

УДК 543.544.943.3

## НАНОЧАСТИЦЫ МЕТАЛЛОВ КАК НОВЫЙ КЛАСС МЕТОК В БЫСТРЫХ МЕТОДАХ ИММУНОАНАЛИЗА

А.П. Осипов<sup>1,2</sup>, Ж.В. Самсонова<sup>2</sup>, С.Э. Кондаков<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»;<sup>2</sup>химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; e-mail: APOsipov@mail.ru)

**Краткий обзор основных направлений развития экспресс-методов иммуноанализа. Основное внимание уделено принципам и особенностям функционирования систем на основе латерального проточного иммуноанализа. Рассмотрены основные физико-химические свойства, особенности регистрации и достоинства использования в системах быстрых методов иммунохимического анализа в качестве меток биоспецифических реагентов наночастиц металлов, в том числе наночастиц золота, квантовых точек, магнитных частиц.**

**Ключевые слова:** латеральный проточный иммуноанализ, иммунохроматографический анализ, коллоидное золото, квантовые точки, магнитные наночастицы, быстрые методы анализа, метки в иммуноанализе.

Одна из наиболее важных и актуальных задач в области аналитической биотехнологии – разработка новых простых методов и устройств, позволяющих осуществлять экспресс-анализы сложных смесей биологически активных соединений в объектах окружающей среды и биологических жидкостях. Обязательные требования к ним состоят в простоте выполнения анализа, экспрессности, высокой чувствительности, воспроизводимости результатов, стабильности, относительно низкой стоимости, а также в дополнительной возможности одновременного количественного определения содержания в анализируемой пробе нескольких веществ (различных микроорганизмов, аллергенов, пестицидов, антибиотиков и т.д.) в течение реального времени (<15 мин). Экспресс-тесты такого типа в литературе получили общее название «быстрых тестов» («rapid tests»). Эту группу аналитических методов часто объединяют под эквивалентными по смыслу названиями, такими как «анализы на месте» («point-of-care tests» или ПОС), «анализы на приеме у доктора» («doctor's office tests»), «мембранные тесты» («membrane tests») и т.д. [1]. В основе функционирования таких биоаналитических устройств лежат следующие общие процессы (рис. 1):

1) первоначальное «узнавание» анализируемого вещества в растворе, осуществляемое, как правило, за счет эффективных биоспецифических взаимодействий типа антиген–антитело, взаимодействия между собой фрагментов ДНК и др.;

2) последующие преобразования в системе, приводящие к «визуализации» таких специфических взаимодействий.

Процесс перевода «скрытого изображения» (т.е. образовавшихся биоспецифических комплексов) в детектируемый сигнал может быть основан на изменении физико-химических свойств реакционной среды (например, в иммунохимических реакциях преципитации и агглютинации с участием пары антитело – поливалентный антиген) или на введении в структуру реагирующих молекул детектируемой в очень низких концентрациях метки (радиоактивной, ферментной, флуоресцентной и др.). Наличие образующихся комплексов с анализируемым веществом может быть определено либо визуально (по окрашиванию раствора или твердой фазы, образованию в системе осадка или помутнению раствора), либо с помощью соответствующего инструментального оборудования (например, отражательных фотометров) для количественной оценки меченых комплексов, что позволяет вычислять точную концентрацию определяемого соединения в анализируемой пробе с использованием калибровочных кривых.

### *Золотые наночастицы в латеральном проточном иммуноанализе*

В последнее время для решения многих практических задач медицинской и ветеринарной диагностики, а также пищевой промышленности, охраны окружающей среды и т.д. активно разрабатываются и реализуются иммунохимические экспресс-методы анализа с использованием в качестве меток антител коллоидных частиц металлов, обладающих уникальными физико-химическими и оптическими свойствами вследствие своих нанометровых размеров. Наибо-

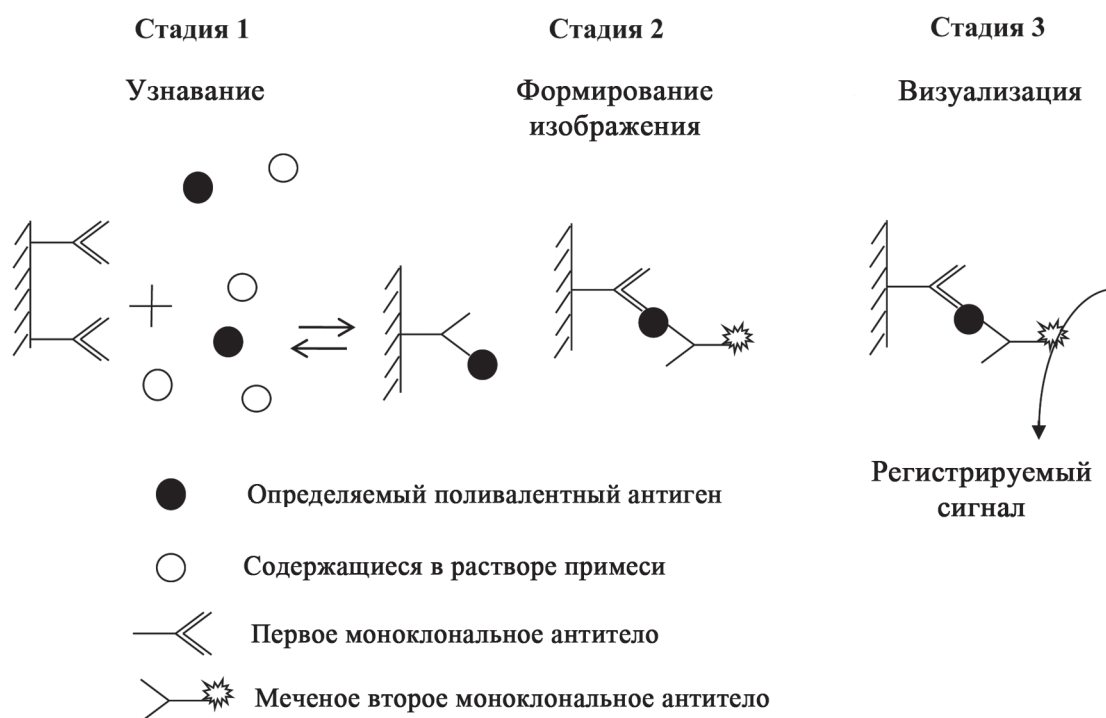


Рис. 1. Основные стадии иммунохимического анализа с использованием меченых реагентов

более широкое распространение в качестве меток получили наночастицы коллоидного золота [2]. Размер таких частиц, как правило, варьирует в пределах 10–50 нм. Основными преимуществами их использования в качестве метки являются низкий предел обнаружения наночастиц коллоидного золота (как в растворе, так и на поверхности твердых фаз), отсутствие необходимости добавлять специальные реагенты для их визуализации (например, субстраты в случае ферментных меток) и достаточно хорошо разработанные разнообразные методы получения биоконъюгатов различных белков (в том числе антител) с золотыми наночастицами [3].

Интенсивный цвет окрашивания наночастиц золота, характеризующийся максимумом поглощения в районе 520 нм, обусловлен поверхностным плазмонным резонансом, возникающим при взаимодействии видимого светового излучения с наноразмерными частицами золота [4]. Спектральные характеристики таких наночастиц золота зависят от их размера, а также изменения агрегатного состояния частиц в коллоидном растворе, что обуславливает возможность их использования в качестве меток иммунореагентов для визуализации процессов биоспецифического узнавания в аналитических системах [5]. Так, образование достаточно больших по размеру ассоциатов золотых наночастиц, обусловленное взаимодействием меченных золотом антител с анализируемым поливалентным антигеном, приводит к изменению окраски раствора после увеличения ионной силы раствора, что положено в основу разнообразных экспрессных гомогенных методов иммуноанализа [6, 7].

Наиболее широкое использование золотые метки получили в аналитических устройствах для проведения так называемого латерального проточного иммуноанализа (англ. *Lateral Flow Immunoassay*) [8, 9]. 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 под действием капиллярных сил самопроизвольно движется поток жидкости, содержащий анализируемый образец (рис. 2). 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 пра-

вождение 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 под действием капиллярных сил самопроизвольно движется поток жидкости, содержащий анализируемый образец (рис. 2). 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.

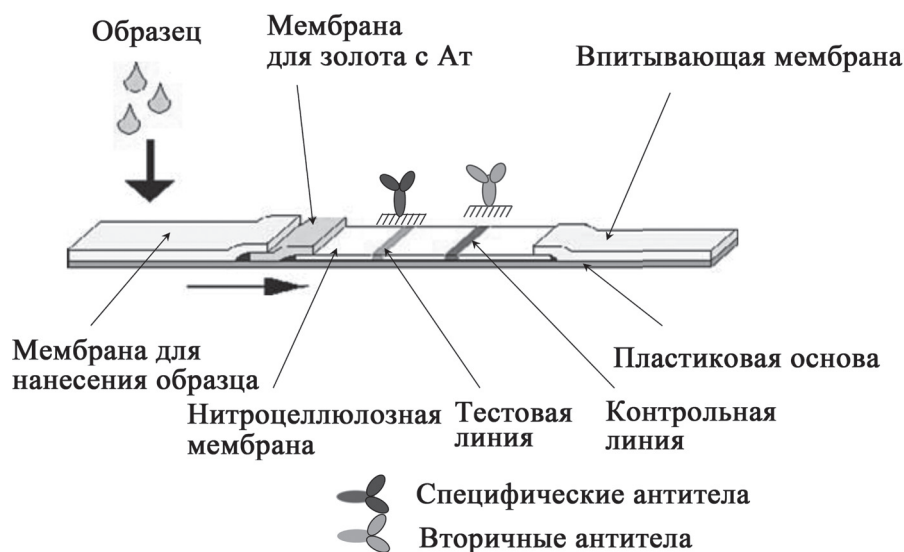


Рис. 2. Строение тест-полоски для латерального проточного иммуноанализа (иммунохроматографического анализа)

вило, 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 анализируемый образец и перемещать его к аналитической мембране.

На рис. 3 приведена иллюстрация принципа проведения иммунохроматографического анализа, используемого для определения большинства белковых антигенов, в основе которого лежит так называемая сэндвич-схема иммуноанализа. На аналитической мембране нанесены два вида антител:

в виде первой поперечной тестовой линии предварительно сорбированы и высушены первые моноклональные специфические антитела против определяемого антигена,

во второй зоне в виде поперечной линии расположены вторичные антитела против специфических антител, конъюгированных с золотом.

Одна или несколько капель анализируемой жидкости, содержащей определяемый поливалентный антиген, наносится на мембрану для образца. Вследствие высокой смачиваемости и пористости мембраны и возникновения капиллярных сил жидкость распространяется по порам вдоль мембраны для образца, перетекает на вторую мембрану, содержащую предварительно высушенный на ней конъюгат спе-

цифических меченых антител с наночастицами золота, захватывает его и движется вместе с ним и образцом вдоль аналитической мембраны. Так как константы скоростей второго порядка взаимодействия соответствующих антител с антигенами, как правило, в водном растворе достаточно высоки, по мере распространения образца в порах мембраны происходит быстрое образование комплексов между анализируемым антигеном и антителами, мечеными золотыми наночастицами. Благодаря малым (нанометровым) размерам золотых наночастиц, покрытых антителами, иммунохимическая реакция в порах протекает в псевдогомогенном растворе с высокими скоростями. При прохождении образовавшихся меченых золотом иммунокомплексов через первую зону в виде поперечной линии, содержащей иммобилизованные (сорбированные) на твердой фазе вторые специфические моноклональные антитела против определяемого антигена, происходит удерживание иммунокомплексов золотых наночастиц на носителе, что визуально проявляется в виде окрашенной поперечной тестовой линии. При отсутствии в анализируемом растворе определяемого антигена окрашивания тестовой линии не наблюдается. В обоих случаях избыток меченых наночастицами золота специфических антител удерживается вторичными антителами, о чем свидетельствует появление в аналитической зоне второй контрольной линии.

Для определения низкомолекулярных моновалентных антигенов (гаптен) используется, как правило, конкурентная схема анализа, основанная на уменьше-

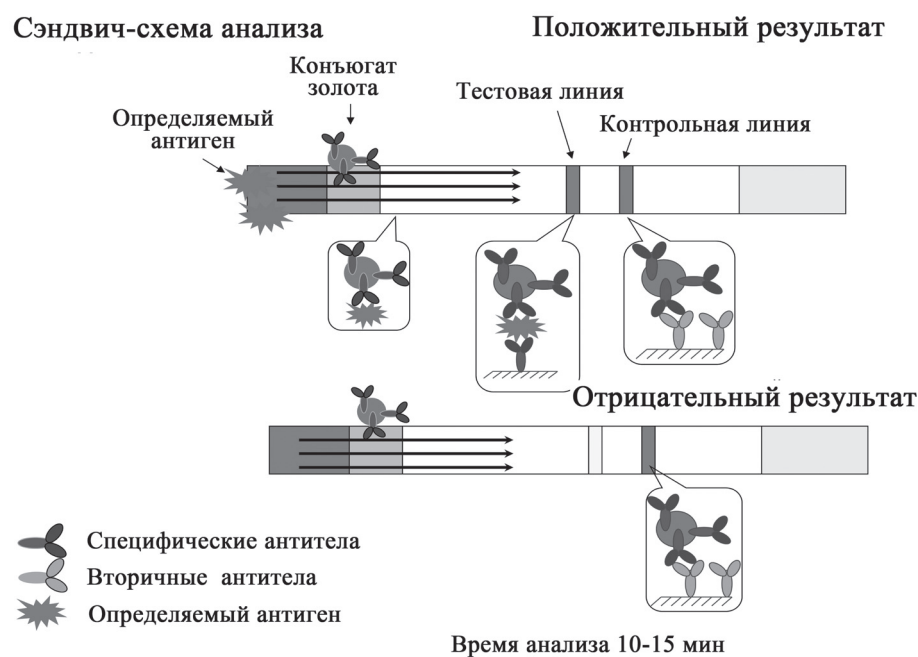


Рис. 3. Сэндвич-схема проведения латерального проточного иммуноанализа

нии в присутствии определяемого гаптена количества меченных золотом антител, связанных в тестовой зоне аналитической мембраны с иммобилизованным аналогом антигена. Результат анализа для такой схемы характеризуется уменьшением интенсивности окрашивания тестовой полосы при увеличении концентрации определяемого антигена или полным ее отсутствием.

Первая стадия анализа по сэндвич-схеме представляет собой процесс иммунохимического взаимодействия анализируемого антигена и конъюгата золота с антителами и протекает в гомогенном растворе, локализованном в порах аналитической мембраны по мере продвижения жидкости вдоль носителя. Время распространения реакционных компонентов до первой тестовой зоны, которое можно легко варьировать путем изменения физико-химических свойств и структуры мембран, как правило, составляет несколько минут, что позволяет в условиях достаточно быстрой реакции взаимодействия антиген-антитело приблизить ее к равновесному состоянию. Вторая стадия включает реакцию взаимодействия растворимых иммунокомплексов между мечеными золотом антителами и определяемым антигеном с иммобилизованными на мембране специфическими антителами первой тестовой линии. В обычных условиях проведения твердофазного иммуноанализа (или дот-анализа) такой процесс является достаточно длительным (время установления равновесия до

1 ч) ввиду наличия внешнедиффузионного торможения реакции между компонентами жидкости и компонентами, сорбированными на твердой фазе. Однако в условиях проведения латерального иммуноанализа такого торможения не наблюдается ввиду отсутствия перемешиваемого слоя жидкости вблизи твердой фазы благодаря ее пористой структуре и постоянному движению жидкости внутри пор носителя. Кинетика таких процессов рассмотрена нами ранее [10] на системах протекания реакций в тонких (шириной порядка 50–100 мк) проточных ячейках в ряде модельных экспериментов по взаимодействию антигенов из движущегося раствора с иммобилизованными на бумаге или поверхности пролистрирола антителами. Путем сравнения процессов, протекающих в стационарных условиях и в проточном режиме в тонкослойной ячейке, впервые было показано, что при одинаковых характеристиках носителя и концентрациях реагентов в растворе и на мембране проведение реакции в тонкослойной кювете, представляющей собой аналог узкой поры мембраны, приводит к снятию диффузионных ограничений протекания реакций взаимодействия антигена из раствора с иммобилизованными на твердой фазе антителами. Аналогичные процессы характерны и для проточного латерального иммуноанализа и реакций взаимодействия антигенов с иммобилизованными на мембранах антителами в тестовых и контрольных линиях при движении жидкости в порах мембраны. Таким образом, несмотря

на гетерогенность системы и прохождение реакции между иммобилизованными на мембране антителами и компонентами водной фазы пор носителя, диффузионные ограничения в реакциях отсутствуют, что обуславливает высокую скорость протекания иммунохимических взаимодействий и короткое время анализа в устройствах для латерального проточного иммуноанализа.

Размер пор различных видов используемых в системах латерального иммуноанализа мембран может достаточно сильно варьировать и, как правило, составляет величину от нескольких до десятков микрон. Структуру внутренних полостей используемых мембран можно представить как совокупность большого количества перекрывающихся и сообщающихся тонких капилляров, по которым протекает жидкость, являющихся аналогами тонкой проточной ячейки. Для иллюстрации на рис. 4 приведены полученные с помощью электронного микроскопа микрофотографии пористых материалов, используемых в качестве мембран-носителей в иммунохроматографических системах экспресс-анализа. Видно, что структура

мембран, несмотря на хаотичность расположения самих волокон мембраны, достаточно однородна и действительно формирует сообщающиеся полости, по которым распространяется поток реакционной жидкости. Необходимым условием распространения жидкости внутри пор носителя является высокая смачиваемость мембран, достигаемая во многих случаях специальной обработкой часто гидрофобной полимерной структуры волокон поверхностно-активными веществами, поливиниловым спиртом и другими агентами, повышающими гидрофильность поверхности. Как правило, фирмы-производители таких мембран не конкретизируют их состав, а ограничиваются лишь общими характеристиками, такими как скорость смачивания, удельная сорбционная емкость по воде, пористость и др.

Интенсивное развитие иммунохроматографических методов в последнее десятилетие и широкое внедрение их в практику обусловлено развитием технологической базы для приготовления компонентов устройств для латерального иммуноанализа, в том числе мембран, обладающих уникальными стандарт-

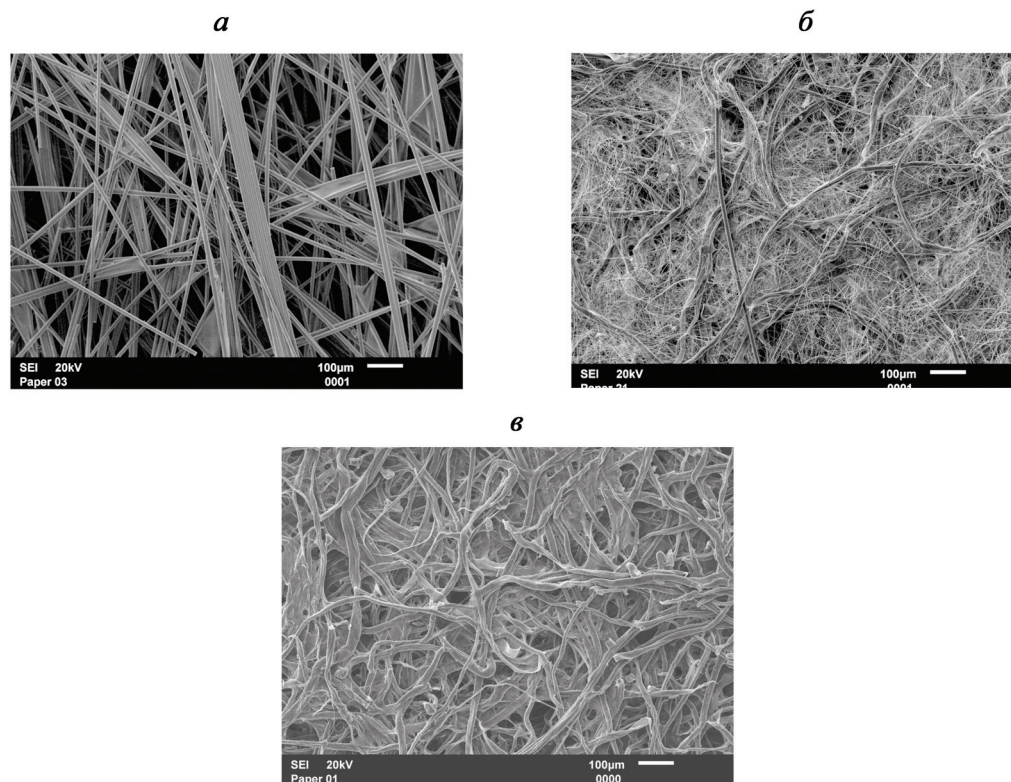


Рис. 4. Полученные с помощью электронной сканирующей микроскопии микрофотографии пористых мембран для конъюгата (*a*), для образца с отделением клеток крови (*б*), для сыворотки (*в*), используемых в системах латерального проточного иммуноанализа

ными характеристиками по размерам пор и скорости потока жидкости, способностью эффективно и количественно необратимо удерживать или сорбировать белки в порах носителя (или полностью освобождать из пор высушенные специфические компоненты в раствор), доступностью специфических компонентов (моноклональные антитела, наночастицы золота, используемые в качестве визуальных меток образующихся специфических иммунокомплексов и т.д.), а также разработкой количественных методов детекции результатов анализа.

Рассматриваемые системы латерального проточного иммуноанализа характеризуются следующими особенностями. Во-первых, все необходимые для проведения анализа компоненты содержатся в используемых устройствах (для анализа требуется всего лишь нанести на мембрану для образца несколько капель анализируемого раствора). Во-вторых, анализ осуществляется в течение достаточно короткого времени (как правило, 5–10 мин), которое обусловлено величиной скорости распространения жидкости, зависящей от пористости и неоднородности структуры используемых мембран. В-третьих, результаты анализа можно регистрировать визуально по интенсивности окрашивания линии на мембране или с помощью специальных портативных отражательных фотометров (ридеров) в анализируемой пробе.

Наибольшее распространение такого рода быстрые тест-системы получили в медицинской диагностике. Тесты, основанные на принципе иммунохроматографии, предельно просты в использовании и могут применяться на любом этапе оказания медицинской помощи населению (как в кабинете врача при проведении профилактических осмотров, так и в клинико-диагностических лабораториях с высоким уровнем оснащенности). Особую актуальность такие тесты имеют для обнаружения заболеваний, в которых критическим фактором является время постановки диагноза, важное для начала эффективного проведения соответствующей терапии, например, при выявлении острого инфаркта миокарда (ОИМ). В настоящее время диагноз ОИМ ставится при наличии у пациентов ряда признаков, в том числе болевого синдрома, изменений на кардиограмме и повышения уровня кардиоспецифических ферментов. Однако эти параметры не всегда могут быть ярко выражены в первые часы заболевания. Изменение концентрации ряда специфических маркеров сердечно-сосудистых заболеваний в крови, обусловленное разрушением мышечной ткани миокарда, может быть использовано для быстрой

диагностики ОИМ. Наиболее предпочтительными маркерами повреждения миокарда являются тропонины, обладающие абсолютной кардиоспецифичностью. При повреждении миокарда уровень тропонина обнаруживается через 4–6 ч и остается повышенным до 7–10 дней. Однако определение тропонинов не подходит для ранней диагностики ОИМ, поэтому наряду с исследованиями тропонинов рекомендуется определять ранние миокардиальные маркеры, среди которых наиболее перспективным является белок, связывающий жирные кислоты (с-БСЖК). При повреждении миокарда концентрация с-БСЖК в крови значительно повышается уже в первые часы после появления болевых симптомов. Достоинством с-БСЖК является его высокая кардиоспецифичность, поскольку он содержится в сердечных мышцах в гораздо большем количестве, чем в скелетных тканях. Одновременное определение раннего (с-БСЖК) и позднего (тропонин I) кардиомаккеров с использованием иммунохроматографических тестов повышает эффективность диагностики ОИМ и позволяет определить скрытые формы инфаркта [11, 12].

В течение начального периода исследований и создания иммунохроматографических тест-систем большинство из них функционировало по принципу «да-нет», т.е. проявление тестовой полосы в реакционной зоне при визуальном способе детекции свидетельствовало о присутствии определяемого антигена в анализируемой жидкости. Развитие технологии получения тест-систем и их стандартизация привели к разработке количественных систем латерального иммуноанализа. Оказалось, что в достаточно широком диапазоне определяемых концентраций интенсивность окраски тестовой полосы в аналитической зоне мембраны пропорциональна содержанию меченого компонента, зависящему от концентрации анализируемого вещества в пробе. Многие компании, в том числе отечественные, разрабатывали и в настоящее время предлагают на рынке портативные устройства, основанные на отражательной фотометрии, с помощью которых можно проводить количественную интерпретацию результатов анализа [13, 14]. Измерение интенсивности окраски тестовых линий в иммунохроматографическом анализе с использованием такого рода портативных отражательных фотометров позволяет создавать простые, но достаточно точные количественные системы видеорегистрации, обладающие чувствительностью, сравнимой с характеристикой методов иммуноферментного анализа. Количественную регистра-

цию результатов анализа можно проводить с помощью обычного планшетного сканера и доступных стандартных программ для обработки результатов измерений (Scion Image и др.).

#### *Квантовые точки как новый класс меток в иммуноанализе*

В качестве основных тенденций развития новых направлений исследований в области высокоэффективных систем быстрого латерального проточного иммуноанализа можно выделить следующие: поиск новых классов наноразмерных частиц, обладающих уникальными оптическими и другими свойствами для использования в качестве меток молекул антител или антигенов, создание инструментальных комплексов видеоцифровой регистрации для проведения количественного анализа, повышение чувствительности анализа, разработка систем для проведения одновременного определения нескольких компонентов в одной и той же пробе (мультианализ).

Особое внимание исследователи уделяли поиску эффективных меток антител, позволяющих улучшить характеристики анализа. Основные требования, предъявляемые к таким меткам следующие: низкий предел обнаружения метки, высокая стабильность, возможность и простота получения конъюгатов антител или других белков с метками, наименьшая величина неспецифического взаимодействия с компонентами образца, низкая стоимость, возможность визуальной или инструментальной количественной регистрации меченого компонента в растворе или на твердой фазе, отсутствие влияния метки на процесс специфического взаимодействия антиген–антитело. Среди предложенных в последнее время меток наибольший интерес вызывает новый класс полупроводниковых нанокристаллов, получивший название «квантовые точки» (КТ).

Квантовые точки, имеющие по трем направлениям размеры, меньшие, чем радиус экситона Бора для конкретного материала, являются перспективными для использования в качестве меток в аналитических, биологических и медицинских исследованиях благодаря уникальным флуоресцентным свойствам, обусловленным эффектом квантового пространственного ограничения. Большое распространение получили КТ, состоящие из центрального ядра на основе селенида кадмия, покрытого для улучшения флуоресцентных свойств наноболочкой из сульфида цинка (CdSe/ZnS), а также их аналоги InAs/GaAs, CdSe/ZnSe, CdTe/ZnS, CdSe/ZnS и др. или более сложные структуры типа CdSe/CdS/ZnS,

CdSe/CdZnS [15, 16]. Обычный размер КТ, включающий центральное ядро и перефирийную оболочку составляет от 2 до 10 нм.

Квантовые точки обладают эффективной фотолюминесценцией в видимом и ближнем инфракрасном диапазоне спектра, очень широкой областью поглощения в спектре возбуждения, в том числе в ультрафиолетовом диапазоне. Спектр испускания характеризуется наличием достаточно узкого максимума флуоресценции, положение которого и величина сильно зависят от размера КТ и их поверхностного покрытия. Ширина пика, не превышающая 30 нм, обусловлена некоторым разбросом в размерах КТ, получаемых в процессе синтеза и, как правило, не превышает 5–10%, что приводит к достаточно узкому симметричному пику спектра, значительно отличающемуся от спектров большинства флуоресцирующих органических молекул. При увеличении размера КТ происходит заметный сдвиг максимума испускания, что сопровождается изменением цвета окраски раствора от голубого до красного.

Квантовые точки обладают высоким квантовым выходом люминесценции (до 80%) и имеют большой коэффициент молярного поглощения (до  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) [17]. Для получения более высокого квантового выхода люминесценции центральную часть (ядро) покрывают тонким слоем другого полупроводника (оболочкой), имеющего схожую кристаллическую структуру [18].

Широкий спектр поглощения позволяет проводить облучение КТ, отличающихся размером, светом с одной и той же длиной волны, регистрируя сигнал люминесценции от каждой из них на разных длинах волн. Причем КТ по сравнению с обычными флуоресцентными красителями характеризуются очень большой величиной Стоксова сдвига, достигающего значения 300–400 нм в зависимости от длины света возбуждения. Это уникальное свойство КТ было положено в основу разработки подходов для проведения мультианализа в одной пробе, основанных на введении в антитела разных по размерам КТ в качестве меток, отличающихся по специфичности [19, 20].

КТ обладают повышенной по сравнению с органическими молекулами химической и фотостабильностью. Например, в работе [21] было показано, что КТ на основе CdSe/ZnS в сотни раз более устойчивы к фотообесцвечиванию по сравнению с широко используемым органическими флуоресцентными красителями AlexaFluor 488 и флуоресцеином. Это свойство дает возможность значительно увеличивать мощность возбуждающего светового излучения, по-

вышая предел обнаружения меченных КТ соединений. Высокая эффективность свечения КТ позволяет детектировать даже единичные объекты при использовании флуоресцентного микроскопа [22].

Наиболее распространенные способы получения КТ основаны на высокотемпературном металлоорганическом химическом синтезе в органическом растворителе, согласно методу, впервые описанному в работе на примере синтеза КТ на основе CdSe [23]. В процессе синтеза, проводимого в присутствии органических гидрофобных стабилизаторов, таких как триоктилфосфин, триоктилфосфиноксид, олеиновая кислота и др., образуются КТ, содержащие на своей поверхности гидрофобные лиганды, в связи с чем получаемые таким образом КТ хорошо растворимы в органических растворителях, но осаждаются в водных растворах [24–26]. Описаны также методы получения КТ в водных растворах при относительно низкой температуре [27].

В целях дальнейшего использования КТ в качестве меток в иммуноанализе необходимо провести их конъюгирование с белками в водной среде, для чего первоначально модифицируют сильно гидрофобную поверхность КТ введением в нее гидрофильных групп, с которыми можно осуществлять ковалентное связывание лигандов, обладающих биоспецифичностью. Как правило, используют один из трех разработанных общих подходов, заключающихся в непосредственной замене гидрофобных лигандов на гидрофильные, связывании с гидрофобными остатками КТ дополнительных амфифильных лигандов, имеющих внешние гидрофильные группы, а также силанизации поверхности КТ [28–30]. Конечным итогом такой модификации КТ должно быть образование на их поверхности гидрофильных функциональных групп, с которыми можно осуществлять последующее ковалентное связывание биомолекул. Наиболее часто для биоконъюгации используют КТ с введенными во внешний слой карбоксильными или аминогруппами. Для получения стабильных конъюгатов, содержащих прочные ковалентные связи между белками и КТ, могут быть использованы те же методы, которые широко распространены для синтеза конъюгатов антител с молекулами ферментов [31].

При использовании КТ в качестве меток антител могут быть реализованы различные варианты как гетерогенного, так и гомогенного видов иммуноанализа. Благодаря более высокой яркости КТ и возможности регистрации их при достаточно низкой концентрации, в стандартном планшетном варианте иммуноанализа модельных белков IgG мыши и про-

стат-специфического антигена удалось более, чем на порядок повысить предел обнаружения по сравнению с обычно используемыми флуоресцентными метками [32, 33].

Новыми перспективными направлениями использования КТ в качестве визуальных меток антител являются системы на основе проточного латерального иммуноанализа [34, 35], позволяющие совместить высокую чувствительность детекции меток в виде КТ, простоту и малое время проведения анализа. Использование в одном анализе КТ, конъюгированных с антителами различной специфичности, дает возможность проводить одновременный мультианализ нескольких антигенов в одной анализируемой пробе путем обработки наблюдаемых спектров флуоресценции конечных иммунокомплексов. В одной из последних опубликованных работ [36] описано использование трех КТ, различающихся по цвету флуоресценции (красный желтый, зеленый), в связи с чем было предложено оригинальное название «traffic light test» (светофор-тест) для визуального одновременного определения трех разных антибиотиков (офлоксацин, хлорамфеникол и стрептомицин) в молоке. Авторы показали, что с использованием флуориметрической детекции данный подход позволяет получать результаты в течение 10 мин с чувствительностью, в 80–200 раз превышающей аналогичные характеристики для стандартного твердофазного иммуноферментного анализа на основе данных антител.

Описаны также системы с использованием КТ для гомогенного быстрого поляризационного флуоресцентного иммуноанализа [37], хроматографического колоночного метода [38] и резонансного переноса энергии [39, 40].

### *Магнитные наночастицы*

Перспективным направлением развития быстрых методов иммуноанализа является использование магнитных наночастиц на основе окислов железа в качестве нового типа меток антител. Магнитные микрочастицы достаточно давно используют в качестве твердой фазы в гетерогенных методах иммуноанализа как в традиционном планшетном варианте, так и в проточных системах [41, 42]. Магнитные свойства таких частиц позволяют воздействием внешнего магнитного поля осуществлять быстрое и эффективное разделение связанных в иммунокомплекс компонентов, сокращать время проведения анализа за счет устранения внешнедиффузионных затруднений на границе «поверхность частицы с иммобилизованными антителами – вода» благодаря эффективному перемеще-



ванию реакционных компонентов под воздействием магнитного поля, проводить магнитную сепарацию и отмывку твердой фазы с иммунокомплексами от несвязавшихся компонентов. Существенными достоинствами магнитных меток по сравнению с оптическими являются возможность их детекции в мутных или малопрозрачных (рассеивающих свет) биологических средах и высокая стабильность. В отличие от ферментных меток они не требуют введения дополнительной стадии добавления субстрата и наработки детектируемого продукта ферментативной реакции.

Магнитные метки, как правило, представляют собой ядро из окислов железа ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$  и  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) диаметром 5–50 нм, заключенное в полимерную оболочку, что обуславливает достаточно сильные вариации в размерах образующихся частиц в пределах 20–5000 нм. Поверхность оболочки содержит функциональные реакционноспособные группы, с которыми возможно ковалентное связывание молекул антител для получения соответствующих специфических конъюгатов для иммуноанализа. Наноразмеры магнитного ядра приводят к появлению уникальных магнитных свойств таких частиц, проявляющихся в отсутствии эффекта остаточной намагниченности. Такие наноразмерные магнитные частицы, получившие название «суперпарамагнитные» [43], в отсутствие сильных магнитных полей не агломерируют в водной среде, что создает предпосылки для их использования в качестве меток в разных схемах гомогенного и гетерогенного анализов. Новые возможности применения в иммуноанализе магнитных наночастиц в качестве меток, возникли в результате развития высокочувствительных методов их детекции при чрезвычайно низкой концентрации на основе новых физических принципов регистрации и создание соответствующего приборного оборудования [44–46]. Разработаны системы определения некоторых белковых антигенов с чувствительностью, на три порядка превышающей чувствительность иммуноферментных систем при использовании детекции магнитных меток на основе гигантского магнитного сопротивления [47]. Весьма интересны новые возможности для повышения чувствительности в иммуноанализе на основе детекции магнитного сигнала с помощью так называемых сверхпроводящих квантовых интерференционных датчиков (СКВИД) [48], метода детектирования магнитных наночастиц по их нелиней-

ному перемагничиванию, основанного на воздействии на наночастицы переменного магнитного поля на двух разных частотах. По данным авторов, предел обнаружения метода не уступает радиоизотопному методу регистрации магнитных частиц, основанному на добавлении при синтезе частиц радиоактивных изотопов железа  $^{59}\text{Fe}$  с последующей регистрацией сопутствующего  $\gamma$ -излучения [49, 50]. На основе такой системы магнитных наночастиц разработан анализ для высокочувствительного количественного определения стафилококковых токсинов в продуктах питания [51].

В последнее время появились работы по использованию магнитных наночастиц в системах латерального проточного иммуноанализа для проведения высокочувствительного экспресс-определения разных веществ и количественных систем детекции, основанных на рассмотренных принципах [52]. Несомненным достоинством таких систем является сочетание экспрессности, чувствительности и возможности точной количественной регистрации результатов анализа.

Развитию новых экспериментальных подходов в экспресс-методах иммуноанализа в последнее время посвящено много работ. В настоящее время разрабатываемые новые экспресс-методы позволяют полностью перейти от качественного анализа по принципу «да-нет» к получению точных количественных данных по одновременному определению нескольких анализируемых веществ в сложных смесях и биологических жидкостях с использованием портативных считывающих и регистрирующих устройств и передачей данных посредством новейших IT-технологий. Весьма перспективными являются разработки новых портативных устройств, позволяющих с использованием простых иммунохроматографических систем проводить пациентам либо самодиагностику, обрабатывая результаты анализа с помощью обычного смартфона, снабженного специальной встроенной программой, либо отправлять данные в специализированную лабораторию для их последующей обработки, постановки диагноза и получения медицинского заключения [53, 54]. Несомненно, исследования в данной области будут активно продолжаться и приведут уже в ближайшее время к созданию простых, недорогих, портативных биосенсорных устройств, доступных для массового индивидуального использования.

Работа поддержана МОН РФ в рамках раздела «Организация проведения научных исследований» государственного задания № 2014/113, код анкеты 2086.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Piia von Lode* // Clin. Chem. 2005. Vol. 38. P. 591.
2. *Wilson R.* // Chem. Soc. Rev. 2008. Vol. 37. P. 2028.
3. *Oliver C.* // Methods in Molecular Biology, 2010. Vol. 588. P. 369.
4. *Liu X., Atwater M., Wang J., Huo Q.* // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2007. Vol. 58, P. 3
5. *Mirkin C.A., Letsinger R.L., Mucic R.C., Storhoff J.J.* // Nature. 1996. Vol. 382. P. 607.
6. *Sharma P., Kumar B., C. Suri C.R.* // Environment and Pollution. Vol. 1. P. 12.
7. *He L., Musick M.D., Nicewarner S.R., Salinas F.G., Benkovic S.J., Natan M.J., Keating C.D.* // J. Am. Chem. Soc. 2000. Vol. 122. P. 9071.
8. Lateral Flow Immunoassay (Eds. R.C. Wong, H.Y. Tse). 2009. N.Y., 2009.
9. *Geertruida A.* // Anal. Bioanal. Chem. 2009. Vol. 393. P. 569.
10. *Gorovits B.M., Osipov A.P., Egorov A.M.* // J. of Immunol. Meth. 1993. Vol. 157. P. 11.
11. *Yakovleva E.A., Andreeva I.P., Grigorenko V.G., Osipov A.P.* // Moscow University Chemistry Bulletin. 2011. Vol. 66. P. 356.
12. *Yakovleva E.A., Andreeva I.P., Grigorenko V.G., Egorov A.M., Osipov A.P.* // Moscow University Chemistry Bulletin. 2012. Vol. 67. P. 249.
13. *Faulstich K., Gruler R., Eberhard M., Lentzsch D., Haberstroh K.* // Lateral Flow Immunoassay (Eds. R.C. Wong, H.Y. Tse). N.Y., 2009. P. 157.
14. *Zaiko V., Martinkina L., Pteriopolo N., Kutvitsky V., Tugolukov A., Egorov E., Voloshchuk S., Starovoitova T., Toguzov R., Vengerov Yu.* // Clin. Lab. 2008. P. 273.
15. *Baranov A.V., Rakovich Yu.P., Donegan J.F., Perova T.S., Moore R.A., Talapin D.V., Rogach A.L., Masumoto Y., Nabiev I.* // Phys. Rev. B. 2003. Vol. 68. P. 165306.
16. *Reiss P., Protière M., Li L.* // Small. 2009. Vol. 5. P. 154.
17. *Yu W.W., Qu L., Guo W., Peng X.* // Chem. Mater. 2003. Vol. 15. P. 2854.
18. *Hines M.A., Guyot-Sionnest P.* // J. Amer. Chem. Soc. 1993. Vol. 115. P. 468.
19. *Goldman E.R., Clapp A.R., Anderson G.P., Uyeda H.T., Mauro J.M., Medintz I.L., Mattouossi H.* // Anal. Chem. 2004. Vol. 76. P. 684.
20. *Hahn M.A., Tabb J.S., Krauss T.D.* // Anal Chem. 2005. Vol. 77. P. 4861.
21. *Sukhanova A., Venteo L., Devy J., Artemyev M., Oleinikov V., Pluot M., Nabiev I.* // Laboratory Investigations. 2002. Vol. 82. N 9. P. 1259.
22. *Lupton J.M., Müller J.* Fluorescence spectroscopy of single CdS nanocrystals / Semiconductor nanocrystal quantum dots, synthesis, assembly, spectroscopy and applications. (Ed. A.L. Rogach). N.Y., 2008. P. 311.
23. *Murray C.B., Norris D.J., Bawendi M.G.* // J. Amer. Chem. Soc. 1993. Vol. 115. P. 8706.
24. *Murray C.B., Norris D.J., Bawendi M.G.* // J. Am. Chem. Soc. 1993. Vol. 115. P. 8706.
25. *Yu W., Qu L., Guo W., Peng X.* // Chem. Mater. 2003. Vol. 15. P. 2854.
26. *Peng X., Wickham J., Alivisatos A.P.* // J. Am. Chem. Soc. 1998. Vol. 120. P. 5343.
27. *Weng J., Song X., Li L., Qian H., Chen K., Xub X., Cao C., Rena J.* // Talanta. 2006. Vol. 70. P. 397.
28. Semiconductor nanocrystal quantum dots: synthesis, assembly, spectroscopy and applications. (Ed. A.L. Rogach). N.Y., 2008. P. 311.
29. *William W. Yu., Chang E., Drezek R., Vicki L. Colvin V.L.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 2006. N.Y., 2008. P. 348. P. 781.
30. *Petryayeva E., Algar R., Medintz I.L.* // Applied Spectroscopy. 2013. Vol. 67. P. 215.
31. *Егоров А.М., Осипов А.П. и др.* // Теория и практика иммуноферментного анализа. М., 1991.
32. *Yang J., Dave S.R., Gao X.* // J. Am. Chem. Soc. 2008. Vol. 130. P. 5286.
33. *Yang J., Sena M.P., Gao X.* // Reviews in Fluorescence . 2009. Vol. 2007. P. 139.
34. *Zhexiang Z., Du D., Wang J., Smith J.N., Timchalk C., Li Y., Lin Y.* // Anal. Chem. 2010. Vol. 82. P. 5125.
35. *Bai Y., Tian C., Wei X., Wang Y., Wang D., Shi X.* // RSC Advances. 2012. Vol. 2. P. 1778.
36. *Taranova N.A., Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* // Biosensors and Bioelectronics. 2015. Vol. 63. P. 255.
37. *Tian J., Liu R., Zhao Y., Peng Y., Hong X., Xu Q., Zhao S.* // Nanotechnology. 2010. Vol. 21. P. 305101.
38. *Beloglazova N.V., Speranskaya E.S., De Saeger S., Abé S., Goryacheva I.Yu.* // Anal. Bioanal. Chem. 2012. Vol. 403. P. 3013.
39. *Huang X., Li L., Qian H., Dong C., Ren J.* // Angew. Chem. Int. Ed. 2006. Vol. 45. P. 5140.
40. *Sarkar S., Bose R., Jana S., Jana N.R., Pradhan N.* // J. Phys. Chem. Lett. 2010. Vol. 1. P. 636.
41. *Aguilar-Arteaga K., Rodriguez a J.A., Barrado E.* // Analytica Chimica Acta. 2010. Vol. 674. P. 157.
42. *Choi J.-W., Oh K.W., Thomas J.H., Heineman W.R., Halsall H.B., Nevin J.H., Helmicki A.J., Henderson H.T., Ahn C.H.* // Lab. Chip. 2001. Vol. 2. N 1. P. 27.
43. *Bean C.P.* // J. Appl. Phys. 1955. Vol. 26. N 11. P. 1381.
44. *Rife J.C., Miller M.M., Sheehan P.E., Tamanaha C.R., Tondra M., Whitman L.J.* // Sens. Actuators A. 2003. Vol. 107. P. 209.
45. *Baselt D.R., Lee G.U., Natesan M., Metzger S.W., Sheehan P.E., Colton R.J.* // Biosens. Bioelectron. 1998. Vol. 3. P. 731.
46. *Osterfeld S.J., Yu.H., Gaster R.S., Caramuta S., Xu L., Han S. J., Hall D.A., Wilson R.J., Sun S.H., White R.L., Davis R.W., Pourmand N., Wang S.X.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 2008. Vol. 105. N 52. P. 20637.
47. *Srinivasan B., Li Y.P., Jing Y., Xu Y.H., Yao X.F., Xing C., Wang J.P.* // Angew. Chem. 2009. Vol. 48. N 15. P. 2764.
48. *Carvalho H.R., Bruno A.C., Louro S.R.W., Costa Ribeiro P.* // Applied Superconductivity IEEE Transactions on. 2007. Vol. 17. P. 820.
49. *Nikitin P.I., Vetoshko P.M., Ksenevich T.I.* // J. Magn. Magn. Mater. 2007. Vol. 311. N 1. P. 445.

50. Nikitin M.P., Torno M., Chen H., Rosengart A., Nikitin P.I. // *J. Appl. Phys.* 2008. Vol. 103. N 7. P. 07A304.
51. Orlov A.V., Khodakova J.A., Nikitin M.P., Shepelyakovskaya A.O., Brovko F.A., Laman A.G., Grishin E.V., Nikitin P.I. // *Anal. Chem.* 2013. Vol. 85. P. 1154.
52. Taton K., Johnson D., Guire P., Lange E., Tondra M.J. // *J. of Magnetism and Magnetic Materials.* 2009. Vol. 321. N 10. P. 1679.
53. Zangheri M., Cevenini L., Anfossi L., Baggiani C., Simoni P., Di Nardo F., Roda A. // *Biosensors and Bioelectronics.* 2015. Vol. 64. P. 63.
54. Lee S., Kim G., Moon J. // *Sensors.* 2013. Vol. 13. P. 5109.

Поступила в редакцию 10.10.14

## METAL NANOPARTICLES AS A NEW TYPE OF LABELS IN RAPID IMMUNOASSAY METHODS

A.P. Osipov<sup>1</sup>, J.V. Samsonova<sup>2</sup>, S.E. Kondakov<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>National University of Science and Technology "MISIS"; <sup>2</sup>M.V.Lomonosov Moscow State University, Chemistry Faculty, Moscow)

**The brief overview of the main directions of development of rapid immunoassays. Emphasis is placed on the principles and functioning of the lateral flow immunoassay systems. The basic properties, advantages and benefits of metal nanoparticles as a new class of labels used in immunochemical analysis. The possibility of using gold nanoparticles, quantum dots, magnetic nanoparticles and the development of new highly sensitive detection systems are discussed.**

**Key words:** lateral flow immunoassay, gold nanoparticles, quantum dots, magnetic nanoparticles.

**Сведения об авторах:** Осипов Александр Павлович – ст. науч. сотр. кафедры функциональных наносистем и высокотемпературных материалов НИТУ МИСиС, канд. хим. наук (APOsipov@mail.ru); Самсонова Жанна Васильевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (jvs@enz.chem.msu.ru); Кондаков Сергей Эмильевич – вед. науч. сотр. кафедры функциональный наносистем и высокотемпературных материалов НИТУ МИСиС, докт. фарм. наук (ksekse@mail.ru).