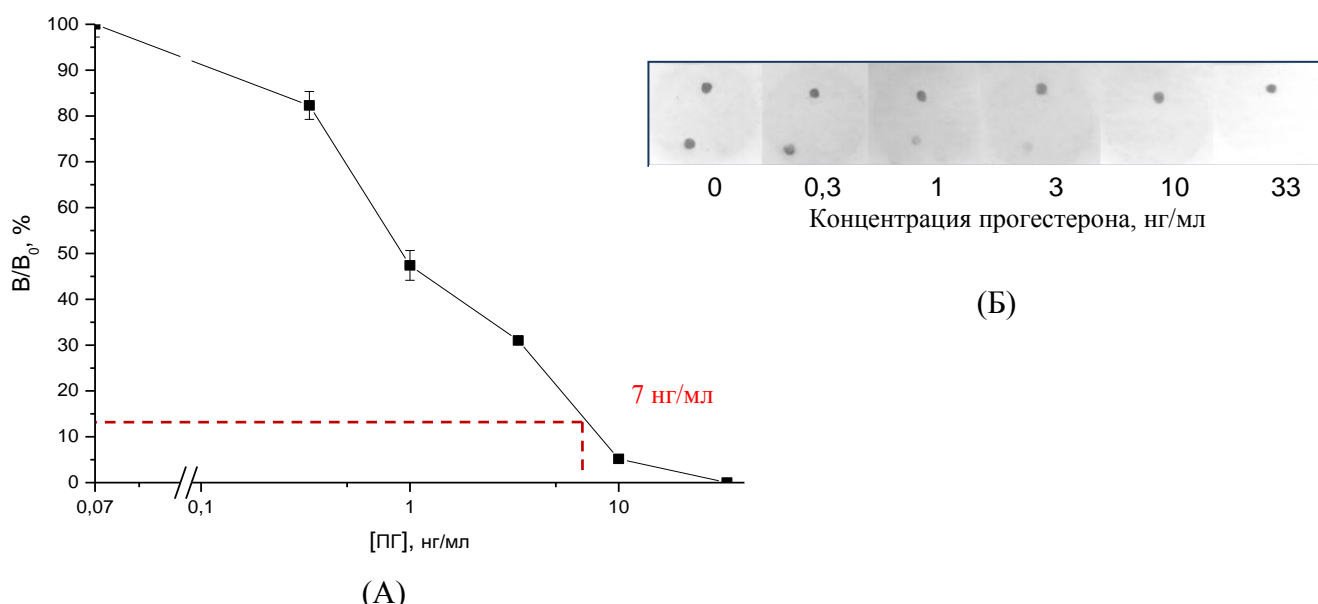


Рис. 62. Калибровочная зависимость для определения ПГ методом ИФиА (А) и ее визуальный результат в диапазоне концентраций ПГ от 0 до 33 нг/мл.

3.2.2.6. Апробация ИФиА ПГ на реальных образцах молока

Для определения концентрации ПГ в цельном коровьем молоке были оптимизированы условия пробоподготовки образца цельного молока. При анализе реальных образцов молока одной из основных проблем метода ИФиА является прохождение образца сквозь мембрану. Молочный жир в свежесвыдоенном молоке находится в состоянии эмульсии. Диаметр жировых шариков основной массы молока составляет от 0,5 до 10 мкм [201]. В данном случае скорость прохождения цельного молока через мембрану низкая (100 мкл молока в час), т.е. проведение анализа в экспресс-варианте в таком случае не предоставляется возможным. Для решения данной

проблемы используют различные подходы: разбавление образца, если позволяет чувствительность метода, использование префильтров [74, 76, 88], позволяющих отделить наиболее крупные компоненты образца, а также вакуумных насосов [80]. В работе было исследовано несколько разведений образца. При выборе разведения главным критерием являлось сохранение чувствительности анализа при высокой скорости прохождения образца сквозь мембрану. Оптимальным разведением образца было выбрано разведение в 4 раза, которое не оказывает негативного влияния на чувствительность анализа.

Поскольку около 80% ПГ содержится в жировой фракции молока [114, 115], для получения достоверного результата по содержанию ПГ в молоке, необходимо повысить доступность свободного ПГ для специфического взаимодействия с антителами в водной фазе. При проведении ИФиА для определения уровня ПГ в цельных образцах коровьего молока наблюдался заниженный уровень ПГ в образцах, по сравнению с данными, полученными методом ИФА. Из литературных данных известно, что для экстракции ПГ из жировой фазы применяют методику с использованием органических растворителей, например, метанола [146, 162]. Для изучения влияния метанола на проведение анализа был проведен ряд экспериментов. Первоначально был определен минимальный диапазон концентраций метанола, не оказывающий влияния на проведение анализа в отсутствие ПГ в системе. Для этого в рабочий буфер добавляли метанол в процентном содержании от 0 до 80%. На Рис.63 представленная диаграмма показывает, что при содержании метанола в рабочем буфере более 20% наблюдается резкое падение аналитического сигнала.

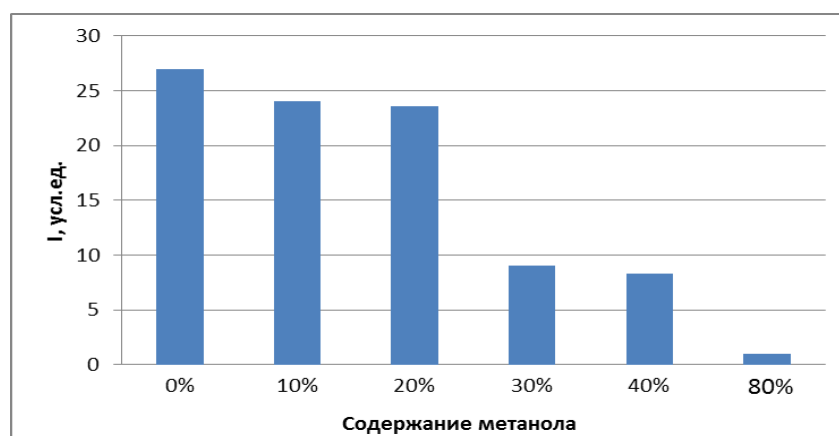


Рис. 63. Зависимость интенсивности ИФиА ПГ от содержания метанола в рабочем буфере.

В этой связи для выбора оптимальной концентрации метанола, были получены калибровочные зависимости при варьировании концентрации метанола в диапазоне от 10% до 20% в рабочем буфере (Рис.64). При содержании метанола 20% в рабочем буфере наблюдается резкое снижение чувствительности анализа в области концентраций более 3 нг/мл. В таком случае проводить визуальную оценку результата в области концентрации 7 нг/мл становится затруднительным. Было показано, что содержание метанола порядка 10% в образце не оказывает существенного влияния на анализ и позволяет проводить точное определение уровня ПГ в цельном молоке коров. Таким образом, при проведении анализа образец молока разбавляли в 4 раза раствором ФБСТ, содержащим 10% метанола.

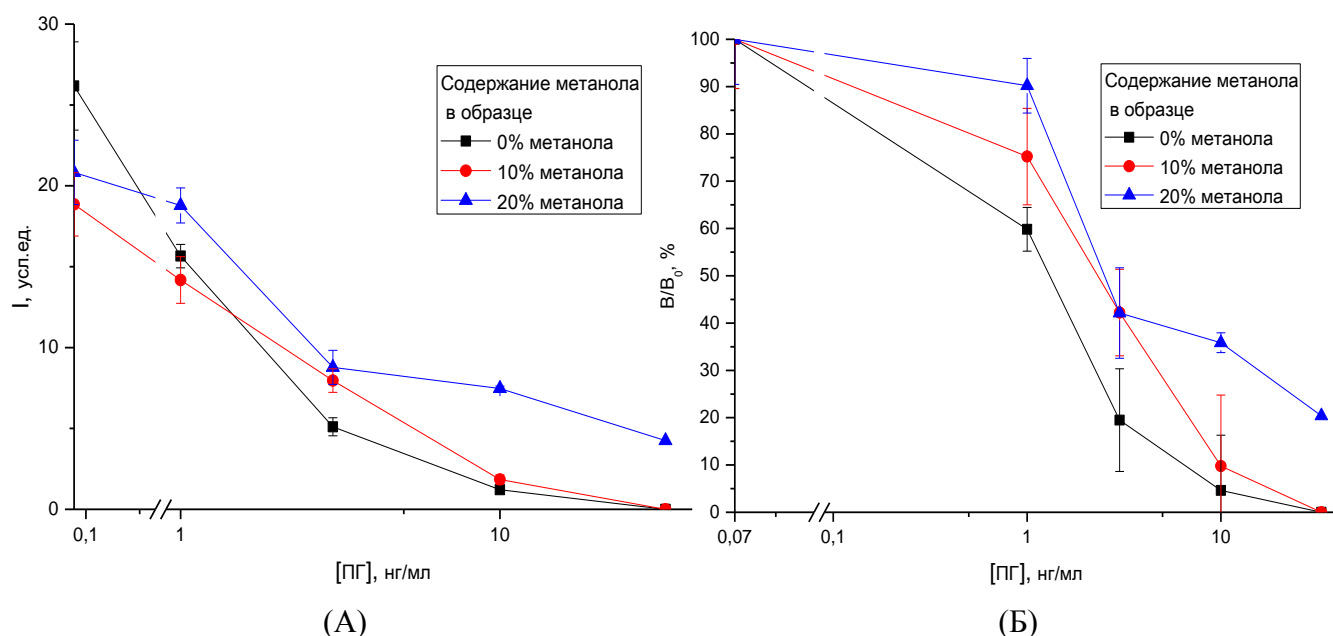


Рис. 64. Калибровочные зависимости ИФиА ПГ при разном содержании метанола в рабочем буфере в абсолютных (А) и относительных (Б) единицах.

3.2.2.7. Сравнение метода ИФиА ПГ с традиционным методом ИФА

Методом ИФиА было исследовано содержание ПГ в 38 образцах цельного молока. Образцы были отобраны как у стельных коров, так и нестельных на разных фазах полового цикла. При высоком содержании ПГ в образце (стельные коровы или нестельные коровы в середине полового цикла) наблюдалось наличие только одной окрашенной точки в контрольной зоне, а при низком содержании ПГ (нестельные животные) - две точки в тестовой и контрольных зонах (Рис.65).

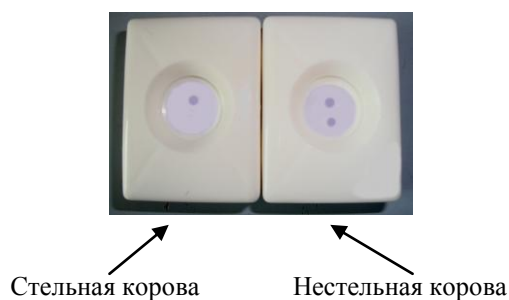


Рис. 65. Визуальное представление результата теста для стельной и нестельной коровы.

В процессе анализов было выявлено 39,5 % образцов с высоким содержанием ПГ в пробе (более 7 нг/мл) и 60,5% с низким содержанием ПГ. Эффективность разработанного экспресс-теста для количественного определения ПГ в цельном молоке коров была подтверждена сравнением с высокочувствительным методом ИФА. Ввиду того, что диапазон определяемых в ИФиА концентраций ПГ составляет от 0,5 до 11 нг/мл, при построении корреляционной зависимости не учитывались образцы с содержанием ПГ выше 11 нг/мл. Было показано, что полученные данные хорошо коррелируют друг с другом (Рис. 66). Это позволяет применять разработанный метод ИФиА не только для полуколичественной оценки содержания ПГ в молоке, но и для количественного определения ПГ.

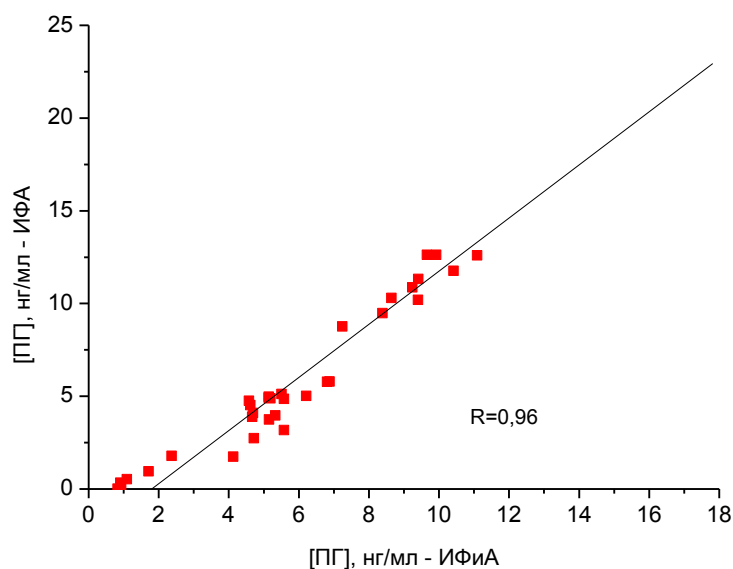


Рис. 66. Корреляция методов ИФиА и ИФА.

3.2.2.8. Сравнение метода ИФиА с ферментной меткой с методами ЛПИФА и ИФА

В результате проделанной работы разработаны экспресс-тесты на основе методов ЛПИФА и ИФиА. На Рис. 67 представлены калибровочные зависимости для трех иммуферментных методов определения ПГ.

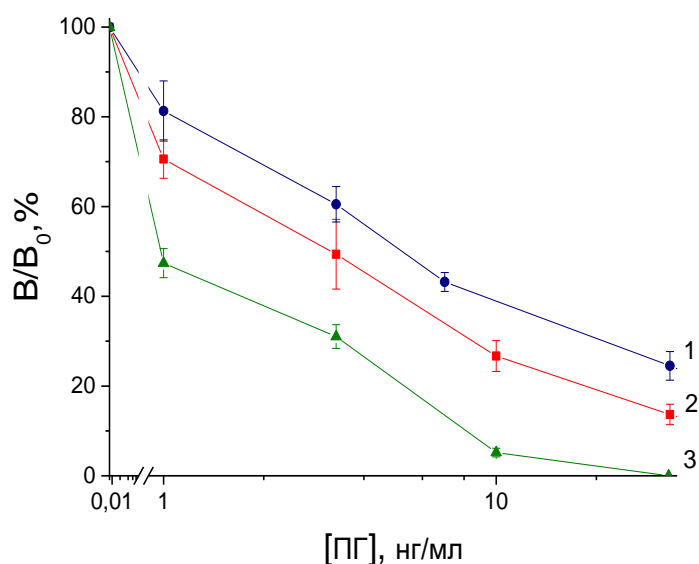


Рис. 67. Сравнение иммуферментных методов анализа ПГ: 1 – ЛПИФА, 2 – ИФА, 3 – ИФиА.

Основными преимуществами разработанных тест-систем является быстрота проведения анализа от 10 до 20 минут, также высокая чувствительность анализа, сравнимая с высокочувствительным методом ИФА. В таблице 12 приведены основные характеристики используемых ферментативных методов анализа ПГ. Для информации приведены также концентрации антител, используемые при приготовлении тест-систем. Таблица 12. Сравнение методов определения ПГ.

Метод анализа ПГ	Концентрация антител, мкг/мл	Концентрация конъюгата, нг/мл	Диапазон определяемых концентраций ПГ, нг/мл	Время проведения анализа
ИФА	0,4	13	0,5-20	1,5 часа
ЛПИФА	15,2	4,3	2-40	15-20 мин
ИФиА	9	26	0,5-11	10-15 мин

Метод ЛПИФА работает в широком диапазоне концентраций ПГ (2-40 нг/мл), что позволяет применять данный метод как для количественной оценки уровня ПГ, а и для полуколичественной. Метод ИФиА в отличие от метода ИФА и ЛПИФА работает в узком диапазоне концентраций (0,5-11 нг/мл), что позволяет проводить более точную визуальную интерпретацию результата (Таблица12). Поэтому применение данного метода предпочтительно для полуколичественного анализа по принципу «да-нет».

Высокая чувствительность разработанных тест-систем с использованием ферментной метки обусловлена в первую очередь возможностью использования низкой концентрацией антител, иммобилизованных в тестовой зоне. Концентрации антител, используемые для ИФиА с ферментной меткой и для ЛПИФА ~ в 10 раз ниже, чем концентрации антител, используемые при разработке тех же систем с коллоидным золотом в качестве метки. А низкие концентрации антител являются одним из основных условий конкурентной схемы проведения анализа. Также одним из факторов влияющим на чувствительность анализа в данном случае является концентрация используемой метки и ПГ на ее поверхности. При проведении анализа с ферментной меткой концентрация метки значительно ниже, чем в случае использования метки коллоидного золота.

Разработанные тест-системы показывают высокую эффективность при определении уровня ПГ в цельном молоке коров для определения стельности. Методами ЛПИФА и ИФиА с ферментной меткой анализ можно проводить непосредственно в молочных хозяйствах. Для проведения анализа с использованием разработанных экспресс-тестов не требуется специального оборудования, а также пробоподготовка.

ВЫВОДЫ

1. Рассмотрены основные конкурентные схемы создания быстрых проточных тест-систем на основе ЛПИА и ИФиА низкомолекулярных веществ на примере гормона ПГ с использованием золотых наночастиц в качестве метки. Установлено, что использование золотых наночастиц в качестве метки в данных экспресс-методах не позволяет определять уровень ПГ в физиологическом диапазоне концентраций для целей ветеринарной диагностики.
2. Для определения ПГ в ЛПИА и ИФиА предложено в качестве визуальной метки использовать ПХ. Показано, что применение в качестве маркера ПХ в конкурентной схеме позволяет снизить предел обнаружения ПГ более, чем в 10 раз по сравнению с тест-системами на основе коллоидного золота, и достигнуть рабочего диапазона измерения физиологических концентраций ПГ в цельном молоке, необходимого для раннего определения стельности коров. Определены количественные характеристики и условия регистрации ферментной метки в тестовой зоне разрабатываемых тест-систем ЛПИА и ИФиА, рассмотрено влияние структуры и компоновки пористых мембранных компонентов на аналитические характеристики.
3. Разработан метод ЛПИФА для инструментального фотометрического количественного определения ПГ. Предел обнаружения составил 1 нг/мл, рабочий диапазон определяемых концентраций 1 - 40 нг/мл, время проведения одного анализа – 20 мин. Тест-система ЛПИФА апробирована на образцах цельного коровьего молока для определения уровня ПГ в физиологическом диапазоне концентраций, необходимых для раннего выявления стельности. Показана высокая степень соответствия полученных результатов с данными ИФА (коэффициент корреляции 0,97), а также с ректальным методом исследования. При этом чувствительность разработанной тест-системы составила 84%, а специфичность - 100%.
4. Разработан новый высокочувствительный экспресс-тест на основе метода ИФиА с использованием фермента - ПХ в качестве метки - для количественного и полуколичественного определения уровня ПГ в цельном молоке коров. Предел обнаружения составил 0,4 нг/мл. Показана высокая степень соответствия результатов, полученных методами ИФиА и ИФА (коэффициент корреляции 0,96). Достигнутый рабочий диапазон определяемых концентраций ПГ позволяет

проводить точную визуальную оценку нестельных коров по принципу "да-нет" без использования инструментальных средств регистрации сигнала в полевых условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ching K. Lateral Flow Immunoassay // *Methods in Molecular Biology. ELISA: Methods and Protocols.* - Editors: Robert Hnasko. – 2015. – V.1318. – P.127-137.
2. Quesada-Gonzalez D., Merkoci A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2015. – V.73. – P. 47-63.
3. Таранова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.. Иммунохимические тест-системы для внелабораторной диагностики // *Иммунология.* – 2014. – Т. 15. – С. 540-564.
4. Leuvering J., Thal P., Van der Waart M., Schuurs A. Sol particle immunoassay // *Journal of immunoassay and immunochemistry.* – 1980. – V. 1. – P. 77–91.
5. Amerongen A., Wichers J., Berendsen L., Timmermans A., Keizer G., Doorn A., Bantjes A., Gelder W // *Journal of Biotechnology.* – 1993. – V. 30. – P. 185–195.
6. Dzantiev B., Byzova N., Urusov A., Zherdev A. Immunochromatographic methods in food analysis // *Trends in analytical chemistry.* – 2014. – V. 55. – P. 81-93.
7. Huang X., Aguilar Z., Xu H. Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2016. – V. 75. – P. 166-180.
8. Wong R., Harley Y.T. (Eds) *Lateral flow immunoassay.* New York: Humana Press. – 2009. – 223 p.
9. Posthuma-Trumpie G., Korf J. Amerongen A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey // *Anal Bioanal Chem.* – 2009. – V. 393. – P. 569-582.
10. Xu Y., Liu Y., Wu Y. Fluorescent probe-based lateral flow assay for multiplex nucleic acid detection // *Analytical Chemistry.* – 2014. – V.86. – P. 5611-5614.
11. Van Dam G., Witchers J., Ferreira T., Ghati D. Van Amerongen A., Deelder A. Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2004. – V.42. – P. 5458-5461.
12. Lonnberg M., Carlsson J. Quantitative detection in the attomole range for immunochromatographic tests by means of a flatbed scanner // *Analytical Biochemistry.* – 2001. – V. 293. – P. 224-231.
13. Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Sveshnikov P.G., Dzantiev B.B. Pretreatment free immunochromatographic assay for the detection of streptomycin

- and its application to the control of milk and dairy products // *Analytica Chimica Acta*. – 2011. – V. 701. – P. 209-217.
14. Fridley G., Holstein C., Oza S., Yager P. The evolution of nitrocellulose as a material for bioassays // *MRS Bulletin*. – 2013. – V. 38. – P. 326-330.
 15. Buechler K., Moi S., Noar B., McGrath D., Villela J. Simultaneous detection of seven drugs of abuse by the Triage panel for drugs of abuse // *Clinical Chemistry*. – 1992. – V. 38. – P. 1678-1684.
 16. Edwards K., Baeumner A. Liposomes in analyses // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2006. – V. 386. – P. 1335-1343.
 17. Fernandez-Sanchez C., McNeil C., Rawson K., Nilsson O., Leung H. One-step immunostrip test for the simultaneous detection of free and total prostate specific antigen in serum // *Journal of Immunological Methods*. – 2005. – V. 307. – P. 1-12.
 18. Henderson K., Stewart J. Factors influencing the measurement of oestrone sulphate by dipstick particle capture immunoassay // *Journal of Immunological Methods*. – 2002. – V. 270. – P. 77-84.
 19. Parolo C., Medina-Sanchez M., Escosura-Muniz A., Merkoci A. Simple paper architecture modifications lead to enhanced sensitivity in nanoparticle based lateral flow immunoassay // *Lab on chip*. - 2013. - V.13. - N.3. - P.386-390.
 20. Jones K. Troubleshooting protein binding in nitrocellulose membranes [Электронный ресурс] // *IVD Technology*. - 1999. URL:<http://www.ivdtechnology.com/article/troubleshooting-protein-binding-nitrocellulose-membranes>
 21. Millipore Corp. Rapid lateral flow test strips: consideration for product development. [Электронный ресурс]// 2013. URL: <http://www.millipore.com/techpublications/tech1/tb500en00>
 22. Mansfield M. The use of nitrocellulose membranes in lateral flow assays // New York: Humana Press. – 2005. – P. 71-85.
 23. Beer H., Jallerat E., Pflanz K, Klewitz T. Qualification of cellulose nitrate membranes for lateral flow immunoassay [Электронный ресурс]// *IVD Technology*. - 2002. URL:<http://www.ivdtechnology.com/article/qualification-cellulose-nitrate-membranes-lateral-flow-assays>

24. Ahmad A., Low S., Shukor S., Fernando W., Ismail A.. Hindered diffusion in lateral flow nitrocellulose membrane: Experimental and modeling studies // *Journal of Membrane Science*. – 2010. – V. 357. – P. 178–184
25. Qian S., Bau H. A mathematical model of lateral flow bioreactions applied to sandwich assay // *Analytical Biochemistry*. – 2003. – V. 322. – P. 89-98.
26. Posthuma-Trumpie G., Korf J., Van Amerongen A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey // *Anal Bioanal Chem*. – 2009. – N. 393. – P. 569–582.
27. Marks R., Cullen D., Karube I., Lowe C., Weetall H. *Handbook of Biosensors and Biochips* // John Wiley & Sons, Ltd. – 2007. – 301 p.
28. Madison R., Maklins J. Latex nanospheres delivery systems // *Brain. RES.* – 1990. – V. 7. – N. 3. – P. 187 – 192.
29. Букреева Т.В., Парахонский Б.В., Марченко И.В. Полиэлектrolитные микрокапсулы с наночастицами серебра и золота в составе оболочки, полученный на ядрах карбоната кальция и полистирола // *Российские нанотехнологии*. – 2008. – Т. 3. – В. 1-2. – С. 89-96.
30. Faulk W.P., Taylor G.M. An immunocolloid method for the electron microscope // *Immunochemistry*. – 1971. – V.8. – P. 1081-1083.
31. Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А., Дыкман Л.Г., Хлебцов Б.Н. Золотые наноструктуры с плазмонным резонансом для биомедицинских исследований // *Российские нанотехнологии. Нанообзоры*. – 2007. – Т. 2. - № 3-4. – С. 69-86.
32. Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А., Дыкман Л.Г., Хлебцов Б.Н. Плазмонно-резонансные наночастицы для биодиагностики и медицины // *Нанотехника*. - 2007. - №2. – С.77-80.
33. Дыкман Л.Г., Богатырев В.А. Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии // *Успехи химии*. – 2007. – Т. 76. - №2. – С.199-213.
34. Дыкман Л.А., Богатырев В.А. Коллоидное золото в твердофазных методах анализа // *Биохимия*. - 1997. - Т. 62. - № 4. - С. 411-418.
35. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Nature Phys. Sci.* – 1973. – V. 241. – P. 20-22.

36. Turkevich J. Colloidal gold. Part I. Historical and preparative aspects: morphology and structure // *Gold Bull.* – 1985. – V. 18. – P. 86-91.
37. Mirkin C. Programming the assembly of two- and three-dimensional architectures with DNA and nanoscale inorganic building blocks // *Inorg. Chem.* - 2000. – V. 39. – P. 2258-2272.
38. Хлебцов Н.Г. и др. Оптические свойства коллоидного золота и его конъюгатов с биоспецифическими макромолекулами // *Коллоидный журнал.*- 1995. – Т. 57. - №3. – С. 412-423.
39. De Mey J., Moeremans M. The preparation of colloidal gold probes and their use as marker in electron microscopy // *Advanced techniques in biological electron microscopy.* – 1986. – V.3. –P. 229-271.
40. Khlebtsov N.G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from extinction spectra // *Anal.Chem.* – 2008. – V. 80. – P. 6620-6625.
41. Khreich N., Lamourette P., Boutal H., Devilliers K., Creminon C., Volland H. Detection of Staphylococcus enterotoxin B using fluorescent immunoliposomes as label for immunochromatographic testing // *Anal. Biochem.* – 2008. – V. 337. – P. 182-188.
42. Xie Q., Wu Y., Xiong Q., Xu H., Xiong Y., Liu K. Advantages of fluorescent microspheres compared with colloidal gold as a label in immunochromatographic lateral flow assays // *Biosens. Bioelectron.* – 2014. – V. 54. – P. 262-265.
43. Murphy C., Coffey J. QuantumDots: A Primer // *Appl.Spectrosc.* – 2002. – V.56. - N.1. – P.16-26.
44. Xing Y., Rao J. Quantum dot bioconjugates for in vitro diagnostics and in vivo imaging // *Cancer Biomarker* – 2008. – V.4. – P.307–319
45. Осипов А.П., Самсонова Ж.В., Кондаков С.Э. Наночастицы металлов как новый класс меток в быстрых методах иммуноанализа // *Вестник Московского Университета.* – 2015. – Т. 56. – N 3. – С.164-174.
46. Hines M.A., Guyot-Sionnest P. J. Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-Capped CdSe nanocrystals // *J.Phys.Chem.* – 1996. – V. 100. – P. 468-471
47. Zhexiang Z., Du D., Wang J., Smith J., Timchalk C., Li Y. Lin Y. Quantum dot-based immunochromatographic fluorescent biosensor for biomonitoring trichloropyridinol, a biomarker of exposure to chlorpyrifos // *Anal. Chem.* – 2010. – V.82. – P. 5125.

48. Bai Y., Tian C., Wei X., Wang Y., Wanga D., Shi X. A sensitive lateral flow test strip based on silica nanoparticle/CdTe quantum dot composite reporter probes // *RSC Advances*. – 2012. – V. 2. – P. 1778
49. Taranova N.A., Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. “Traffic Light” immunochromatographic test based on multicolor quantum dots for the simultaneous detection of several antibiotics in milk // *Biosens. Bioelectron.* – 2014. – V.63. – P. 255-261.
50. Губин С.П., Кокшаров Ю.А., Хомутов Г.Б., Юрков Г.Ю. Магнитные наночастицы: методы получения, строение и свойства // *Успехи химии*. – 2005. – Т.74. – С. 539-574.
51. LaBorde R., O'Farrell B. Paramagnetic particle detection in lateral-flow assays // *IVD Technology*. – 2002. – V. 8. – N. 3. – P.36–41.
52. Srinivasan B., Li Y.P., Jing Y., Xu Y., Yao X., Xing C., Wang J.P. A Detection System Based on Giant Magnetoresistive Sensors and High-Moment Magnetic Nanoparticles Demonstrates Zeptomole Sensitivity: Potential for Personalized Medicine // *Angew. Chem.* – 2009. – V. 48. – N 15. – P. 2764
53. Orlov A.V., Khodakova J.A., Nikitin M.P., Shepelyakovskaya A.O., Brovko F.A., Laman A.G., Grishin E.V., Nikitin P.I. Magnetic Immunoassay for Detection of Staphylococcal Toxins in Complex Media // *Anal. Chem.* – 2013. – V. 85. – P. 1154
54. Giraudi G., Baggiani C., Giovannoli C. Inaccuracy of the Bradford method for the determination of protein concentration in steroid-horseradish peroxidase conjugates // *Analitica Chimica Acta*. – 1997. – V. 337. – P. 93-97.
55. Cho J., Han S., Paek E., Cho I., Paek S.. Plastic ELISA-on-a-Chip based on sequential cross-flow chromatography // *Analytical Chemistry*. – 2006. – V. 78. – N.3. P. 793-800.
56. Han S., Cho J., Cho I., Paek E. Plastic enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)-on-a-chip biosensor for botulinum neurotoxin A // *Analitica Chimica Acta*. – 2007. – V. 587. – P. 1-8.
57. Cho I., Paek E., Kim Y., Kim J., Paek S. Chemiluminometric enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)-on-a-chip biosensor based on cross-flow chromatography // *Analitica Chimica Acta*. – 2009. – V. 632. – P.247-255.

58. Watanabe H., Satake A., Kido Y. Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices // *The analyst*. – 2002. – V. 127. – P. 98-103.
59. Giraudi G., Baggiani C., Giovannoli C. Inaccuracy of the Bradford method for the determination of protein concentration in steroid-horseradish peroxidase conjugates // *Analitica Chimica Acta*. – 1997. – V. 337. – P. 93-97.
60. Parolo C., Escosura-Muñiz A., Merkoçi A. Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2013. – V.40. – P. 412-416.
61. Lonnberg M., Drevin M., Carlsson J. Ultra-sensitive immunochromatographic assay for quantitative determination of erythropoietin // *Journal of Immunological Methods*. – 2008. – V.339. – P. 236-244.
62. Aldus C., Van Amerongen A., Ariens R., Peck M., Wichers J., Wyatt G. Principles of some novel rapid dipstick methods for detection and characterization of verotoxigenic *Escherichia coli* // *J.Appl.Microbiol.* – 2003. – V. 95. – P. 380-389.
63. Blazkova M., Javurkova B., Fukal L., Rauch P. Immunochromatographic strip test for detection of genus *Cronobacter* // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2011. – V.26. – P. 2828-2834.
64. Noguera P., Posthuma-Trumpie G., Van Tuil M., Van der Wal F., De Boer A. Carbon nanoparticles in lateral flow methods to detect genes encoding virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2011. – V.339. – P.831-838.
65. Holubova-Miekova B., Blazkova M., Fukal L., Rauch P. Development of colloidal carbon-based immunochromatographic strip for rapid detection of carbaryl in fruit juices // *Eur. Food Res. Technol.* – 2010. – V. 231. – P. 467-473.
66. Qui W., Xu H., Takalkar S., Gurung A., Liu B., Zheng Y. Carbon nanotube-based lateral flow biosensor for sensitive and rapid detection of DNA sequence // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2015. – V. 64. – P. 367-372.
67. Morais S., Maquieira A., Puchades R. Selection and characterization of membranes by means of an immunofiltration assay. Application to the rapid and sensitive determination of the insecticide carbaryl // *Journal of immunological methods*. – 1999. – V.224. – P.101-109.

68. Valkirs G., Owen N., Levinson P. Method and apparatus for immunoassays. United States Patent. – 1984. № 4. 632. 901.
69. Rapak A., Szewczuk A. Semiquantitative assay of human chorionic gonadotropin by a simple and fast immunofiltration technique // *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* – 1993. - V. 31. – P. 153-157.
70. Turiel E., Fernandez P., Perez-Conde C., Gutierrez A., Camara C. Flow-through fluorescence immunosensor for atrazine determination // *Talanta.* – 1998. – V.47. – P.1255-1261.
71. Wang S., Zhang C., Zhang Y. Development of a flow-through enzyme-linked immunosorbent assay and a dipstick assay for the rapid detection of the insecticide carbaryl // *Analytica Chimica Acta.* – 2005. – V. 535. – P..219-225.
72. Schneider E., Usleber E., Martbauer E. Rapid detection of fumonisin B1 in corn-based food by competitive direct dipstick enzyme immunoassay/enzyme-linked immunofiltration assay with integrated negative control reaction // *J. Agric. Food Chem.* – 1995. – V. 43. – P. 2548-2552.
73. Badea M., Micheli L., Messia M., Candigliota T., Marconi M. Aflatoxin M1 determination in raw milk using a flow-injection immunoassay system // *Analytica Chimica Acta.* – 2004. – V.520. – P.141-148.
74. Sibanda L., Saeger S., Barna-Vetro I., Peteghem C. Development of a solid-phase cleanup and portable rapid flow-through enzyme immunoassay for the detection of ochratoxin A in roasted coffee // *J. Agric. Food Chem.* – 2002. – V.50. – P.6964-6967.
75. Ostermaier S., Schneider E., Usleber E., Martlbauer E., Terplan G. Rapid enzyme immunoassays for the detection of three sulfonamides in milk // *Food and Agricultural immunology.* – 1995. – V.7. – P.253-258.
76. Zhang H., Zhang Y., Wang S. Development of flow-through and dipstick immunoassays for screening of sulfonamide residues // *Journal of immunological methods.* – 2008. – V.337. – P.1-6.
77. Schnappinger P., Schneider E., Martlbauer E., Terplan G. Rapid detection of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk by enzyme-linked immunofiltration assay // *Food and Agricultural immunology.* – 1996. – V.8. – P.269-272.

78. Zhi Z., Meyer U.J., Van den Bedem J., Meusel M. Evaluation of an automated and integrated flow-through immunoanalysis system for the rapid determination of cephalixin in raw milk // *Analytica Chimica Acta*. – 2001. – V.442. – P. 207-219.
79. Ghindilis A., Krishnan R., Atanasov P., Wilkins E. Flow-through amperometric immunosensor: fast 'sandwich' scheme immunoassay // *Biosensors and Bioelectronics*. – 1997. – V. 12. – P. 415–423.
80. Schneider E., Usleber E., Dietrich R., Martlbauer E., Terplan G. Rapid detection of chloramphenicol in raw milk by enzyme-linked immunofiltration and dipstick assay // *Proceedings of the Euroresidue II Conference. In Residues of Veterinary Drugs in Food. The Netherlands*. – 1993. - P. 627-631.
81. Wang L., Huhle G., Malsch R., Hoffmann U., Song X., Harenberg J. Determination of heparin-induced IgG antibody by fluorescence-linked immunofiltration assay (FLIFA) // *Journal of immunological methods*. – 1999. – V. 222. – P. 93-99.
82. Lee W., Thompson G., Hall J., E.Fulton. Rapid immunofiltration assay of Newcastle disease virus using a silicon sensor // *Journal of immunological methods*. – 1993. – V.166. – P. 123-131.
83. Wu J., Tang J., Dai Z., Yan F., Ju H. A disposable electrochemical immunosensor for flow injection immunoassay of carcinoembryonic antigen // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2006. – V. 22. – P. 102–108.
84. Hacker G.W., Muss W.H., Hauser-Kronberger C., Danscher G., Rufner R., Gu J., Su H., Andreasen A., Stoltenberg M., Dietze O. Electron microscopical autometallography: Immunogold-silver staining (IGSS) and heavy-metal histochemistry // *Methods*. – 1996. — V. 10. — P. 257-269.
85. Ma Z., Sui S.F. Naked-eye sensitive detection of immunoglobulin G by enlargement of Au nanoparticles in vitro // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2002. — V. 41. — P. 2176-2179.
86. Yazynina E.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Izumrudov V.A., Gee S.J., Hammock B.D. Immunoassay techniques for detection of the herbicide simazine based on use of oppositely charged water-soluble polyelectrolytes // *Analytical Chemistry*. – 1999. — V. 71. — P. 3538-3543.

87. Zherdev A.V., Byzova N.A., Izumrudov V.A., Dzantiev B.B. Rapid polyelectrolytebased immunofiltration technique for testosterone detection in serum samples // *Analyst.* – 2003. — V. 128. — P. 1275-1280.
88. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Zherdev A.V., Hennion M.C. Rapid polyelectrolyte-based membrane immunoassay for the herbicide butachlor // *Journal of Immunoassay and Immunochemistry.* – 2005. — V. 26. — P. 231-244.
89. Sibanda L., Saeger S., Petegham C. Development of a portable field immunoassay for the detection of aflatoxin M1 in milk // *International journal of food microbiology.* – 1999. – V. 48. – P. 203-209.
90. Paepens C., Saeger S., Sibanda L., Barna-Vetro I., Leglise I., Hove F., Petegham C. A flow-through enzyme immunoassay for the screening of fumonisins in maize // *Analytica Chimica Acta.* – 2004. – V.523. – P.229-235.
91. Sibanda L., Saeger S., Petegham C., Grabarkiewicz-Szczesna J., Tomczak T. Detection of T-2 toxin in different cereals by flow-through enzyme immunoassay with a simultaneous internal reference // *J.Agric.Food.Chem.* – 2000. – V.48. – P.5864-5867.
92. Subathra M., Senthilkumar T., Ramadass P., Dhinakar Raj G. Development of rapid flow-through-based dot-immunoassay for serodiagnosis of leptospirosis in dogs // *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases.* – 2011. – V. 34. – P. 17-22.
93. Uithoven K., Schmidt J., Ballman M. Rapid identification of biological warfare agents using an instrument employing a light addressable potentiometric sensor and a flow-through immunofiltration-enzyme assay system // *Biosens Bioelectron.* – 2000. – V.14. – P.761–770.
94. Paffard S., Miles R., Clark C., Price R. A rapid and sensitive enzyme linked immunofilter assay (ELIFA) for whole bacterial cells // *Journal of Immunological Methods.* – 1996. – V. 192. – P. 133–136.
95. Wang S., Zhang C., Wang J., Zhang Y. Development of colloidal gold-based flow-through and lateral-flow immunoassays for the rapid detection of the insecticide carbaryl // *Analytica Chimica Acta.* – 2005. – V.546. – P.161-166.
96. Gogstad G., Dale S., Brosstad F. Assay of D-dimer based on immunofiltration and staining with gold colloids // *Clin Chem.* – 1993. – V. 39. – P.2070–2076.

97. Zhang P., Bao Y., Draz M., Lu.H. Rapid and quantitative detection of C-reactive protein based on quantum dots and immunoassay // International journal of Nanomedicine. – 2015. – V.10. – P.6161-6173.
98. Andrews D., Cubillos G., Paulino S., Seckinger D., Kett D. Prospective observational evaluation of the particle immunofiltration anti-platelet factor 4 rapid assay in MICU patients with thrombocytopenia // Crit Care. – 2013. – V.17. – P.143.
99. Mao X., Wang W., Du T. Dry-reagent nucleic acid biosensor based on blue dye doped latex beads and lateral flow strip // Talanta. – 2013. – V.114. – P.248–253.
100. Li Z, Wang Y, Wang J, Tang Z, Pounds JG, Lin Y. Rapid and sensitive detection of protein biomarker using a portable fluorescence biosensor based on quantum dots and a lateral flow test strip // Anal Chem. – 2010. – V. 82. – P. 7008-7014.
101. K. Snowden, M. Hommel. Antigen detection immunoassay using dipsticks and colloidal dyes // Journal of Immunological Methods. – 1991. – V. 140. – P. 57–65.
102. Xiang X., Tianping W., Zhigang T. Development of a rapid, sensitive, dye immunoassay for schistosomiasis diagnosis: a colloidal dye immunofiltration assay // Journal of Immunological methods. – 2003. – V.280. – P.49-57.
103. Kashiwazaki Y., Snowden K., Smith D., Hommel M. A multiple antigen detection dipstick colloidal dye immunoassay for the field diagnosis of trypanosome infections in cattle // Veterinary Parasitology. – 1994. – V. 55. – P. 57-69.
104. Kolosova A., De Saeger S., Eremin S., Peteghem C. Investigation of several parameters influencing signal generation in flow-through membrane-based enzyme immunoassay // Anal. Bioanal. Chem. – 2007. – V. 387. – P. 1095-1104.
105. Северина Е.С. Биохимия. Москва: ГЭОТАР-МЕД. - 2003. – 779 с.
106. Розен В.Б. Основы эндокринологии. Москва: Изд-во МГУ. – 1994. – 384 с.
107. Hear R.B., Gwyn J.A., Laing M. Pregnancy diagnosis in cows; changes in milk progesterone concentrations during oestrus cycle and pregnancy measured by a rapid radioimmunoassay // J.Agric.Sci. – 1973. – V. 81. – P.151-157.
108. Степанов В.Г., Олейников Д.А. Радиоизотопная диагностика воспроизводительной функции у животных // Научные труды ЮФ НУБиП Украины «КАТУ». Серия «Ветеринарные науки». – Т. 139. – С.170-180.
109. Тараторкин В.М., Петров Е.Б. Ресурсосберегающие технологии в молочном животноводстве и кормопроизводстве. Москва: Колос. – 2009. – 376 с.

110. Laing J.A., Heap R.B. The concentration of progesterone in the milk of cows during reproductive cycle // *British Veterinary Journal*. – 1971. – V.127.
111. Dobson H., Fitzpatrick R.J. Clinical application of the progesterone-in-milk test // *British Veterinary Journal*. – 1976. – V. 132. – P.538-542.
112. Hoffmann B., Gunzler O., Hamburger R., Schmidt W. Milk progesterone as a parameter for fertility control in cattle methodological approaches and present status of application in Germany // *British Veterinary Journal*. – 1976. – V. 132. – P. 469-477.
113. MrCracken J.A. Distribution of progesterone in body fluids and tissues of the dairy cow // Ph.D. thesis. University of Glasgow. – 1964.
114. Heap R.B., Henville A., Linzell J.L. Metabolic clearance rate, production rate, and mammary uptake and metabolism progesterone in cows // *Journal of Endocrinology*. – 1975. – V. 66. – P. 239-247.
115. Богатова О.В., Догарева Н.Г. Химия и физика молока: учебное пособие. Оренбург: ГОУ ОГУ. – 2004.- 137 с.
116. Твердохлеб Г.В., Раманаускас Р.И. Химия и физика молока и молочных продуктов. Москва:ДеЛи принт. – 2006. – 360 с.
117. Ginther O., Nuti L., Wentworth B., Taler W. Progesterone concentration in milk and blood during pregnancy in cows // *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*. – 1974. – V. 146. – P.354-357.
118. Erb R., Chew B., Keller H. Relative concentrations of estrogen and progesterone in milk and blood and excretion of estrogen in urine // *Journal of Animal Science*. – 1977. – V. 46. – P. 617-626.
119. Darling J., Laing A., Harkness R. A survey of steroids in cows' milk // *Journal of endocrinology*. – 1974. – V. 62. – P. 291-297.
120. Pennington J., Spahr S., Lodge J. Influences on progesterone concentration in bovine milk // *J. Dairy Science*. – 1981. – V.64. – P. 259-266.
121. Панфилов Н.Е., Федотов В.П. Животноводам о молоке. Минск: Ураджай, -1981.- 112 с.
122. Pope G., Swinburne J. Hormones in milk: their physiological significance and value as diagnostic aids // *Journal of Dairy Research*. – 1980. – V. 47. – P. 427-449.

123. Noppe H., Le Bizc B., Verheyden K., De Brabander H.F. Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices // *Anal Chim Acta.* - 2008. – V.611. – P. 1-16.
124. Regal P., Vazquez B.I., Franco C.M., Cepeda A., Fente C. Quantitative LC-MS/MS method for the sensitive and simultaneous determination of natural hormones in bovine serum // *Journal of Chromatography B.* – 2009. – V.877. – P.2457-2464.
125. Regal P., Nebot C., Cepeda A. Determination of naturally occurring progestogens in bovine milk as their oxime derivatives using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry // *J Sci Food Agric.* – 2010. – V. 90. – P. 1621-1627.
126. Farlow D., Xu X., Veenstra T. Quantitative measurement of endogenous estrogen metabolites, risk-factors for development of breast cancer, in commercial milk products by LC-MS/MS // *J Chromatogr B.* – 2009. – V. 877. – P.1327–1334.
127. Heap R.B., Gwyn J.A., Laing M. Pregnancy diagnosis in cows; changes in milk progesterone concentrations during oestrus cycle and pregnancy measured by a rapid radioimmunoassay // *J.Agric.Sci.* – 1973. – V. 81. – P. 151-157.
128. Heap R.B., Holdsworth R.J., Gadsby J.E., Laing J.A., Walters D.E. Pregnancy diagnosis in the cow from milk progesterone concentration // *Br. Vet. J.* – 1976. – V.132. – P.445-463.
129. Allen R.M., Redshaw M.R., Holdsworth R. A comparison of tritiated and iodinated tracers in the radioimmunoassay of progesterone in cow milk // *J. Reprod. Fert.* – 1980. – V. 58. – P. 89-93.
130. Yalow R.S. Radioimmunoassay // *Annu Rev Biophys Bioeng.* – 1980. – V. 9. – P. 327.
131. Byszewska-Szpociska E., Markiewicz A. New RIA kit for determination of progesterone in cows` milk // *Journal of Immunoassay & Immunochemistry.* – 2006. – V. 27. – P. 279-288.
132. Kamdoj M., Prakash B.S. Relationship of progesterone in plasma and whole milk of buffaloes during cyclicity and early pregnancy // *Trop.Anim.Hlth Prod.* – 1993. – V.25. – P. 185-192.
133. Karir T., Nagvekar U.H., Samuel G., Sivaprasad N., Chaudhuri P., Samad A. Estimation of progesterone in buffalo milk by radioimmunoassay // *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry.* – 2006. – V. 267. - №2. – P.321-325.

134. Eissa H.M., Nachreiner R.F., Refsal K.R. Skim milk progesterone in pregnant cows from insemination throughout lactation // *Veterinary Research Communications*. – 1994. – V. 18. – P.149-154.
135. Inaudi P., Bacigalupo M., Monnittola C., Lugaro G. , Genazzani A.R. Pregnancy diagnosis in cattle by a rapid and highly reliable method for progesterone determination in milk // *J.Reprod.Fert.* – 1982. – V. 65. – P.265-273.
136. Pope G.S., Majzlik I., Ball P.J.H. Use of progesterone concentrations in plasma and milk in the diagnosis of pregnancy in domestic cattle // *Br.Vet.J.* – 1976. – V.132. – P.497-506.
137. Gowan E., Etches R. A solid-phase radioimmunoassay for progesterone and its application to pregnancy diagnosis in the cow // *Theriogenology*. – 1979. – V.12. – P. 327-343.
138. Engvall E., Jonsson K., Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1971. – V. 251. – P. 427.
139. Van Weemen B., Schuurs A. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates // *FEBS Letters*. – 1971. – V. 15. – P. 232.
140. Dray F., Andrieu J.M., Renaud F. Enzyme immunoassay of progesterone at the pictogram level using β -galactosidase as label // *Biochem.Biophys.Acta.* – 1975. – V. 403. – P.103.
141. Sauer M.J., Foulkes J.A., Worsfold A., Morris B.A. Use of progesterone 11-glucuronidealkaline phosphatase conjugate in a sensitive microtitre plate enzymeimmunoassay of progesterone in milk and its application to pregnancy testing in dairy cattle // *J.Reprod.Fertil.* – 1986. – V.76. – P. 375.
142. Foulkes J.A., Cookson A.D., Sauej M.J. AI in cattle based on daily microtitre plate enzymeimmunoassay of progesterone in whole milk // *Br.Vet.J.* – 1982. – V. 138. – P. 515.
143. Nakao T., Sugihashi, Saga N., Tsunoda N., Kawata K. Use of milk progesterone enzyme immunoassay for differential diagnosis of follicular cyst, luteal cyst and cystic corpus luteum in cows // *Am. J. Vet. Res.* – 1983. – V. 44. – P. 888.
144. Saurer M. J., Foulkes J. A., Cookson A. D. Direct enzymeimmunoassay of progesterone in bovine milk// *Steroids*. – 1981. – V. 38. – № 45. – P.45-53.

145. Giraudi G., Giovannoli C., Baggiani C. Effect of homologous and heterologous spacer arms of progesterone-horseradish peroxidase conjugates on the equilibrium constants for an immobilised anti-progesterone antiserum // *Analitica Chimica Acta*. – 2000. – V.417. – P. 95-100.
146. Arnstadt K.I., Cleere W.F. Enzyme-immunoassay for determination of progesterone in milk from cows // *J.Reprod.Fert.* – 1981. – V. 62. – P. 173-180.
147. Farahmand B., Rasae M., Maleknia N. Enzyme-linked immunosorbent assay of progesterone in serum using penicillinase as label // *Iranian Biomedical Journal*. – 1998. – V.2. – P. 115-122.
148. Nebel R.L. On-farm milk progesterone tests // *Journal of dairy science*. – 1988. – V. 71. – № 6. – P. 1682-1690.
149. Parini C., Corocher N., Bacigalupo M. Giraudi G. Fractionation of an antiserum to progesterone by affinity chromatography: effect of pH, solvents and biospecific adsorbents // *Analyst* – 1995. – V. 120. - P. 1153-1158.
150. Shrivastav T., Chaube S., Charu. Enzyme linked immunosorbent assay for milk progesterone // *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. – 2010. – V. 31. – P. 301-313
151. Marcus G.J., Hackett A.J. Use of enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of bovine serum and milk progesterone without extraction // *Journal of Dairy Science*. – 1986. – V.69. – № 3. – P. 818-824.
152. Isobe N., Nakao T. Direct enzyme immunoassay of progesterone in bovine plasma // *Animal Science Journal*. – 2003. – V. 74. – P. 369-373.
153. Prakash B., Meyer H. Sensitive enzyme immunoassay of progesterone in skim milk using second-antibody technique // *Animal Reproduction Science*. – 1988. – V. 16. – P. 225-235.
154. Giraudi G., Giovannoli C., Baggiani C. Reactivity of an immobilized anti-progesterone antiserum with homologous and heterologous progesterone-horseradish peroxidase conjugates // *Analyst*. – 1999. – V. 124. – P. 313-318.
155. Van de Wiel D., Koops W. Development and validation of an enzyme immunoassay for progesterone in bovine milk or blood plasma // *Animal Reproduction Science*. – 1986. – V. 10. – P. 201-213.

156. Mitchell J.S., Wu Y., Cook C.J., Main L. Protein conjugate-based immunoassay of whole milk progesterone // *Journal of Dairy Science*. – 2004. – V. 87. – №9. – P. 2864-2867.
157. Van de Wiel D., Kamonpatana M., Ngramsurijaroy Ch., Koops W. Enzymeimmunoassay of milk-progesterone: its application to oestrus confirmation and early pregnancy diagnosis in cattle // *Veterinary Quarterly*. – 1982. – V. 4. – P. 72-78.
158. Arnstadt K., Schmidt-Adamopoulou B. Direct enzymeimmunoassay for determination of progesterone in milk from cows // *Br. Vet. J.* – 1982. – V. 138. – P.436-438.
159. Sauer M., Foulkes J., O'Neill P. Use of microtitre plate EIA for direct determination of progesterone in whole milk: application of heterologous systems for improved sensitivity // *Br.Vet.J.* – 1982. – V.138. – P. 522-532.
160. Schwalm J.W., Tucker H.A. Glucocorticoids in mammary secretions and blood serum during reproduction and lactation and distributions of glucocorticoids, progesterone and estrogens in fractions of milk // *J.Dairy Sci.* – 1978. – V. 61. – P. 550-560.
161. Batra S.K., Arora R.C., Bachlaus N.K., Pandey R.S. Blood and milk progesterone in pregnant and nonpregnant buffalo // *J Dairy Science*. – 1979. – V. 62. – P. 1390-1393.
162. Waldmann A., Ropstad E., Landsverk K. Level and distribution of progesterone in bovine milk in relation to storage in the mammary gland // *Animal Reproduction Science*. – 1999. – V. 56. – P. 79-91.
163. Comin A., Renaville B., Marchini E., Maiero S., Prandi A. Direct enzyme immunoassay of progesterone in bovine milk whey // *Journal of Dairy Science*. – 2005. – V. 88. – № 12. – P. 4239-4242.
164. Ivanova T., Godjevargova T. Sensitive progesterone determination using a magnetic particle-based enzyme-linked immunosorbent assay // *Analytical Letters*. – 2015. – V. 48. – P. 843-860.
165. Prakash B., Meyer H., Schallenberger E. Development of sensitive enzymeimmunoassay for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody technique // *Journal of steroid biochemistry*. – 1987. – V. 28. – P. 623-627.
166. Yoon D.Y., Choi M.J., Choe I.S., Chung T.W. Influence of the conjugation site on specificity of monoclonal antibodies to progesterone and on the performance of direct

- enzyme immunoassay // *Biochemistry and molecular biology international*. – 1993. – V. 31. – P. 553-563.
167. Waldmann A. Monoclonal antibodies to progesterone: characterization and selection for enzyme immunoassay in bovine milk // *Hybridoma*. – 1999. – V.18. – P. 289-296.
168. Шевелев Н., Матрешина Н., Краснов В. Метод ИФА в диагностике бесплодия // *Животноводство России*. – 2008. - № 1. – С. 47-48.
169. Cox N., Thompson F., Gulver D. Milk progesterone to predict reproductive status in commercial dairy herd // *J.Dairy Sci*. – 1978. – V.61. – P.1616-1621.
170. Booth J., Davies J., Holdworth R. Use of milk progesterone test for pregnancy determination // *Br.Vet.J*. – 1979. – V.135. – P. 478-488.
171. Foote R., Oltenacu E., Kummerfeld H., Smith R., Riek P. Milk progesterone as a diagnostic aid // *Br.Vet.J*. – 1979. – V.135. – P.550-558.
172. Zaid A., Bierschwal G., Elmore G., Youngquist R.. Concentration progesterone in milk as a monitor of early pregnancy diagnosis in dairy cows // *Theriogenology*. – 1979. – V.12. – P.3-11.
173. Самсонова Ж.В., Осипов А.П., Егоров А.М. Ранняя диагностика стельности коров с использованием ИФА // *Ветеринария*. – 2013. - №12. – С.46-48.
174. Simersky R., Swaczynova J., Morris D.A., Franek M., Strnad M. Development of an ELISA-based kit for the on-farm determination of progesterone in milk // *Veterinari Medicina*. – 2007. – V.52. – P. 19-28.
175. Nakao T., Sugihashi A., Ishibashi Y., Tosa E., Nakagawa Y., Yuto H., Nomura T. Use of milk progesterone enzyme immunoassay for early pregnancy diagnosis in cows // *Theriogenology*. – 1982. – V. 18. – P.267-274.
176. Roelofs J. Eerdenburg F., Hazeleger W. Relationship between progesterone concentrations in milk and blood and time of ovulation in dairy cattle // *Animal reproduction science*. – 2006. – V.91. – P. 337-343.
177. Oku Y., Osawa T., Hirata T., Kon N. Validation of a direct time resolved fluoroimmunoassay for progesterone in milk from dairy and beef cows // *The Veterinary Journal*. – 2011. – V.190. – P. 244-248.
178. Claycomb R., Delwiche M. Biosensor for on-line measurement of bovine progesterone during milking // *Biosensors and Bioelectronics*. – 1998. – V. 13. – P. 1173-1180.

179. Schasfoort R., Keldermans C., Kooyman R., Bergveld P., Greve J. Competitive immunological detection of progesterone by means of the ion-step induced response of an immunoFET // *Sensor Actuat.B-Chem.* – 1990. – V.1. – P. 368-372.
180. Pemberton R., Hart J., Foulkes J. Development of a sensitive, selective electrochemical immunoassay for progesterone in cow`s milk based on a disposable screen-printed amperometric biosensor // *Electrochimica Acta.* – 1998. – V. 43. – P. 3567-3574.
181. Zhang H., Du X., Liu Q. Detection of progesterone in bovine milk using an electrochemical immunosensor // *International journal of dairy technology.* – 2013. – V. 66. – P. 461-467.
182. Gillis E., Gosling J., Sreenan J., Kane M. Development and validation of a biosensor-based immunoassay for progesterone in bovine milk // *J Immunol Methods.* – 2002. – V. 267. – № 2. – P. 131-138.
183. Yuan J., Oliver R., Li J., Lee J, Aguilar M. Sensitivity enhancement of SPR assay of progesterone based on mixed self-assembled monolayers using nanogold particles // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2007. – V. 23. – P. 144-148.
184. Kappel D., Florian P., Gauglitz G. Development of a TIRF-based biosensor for sensitive detection of progesterone in bovine milk // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2007. – V. 22. – P. 2295-2300.
185. Tschmelak J., Kappel N., Gauglitz G. TIRF-based biosensor for sensitive detection of progesterone detection in water// *Anal Bioanal Chem.* – 2005. – V. 382. – P. 1895-1903.
186. Laitinen M., Vuento M. Immunochromatographic assay for quantitation of milk progesterone // *Acta Chem.Scand.* – 1996. – V. 50. – P. 141-145.
187. Posthuma-Trumpie G.A., Korf J. Development of a competitive lateral flow immunoassay for progesterone: influence of coating conjugates. // *Anal Bioanal Chem.* – 2008. – V. 392. – P. 1215-1223.
188. Сковородин Е., Игуменова Н. Методы ранней диагностики стельности // *Известия Оренбургского государственного аграрного университета.* – 2011. – Т. 2. - № 30. – С. 89 – 91.
189. Waldmann A., Raud A. Comparison of a lateral flow milk progesterone test with enzyme immunoassay as an aid for reproductive status determination in cows // *Veterinary record.* – 2016. - V. 178. – Is. 11. – P. 260.

190. Сафронова В.А., Самсонова Ж.В., Григоренко В.Г., Осипов А.П. Определение прогестерона методом латерального проточного иммуноанализа // Вестник Московского университета. Серия 2. – 2012. – Т. 53. - № 5. – С. 326-334.
191. Woisztillo J. TMB formulation for soluble and precipitable HRP-ELISA. – 1991. Patent US 5013646 A.
192. Cho J., Paek E., Cho I., Paek S. An enzyme immunoanalytical system based on sequential cross-flow chromatography // Analytical chemistry. – 2005. – V. 77. – N. 13. – P. 4091-4097.
193. Chen C., Wu J. A fast and sensitive quantitative lateral flow immunoassay for cry1Ab based on a novel signal amplification conjugate sensors // Sensors. - 2012. – V.12. – P. 11684-11696.
194. Kikkas I., Mallone R., Larger E., Volland H., Morel N. A Rapid lateral flow immunoassay for the detection of tyrosine phosphatase-like protein IA-2 autoantibodies in human serum // Plos One. – 2014. – V. 9. – P.1-6.
195. Zhang C., Zhang Y., Wang S. Development of multianalyte flow-through and lateral-flow assays using gold particles and horseradish peroxidase as tracers for the rapid determination of carbaryl and endosulfan in agricultural products // J Agric Food Chem. – 2006. – V. 54. – P. 2502-2507.
196. Watanabe H., Satake A., Kido Y. Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices // The analyst. – 2002. – V. 127. – P. 98-103.
197. Watanabe H., Satake A., Kido Y. Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic rapid assay for salinomycin // Analytica Chimica Acta. – 2001. – V. 437. – P. 31-38.
198. Watanabe H., Satake A., Matsumoto M., Kido Y., Tsuji A. Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic rapid assay for monensin // The Analyst. – 1998. – V. 123. – P. 2573-2578.
199. Posthuma-Truimpie G.A. PhD thesis. University of Groningen. The Netherlands. - 2008.
<http://dissertations.ub.rug.nl/FILES/faculties/medicine/2008/g.a.posthuma.truimpie/thesis.pdf>

200. Голиков А.Н., Базанова Н.У., Кожебеков З.К. Физиология сельскохозяйственных животных. Москва: Агропромиздат. – 1991. – 432 с.
201. Barlowska J., Grodzicki T. , Topyla B., Litvinczuk Z. Physicochemical properties of milk fat from three breeds of cows during summer and winter feeding // Archiv Tierzucht. – 2009. – V. 52. – Is. 4. - P. 356-363.