

2
НОМЕР



ISSN 2304-9081

Электронный журнал
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УрО РАН



2016

УЧРЕДИТЕЛИ

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УрО РАН

© Коллектив авторов, 2016

УДК:616.915:616.071-097

М.Б. Раев^{1,2}, П.В. Храмцов², М.С. Бочкова¹, В.П. Тимганова¹, С.А. Заморина^{1,2}

БИОТЕХНОЛОГИЯ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

² Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Цель. Разработка технологии конструирования неинструментальных диагностических тест-систем на основе углеродных наночастиц с функционализированной поверхностью.

Материалы и методы. Функциональные свойства диагностикумов оценивали по способности специфически связывать иммобилизованные на твердой фазе соответствующие лиганды. Твердофазные реагенты (иммуносорбенты) синтезировали в соответствии с задачами получения максимальной чувствительности детекции и физическими возможностями подложки. Стабильность иммуносорбентов оценивали по изменению аналитических характеристик в процессе хранения в прямом сравнении с аналогичными, синтезированными *in situ*.

Результаты. Сконструирован ряд тест-систем, пригодных для неинструментальной диагностики инфекционных заболеваний: ВИЧ-1 и 2, корь, коклюш, дифтерия, столбняк, псевдотуберкулез, сифилис и др. При этом апробирована единая аранжировка детекции с использованием одного диагностикума, конъюгата G белка с углеродными наночастицами. Отработаны технологии синтеза иммуносорбентов для каждой из тест-систем с оптимальными аналитическими показателями.

Заключение. Сконструированные тест-системы демонстрируют привлекательные аналитические и процедурные качества, подтверждая пригодность углеродных наноконъюгатов для использования в системах эффективной неинструментальной диагностики широкого спектра инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: биотехнология, инфекционные заболевания, углеродные наночастицы, иммуносорбенты, G белок.

М.Б. Rayev^{1,2}, P.V. Khramtsov², M.S. Bochkova¹, V.P. Timganova¹, S.A. Zamorina^{1,2}

BIOTECHNOLOGY OF CARBON NANOPARTICLES IN THE INFECTIOUS DISEASES DIAGNOSIS

¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia

² Perm State National Research University, Perm, Russia

Objective. Development of technology for the construction of non-instrumental diagnostic test systems based on carbon nanoparticles with functionalized surface.

Materials and methods. Functional properties of diagnostic preparations were evaluated by their ability to bind specifically to immobilized corresponding ligands on a solid phase. Solid-phase reactants (immunosorbents) were synthesized in accordance with the objectives to maximize detection sensitivity and physical substrate features. Stability was evaluated by changes in immunosorbents analytical characteristics during storage in direct comparison with the same synthesized *in situ*.

Results. A series of test kits, which are suitable for non-instrumental diagnostics of infectious diseases (HIV-1 and 2, measles, whooping cough, diphtheria, tetanus, pseudotuberculosis, syphilis, etc.), were designed. At the same time a unified arrangement of detection using the only

diagnostic preparation: the conjugate G protein with carbon nanoparticles, was approved. Immunosorbents synthesis technology for each of the test systems with optimal analytical performance developed.

Conclusion. Designed test systems demonstrate attractive analytical and operational characteristics, confirming the suitability of carbon nanoconjugates for use in systems of effective non-instrumental diagnostics of a wide range of infectious diseases.

Keywords: biotechnology, infectious diseases, carbon nanoparticles, immunosorbents, protein G.

Введение

Наночастицы и нанотехнологии – термины, прочно вошедшие в современную науку как фундаментальную, так и прикладную, и ассоциируемые, в первую очередь, с физикой, механикой, оптикой, микроэлектроникой, строительными материалами, даже со швейной промышленностью [1-3]. В этих областях нашли свое применение уникальные свойства наноматериалов, в которых размеры составляющих их частиц хотя бы в одном геометрическом измерении не превышают 100 нм.

Однако не меньшее значение могут иметь наноматериалы, частицы которых при тех же размерах в дополнение к их природным характеристикам подвергнуты какой-либо модификации, в частности – функционализации [4-6], то есть процессу, при котором поверхность частиц приобретает способность к исполнению каких-то функций, вовсе не предусмотренных природой. Это направление непосредственно связано с передовыми биомедицинскими исследованиями [7].

На первом плане из наиболее известных на сегодня разработок стоят исследования, связанные с адресной доставкой лекарственных (и не только) соединений в очаг патологического процесса в организме человека. Однако следует отметить, что мировой рынок препаратов не изобилует такими средствами. Здесь наблюдается множество проблем, и одна из них – технологическая, связанная со способами связи пригодных (кстати, и этот вопрос открытый, что считать пригодными) наночастиц с биологически активными соединениями. Не менее важно разобраться с возможными последствиями введения в макроорганизм таких, не вполне свойственных для человеческого организма, объектов.

Другим аспектом применения функционализированных наночастиц, является их использование в качестве детектирующих реагентов в диагностических тест-системах [8-10]. Такой реагент проявляет себя как с позиции

репортерной метки, способной за счет собственных ресурсов генерировать какой-либо сигнал, так и с позиции «ответственности» генерируемого сигнала за соответствие заданной мишени, из-за специфичности взаимодействия биологически активных соединений, использованных для функционализации частиц. В качестве таких меток применяются различные микро- и наночастицы природного и синтетического происхождения: эритроциты, липосомы, латексные частицы, частицы коллоидного серебра, золота, оксида железа III, двуокиси кремния, а также сера, теллур и др. [11-15]. Понятно, что ни одни из них не отвечают требованиям, предъявляемым к нанообъектам с точки зрения их функциональной уникальности, которая принципиально должна отличать их от микро- и макрообъектов, из них же состоящих. С другой стороны, трудно возражать против применения терминов нанотехнология и нанобиотехнология, когда речь идет о разработке и использовании технологических приемов, приводящих к изменению или дополнению свойств наночастиц за счет биологической модификации их поверхности.

В контексте нашей работы планируется обсудить биотехнологические решения, связанные с созданием неинструментальных, то есть аппаратно независимых в своей процедурной аранжировке тест-систем, в которых детектирующими или визуализирующими результат анализа реагентами будут являться оптически контрастные конъюгаты, состоящие из наночастиц углерода с размером менее 100 нм и аффинных соединений, прочно с ними связанных и способных при этом специфично взаимодействовать с молекулами заданных мишеней. Очевидными требованиями при этом должны стать механическая прочность метки (частицы), её исключительная оптическая контрастность, от чего во многом зависит эффективность визуализации, и самое главное, – прочность и надежность связи между компонентами конъюгата: частицей и аффинным соединением. Указанные выше метки в той или иной мере не могут отвечать приведенным требованиям. Ограничения определяются либо природой самих частиц, либо отсутствием надежно апробированных технологий, позволяющих создать такие реагенты.

В работе мы остановили свой выбор на частицах коллоидного углерода, которые получаем самостоятельно конденсацией из пламени горящего толуола, разработав соответствующую технологию. Как показали исследования, эти частицы имеют размер 90-100 нм, а физическую прочность и макси-

мальную цветовую контрастность им обеспечивает природа. На данном этапе требуется разработать технологию функционализации поверхности частиц аффинными соединениями, способными к специфическому связыванию с соответствующими мишенями, и оценить возможность использования таких конструкций в системах аналитического тестирования с характеристиками, обеспечивающими диагностическую значимость получаемого результата.

В ходе многолетних исследований нами были синтезированы и исследованы углеродные конъюгаты, в качестве функционализирующих соединений которых были использованы: моно- и поликлональные антитела, стрептавидин, биотинилированные пептиды, бактериальные белки, нуклеиновые кислоты. В представляемой работе речь пойдет только о конъюгате, в состав которого входит G белок стрептококков, известный своей способностью относительно специфично взаимодействовать с Fc фрагментами иммуноглобулинов класса G человека и большинства высших животных. Именно это обстоятельство определило возможность использования таких конъюгатов при конструировании систем серологического анализа.

Цель – разработка технологии конструирования неинструментальных диагностических тест-систем на основе углеродных наночастиц с функционализированной поверхностью для диагностики инфекционных заболеваний.

Материалы и методы.

Материалы: толуол, гептан, гексан – “Экрос” (Россия), ацетон, этанол, метанол, диметилформамид, диметилсульфоксид – “Вектон” (Россия), белок G, бычий сывороточный альбумин (БСА), человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) – Sigma (США), глутаральдегид – AppliChem (Германия), хлорид натрия, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат натрия, глицерин – Panreac (Испания), азид натрия, фиколл 400 – Fluka (Германия), диализные мешки – Serva (Германия), сефароза CL-6B, хроматографическая колонка ХК 16/40 – Pharmacia Fine Chemicals (Швеция), проводящая углеродная липкая лента шириной 6 мм для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) – Ted Pella Inc. (США), кремниевые пластины для СЭМ, 5×5 мм – SPI Supplies (США), кантилеверы Medium-soft Silicon Cantilever Classic – Olympus (Япония). *Приборы:* спектрофотометр Shimadzu UV-VIS UVmini 1240 (Япония), сканирующий электронный микроскоп FEI NOVAscope 600 (США), атомно-силовой микроскоп Asylum Research (США), ультразвуковой дезинтегратор MSE

Soniprep 150 (Великобритания), планшетный спектрофотометр Biohit PB 800 (Финляндия). Буферный раствор: 0,15 М раствор NaCl, забуференный 0,015 М Na-фосфатами, содержащий 0,1 % азид натрия pH 7,25 (ЗФР), 0,15 М раствор NaCl, забуференный 0,015 М Na-фосфатами, содержащий 0,1% Твина-20 и 0,1 % азид натрия pH 7,25 (ЗФРТ). Мембрана из нитроцеллюлозы с диаметром пор 0,45 мкм – “Bio-Rad” (США).

Методы: углеродные наночастицы получали конденсированием из пламени горящего толуола на стеклянной или металлической поверхности. Для очистки получаемого углерода от недоокисленных продуктов его суспендировали в десятикратном по массе количестве толуола и кипятили в колбе с обратным холодильником в течение 30 мин, остужали, отфильтровывали на фильтре Шотта. Далее процедуру повторяли 5 раз без нагревания до полного исчезновения окраски в растворителе, после чего отфильтрованный углерод пятикратно отмывали при комнатной температуре диметилформамидом и гексаном до полного обесцвечивания протекающих через очищаемый углерод растворителей. Конечный продукт высушивали под вакуумом для освобождения от следов связанных органических растворителей и дополнительно прокаливали до постоянной массы в сушильном шкафу при 200–300°C в течение 12-24 ч. Получаемый подобным способом чистый аморфный углерод представлял собой матово-черный лиофильный порошок, нерастворимый в доступных известных растворителях: толуоле, гептане, гексане, ацетоне, этаноле, метаноле, диметилформамиде, диметилсульфоксиде. Для визуализации частиц аморфного углерода была использована СЭМ. Исследование образца аморфного углерода показало, что он представляет собой частицы сферической или близкой к сферической формы, линейные размеры которых лежат в диапазоне 40–70 нм (рис. 1).

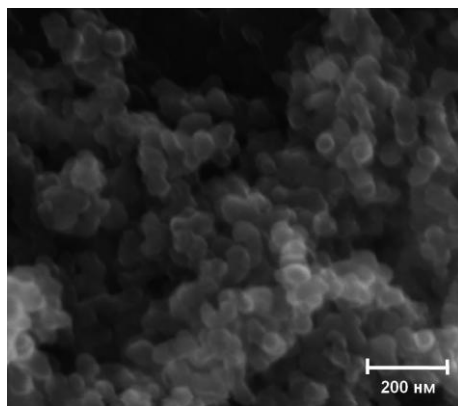


Рис. 1. СЭМ-изображение частиц аморфного углерода.

Функционализацию углеродных наночастиц G белком осуществляли двух- и одностадийными методами синтеза (рис. 2).



Рис. 2. Схемы двухэтапного (А) и одноэтапного (Б) синтезов углеродных диагностикумов.

Примечание: Цифрами обозначены номера этапов.

В варианте двухстадийного синтеза 1 г аморфного углерода суспендировали в 19 мл 2 % БСА в ЗФР в течение суток при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре (КТ). Концентрация углерода в пересчете на сухой вес составила 5 % (здесь и далее указаны массовые доли углеродных частиц). Полученную суспензию гидрофилизированных частиц подвергали ультразвуковой дезинтеграции при частоте 22 кГц (диаметр зонда 6 мм) в ячейке с охлаждающей рубашкой без перерывов. Общее время озвучивания составило 1 ч. С целью удаления оставшихся крупных частиц озвученную суспензию центрифугировали 5 мин при 1600g при КТ. Затем порцию супернатанта объемом 4,5 мл инкубировали в течение 40 мин при КТ с равным объемом 25% раствора глутарового альдегида при мягком перемешивании на ротационном встряхивателе (25 об/мин). По окончании инкубации смесь центрифугировали 5 мин при 1600g в условиях КТ. Далее проводили хроматографию супернатанта на колонке с Sepharose CL-6B (объем геля 160 мл, колонка ХК 16/40, элюирующий буфер: ЗФР, скорость элюции 80 мл/ч) для удаления не связавшегося БСА и глутарового альдегида. Вышедшие в холостом объеме фракции, содержащие углеродные частицы, объединяли и концентрировали до объема 4,5 мл. Для этого их переносили в

диализный мешок диаметром 16 мм. Мешок помещали в пластиковую ванночку, заполненную фикоλλом 400, и присыпали сверху дополнительным слоем фиколла. Ванночку ставили на качалку на 3–4 ч. Полученную концентрированную суспензию активированных глутаральдегидом углеродных частиц центрифугировали 5 мин при 1600g при КТ. Далее суспензию объемом 4,5 мл инкубировали с 0,5 мл белка G с концентрацией 10 мг/мл в течение ночи на ротационном встряхивателе (25 об/мин) при КТ, после чего центрифугировали 5 мин при 1600g при КТ. Не связавшийся белок G удаляли гель-хроматографией на колонке с Sepharose CL-6B (объем геля 100 мл, колонка ХК 16/40, элюирующий буфер: 3ФР, скорость элюции 80 мл/ч). Вышедшие в холостом объеме фракции подвергали спектрофотометрическому исследованию. Для этого аликвоты объемом по 100 мкл помещали в лунки круглодонного 96-луночного планшета и регистрировали оптическую плотность при помощи планшетного ридера при 450 нм. Фракции с оптической плотностью выше 0,6 объединяли, добавляли БСА и глицерин до конечной концентрации 1 и 20% соответственно.

Общая схема аранжировки дот-анализа представлена на рисунке 3.

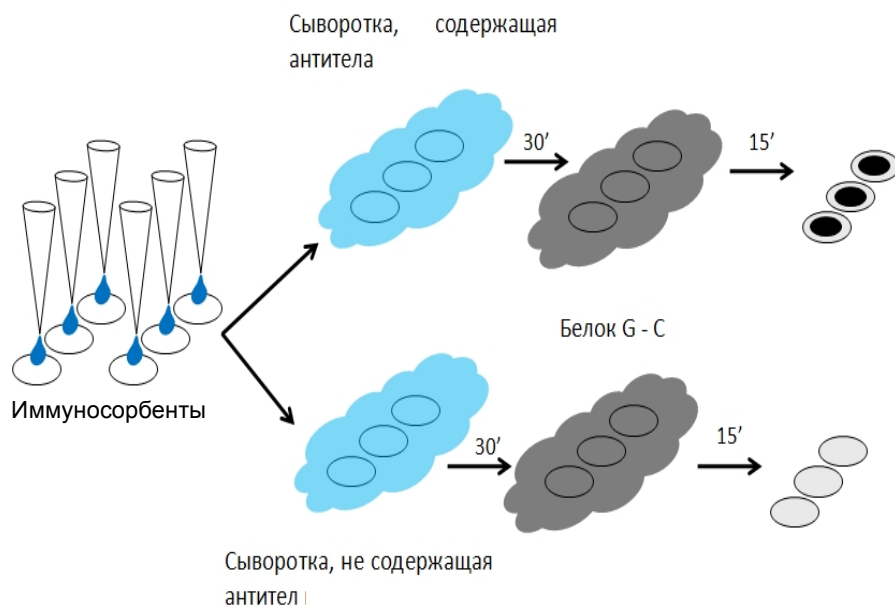


Рис. 3. Схема аранжировки дот-анализа.

Одностадийный синтез конъюгатов основан на использовании в качестве пептизирующего полимера не БСА, а того же белка, что служит аффинным соединением. В ходе синтеза к 2% раствору G-белка в 3ФР добавляли 5% суспензию частиц углерода при тех же условиях, что и в двухэтапном

синтезе. Продолжительность полной пептизации частиц при КТ составляла 30-36 часов. Полученную суспензию озвучивали и центрифугировали. Добавляли к полученному реагенту равный объем 25% глутарового альдегида и осуществляли инкубацию в течение 100 мин, что объединяло процессы стабилизации, активации и конъюгирования. Финальным этапом являлась гель-фильтрация на колонке с Sepharose CL-6B для удаления избытка глутаральдегида и белка. Все условия хроматографии повторяли уже описанные для двухэтапного синтеза [16, 17].

Результаты и обсуждение

Представленные результаты предназначены проиллюстрировать, как удачное биотехнологическое решение способно обеспечить надежным продуктом целое направление в сфере биомедицинской аналитики.

ВИЧ-диагностика. Тест-система для определения антител к ВИЧ-1,2.

В качестве иммуносорбентов использовали нитроцеллюлозные полоски с размером пор 0,45 мкм с нанесенными на них основными антигенными детерминантами ВИЧ-1 и ВИЧ-2, продукция генов *envI*, *gagI*, *polI* и *envII* в качестве анти-лигандов, а также внутренних положительного (IgG человека) и отрицательного (ЧСА) контролей.

Для оценки уровня чувствительности детекции углеродным конъюгатом в сравнении с ферментным, используемым в отечественном наборе «БЛОТ-ВИЧ», в свое время выпускаемом БТК «Биосервис», Россия, использовали смесь сывороток инфицированных пациентов в серийных двукратных разведениях. После тридцатиминутной инкубации иммуносорбентов с образцами разведения сывороток и трехкратной промывки ЗФРТ осуществляли оценку уровня связавшихся с анти-лигандами антител инкубацией с углеродным и ферментным конъюгатами в прямом сравнении. Результаты представлены на рис. 4.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу детекции углеродным конъюгатом, чувствительность которого в представленном тестировании в 8 раз превышает чувствительность ферментного диагностикума. Дополнительную привлекательность составляет техническая простота аналитической процедуры. В отличие от ферментной детекции углеродная не требует стадии проявления самой метки.

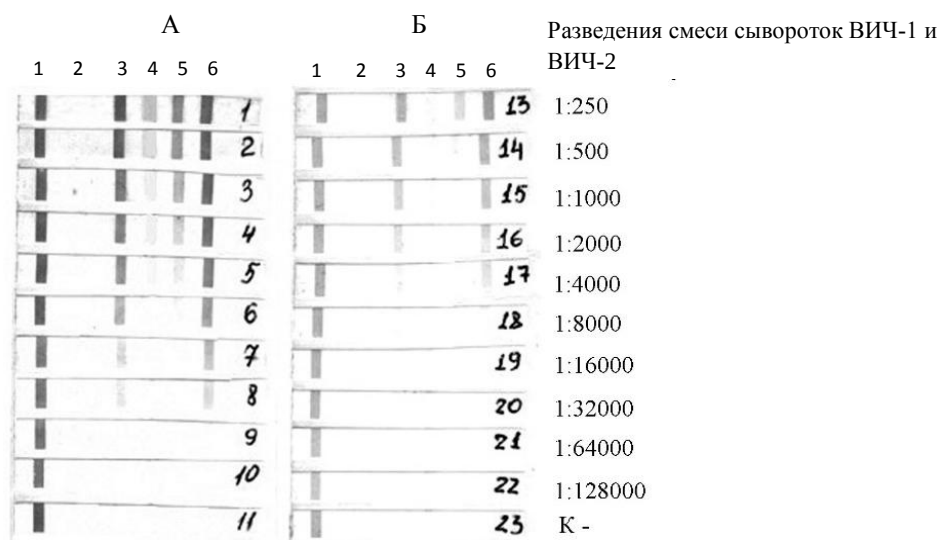


Рис. 4. Сравнительное определение антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 при детекции углеродным (А) и ферментным (Б) конъюгатами.

Примечание: К- - отрицательный контроль (сыворотка, не содержащая антител к ВИЧ-1,2); 1 – внутренний положительный контроль; 2 – внутренний отрицательный контроль; 3 – envII; 4 – polII; 5 – gagI; 6 – envI.

Диагностика коревой инфекции. Тест-система для определения антител к вирусу кори.

На диски из нитроцеллюлозной мембраны с диаметром пор 0,45 мкм сорбировали коревой антиген, представлявший собой инактивированный препарат вируса кори вакцинного штамма Ленинград-16 (СПб НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера). Антиген сорбировали в концентрации 10 ТЦД₅₀ (тканевых цитопатогенных доз), разведенный в ЗФР, после чего диски высушивали. В качестве модельных образцов сывороток крови использовали пул высокотитражных сывороток вакцинированных детей (позитивный образец) и пул сывороток, не содержащих антитела к вирусу кори (негативный образец). Инкубировали в течение 30 минут с серийными двукратными разведениями позитивного и негативного образца в ЗФРТ, начиная с разведения 1:100. По окончании инкубации диски промывали ЗФРТ и проводили детекцию противокоревых антител углеродным диагностикумом на основе G белка в течение часа.

Чувствительность модельной системы определения противокоревых антител в позитивном образце составила 1:3200. В негативном образце сигнала не обнаружено (рис. 5).



Рис. 5. Определение противокоревых антител углеродным конъюгатом.

Примечание: белой точкой помечена последняя визуализируемая точка в ряду серийных разведений высокотитражных сывороток вакцинированных детей; НС – негативная сыворотка.

Диагностика псевдотуберкулеза. Тест-система для определения антител к *Yersinia pseudotuberculosis*

В качестве основы твёрдофазного реагента использовали мембрану из нитроцеллюлозы с диаметром пор 0,45 мкм, с сорбированным на ней токсином *Yersinia pseudotuberculosis* в концентрации 0,001 мг/мл (комплекс видоспецифичных иммуногенных белков, полученных из музейного штамма 512 *Y. pseudotuberculosis*), который был любезно предоставлен сотрудниками научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии Сибирского отделения РАМН, г. Владивосток. После подсушивания мембраны помещали в лунки планшета, заполненные различными сыворотками, содержащими антитела к родоспецифическим антигенам возбудителей псевдотуберкулеза, эшерихиоза, сальмонеллеза, иерсиниоза, с серийным разведением, кратным двум, начиная с разведения 1:500. Учитывая, что возбудители псевдотуберкулеза, кишечного иерсиниоза, эшерихиоза и сальмонеллеза относятся к одному семейству *Enterobacteriaceae*, но к разным родам/видам, кроме псевдотуберкулеза и иерсиниоза, в эксперименте оценивали перекрестные реакции антигена *Y. pseudotuberculosis* с вышеуказанными сыворотками. В качестве внешнего отрицательного контроля аналогично подготовленные мембраны твёрдофазного реагента вносили в лунки с сывороткой здорового донора в разведении 1:200 и ЗФР. Время инкубации составляло 30 мин, после чего мембраны промывали ЗФРТ и осуществляли детекцию конъюгатом Г-белок/углерод. Результат оценивали визуально по черному окрашиванию зоны специфического связывания углеродного диагностикума (рис. 6).

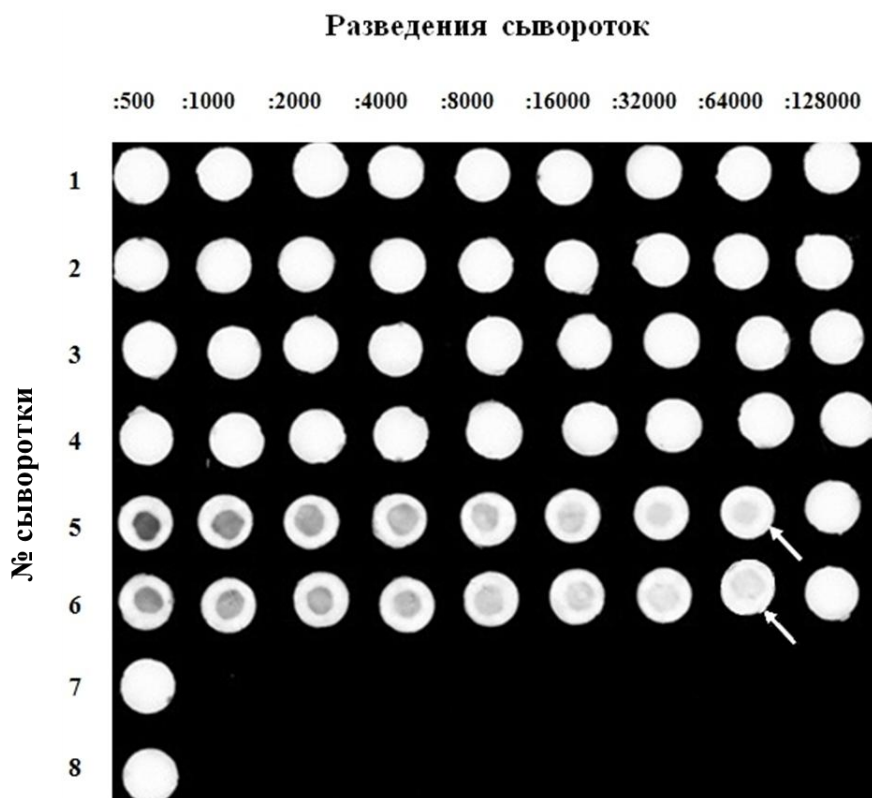


Рис. 6. Оценка специфичности определения антител к *Y. Pseudotuberculosis*.

Примечание: Анализируемые лиганды: 1 – сыворотка агглютинирующая эшерихиозная; 2 – сыворотка сальмонеллезная для реакции агглютинации; 3 – сыворотка кишечно-иерсиниозная, контрольная, титр антител 1:6400; 4 – сыворотка кишечно-иерсиниозная, контрольная, титр антител 1:3200; 5 – сыворотка псевдотуберкулезная, контрольная, I серовар, титр антител 1:6400; 6 – сыворотка псевдотуберкулезная, контрольная, III серовар; 7 – сыворотка здорового донора; 8 – ЗФРТ. Стрелка указывает последнюю визуализируемую точку.

Результаты анализа специфичности (рис. 6) показывают, что при чувствительности системы определения антител в псевдотуберкулезной сыворотке – 1:32000-1:64000 с сыворотками, содержащими антитела к антигенам других представителей семейства *Enterobacteriaceae*, в том числе к *Y. enterocolitica*, положительных реакций не выявлено, что свидетельствует о видоспецифическом характере сконструированного диагностикума.

Установлено, что разработанный неинструментальный способ диагностики псевдотуберкулеза путем прямой визуализации образующегося в ходе специфического взаимодействия иммунного комплекса, состоящего из используемого в качестве антигена белков *Y. pseudotuberculosis* и соответствующих антител, позволяет определять не только антитела к возбудителю псевдотуберкулеза сероварианта I, но и других серовариантов (II–VIII). Это значительно расширяет диагностический диапазон предлагаемого способа

диагностики.

Диагностика эффективности АКДС-вакцинации. Тест-система для единовременного определения антител к возбудителям коклюша, дифтерии, столбняка.

Оценка содержания в крови вакцинированных лиц антител против компонентов вакцины является одним из основных методов контроля над эффективностью иммунизации. В ряде случаев, в частности в отношении вакцинации против дифтерии и столбняка, концентрация иммуноглобулинов однозначно коррелирует с защищенностью от инфекции.

На основе углеродного диагностикума была сконструирована дот-иммуноаналитическая тест-система, предназначенная для одновременной полуколичественной и качественной детекции противодифтерийных, противостолбнячных и противокклюшных антител в сыворотке крови привитых (рис. 7).

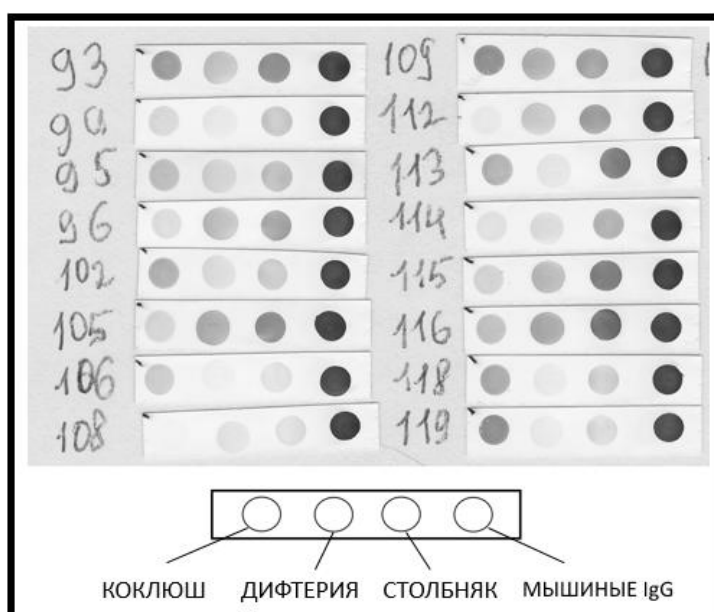


Рис. 7. Тест-полоски с окрашенными точками при дот-иммуноанализе.

Примечание: В нижней части рисунка – схема сорбции анти-лигандов на тест-полоску.

В качестве иммуносорбента использовали полоски из нитроцеллюлозной мембраны с сорбированными в форме точек антигенами возбудителей коклюша, дифтерии, столбняка и мышиными IgG в качестве внутреннего положительного контроля. Анализ осуществляли следующим образом. Тест-полоски инкубировали с сыворотками крови вакцинированных лиц, разведенными 1:40 в течение получаса. После промывки иммуносорбент выдер-

живали в углеродном диагностикуме в течение 60 минут, затем промывали, высушивали и сканировали. Интенсивность окрашивания точек на поверхности твердой фазы пропорциональна содержанию соответствующих антител в образце сыворотки крови (рис. 7). Интенсивность окрашивания оценивали при помощи компьютерной программы ImageJ, предназначенной для анализа цифровых изображений. В зависимости от интенсивности сигнала, для каждого образца на основании сравнения с контрольными пробами устанавливали его принадлежность к группе защищенных либо не защищенных от коклюша, дифтерии и столбняка.

Простота, оперативность и приборонезависимость сконструированной тест-системы предоставляют возможность использовать ее при проведении экстренных серологических исследований, например, в очагах эпидемий дифтерии, когда результат анализа должен быть получен в течение суток, в травматологических пунктах для быстрой оценки противостолбнячного иммунитета, в других подобных ситуациях. Результаты тестирования позволяют не только определить протективный эффект вакцинации, но и сформировать рекомендации относительно сроков дальнейшей иммунизации и серологического контроля в отношении дифтерии и столбняка.

Диагностика сифилиса. Тест-система для определения антител к *Treponema pallidum*.

В качестве твердофазного реагента использовали диски нитроцеллюлозной мембраны с диаметром пор 0,45 мкм. На диски дотами из капель наносили антиген p17 производства ЗАО БТК «Биосервис» (Россия), в концентрации 0,05 мг/мл разведенный в ЗФР. Диски высушивали и инкубировали в течение 30 мин. с 10 серийными разведениями сывороток больных сифилисом в ЗФРТ кратными двум. Стартовое разведение сывороток составляло 1/500. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки здоровых людей в разведении 1/500 в ЗФРТ. После инкубации с сыворотками диски трижды промывали ЗФРТ и инкубировали с углеродным диагностикумом в объеме 70 мкл, разведенным в ЗФРТ до рабочего титра, в течение 15 мин. Затем углеродный конъюгат удаляли, диски промывали, высушивали. Регистрацию результатов производили по наличию окрашивания в зоне сорбции антигена. Титр исследуемой сыворотки определяли по последней визуализируемой точке в ряду ее серийных разведений (рис. 8).

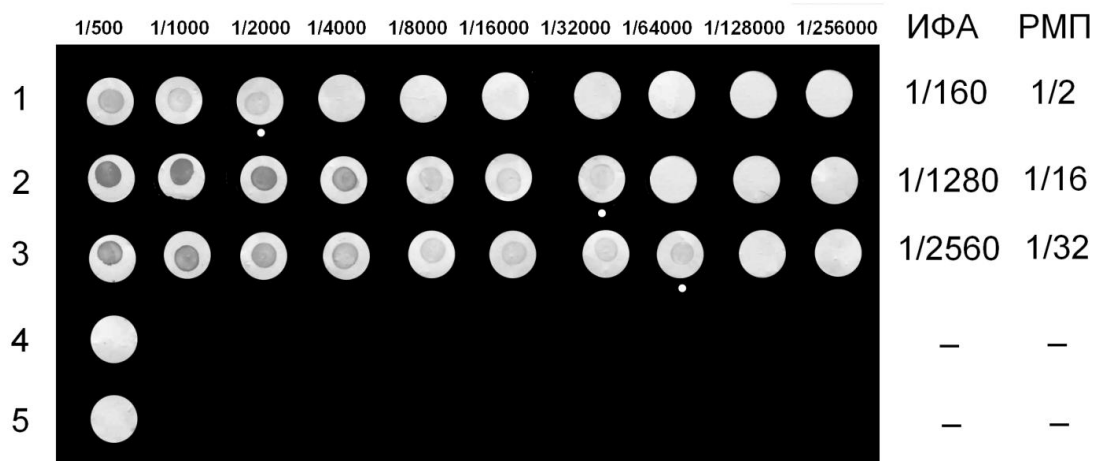


Рис. 8. Определение титра сифилитических антител к антигену p17 в сыворотках больных сифилисом (1-3) и здоровых людей (4, 5) при помощи сконструированной дот-иммуноаналитической системы.

Примечание: Титры сывороток указаны в верхней части рисунка. Для каждой сыворотки приведены данные ее исследования при помощи ИФА и РМП. Белой точкой помечены последние визуализируемые точки в рядах серийных разведений сывороток.

Тестировали 20 отрицательных (отрицательные результаты иммуноферментного анализа - ИФА и микрореакции преципитации - РМП) и 20 положительных сывороток (положительные реакции РМП и ИФА). Результаты анализа разработанным методом хорошо согласуются с данными ИФА и РМП. Нижний предел чувствительности сконструированной системы ниже, чем у ИФА на 1-2 порядка при меньшей длительности анализа. При тестировании отрицательных проб ложноположительных реакций не выявлено. Аналитические чувствительность и специфичность данной дот-иммуноаналитической системы составили 100%. Результаты тестирования отдельных сывороток представлены на рисунке 8

Закключение

Таким образом, в ходе проводимых исследований разработана технология биологической функционализации поверхности наночастиц, на основе которой сконструирован и апробирован широкий спектр иммунодиагностических систем, в том числе пригодных для тестирования различных инфекционных заболеваний вирусной и бактериальной этиологии.

Предложенные биотехнологические решения, позволяющие получить высоко стабильный диагностикум на основе конъюгата углеродных наночастиц с биологически активными соединениями, в частности G белком, позво-

ляют включить его в качестве детектирующего компонента в структуру практически любой серологической системы анализа при её соответствующей конструкции.

Использование других аффинных соединений в качестве функционализирующих поверхность наночастиц макромолекул (антитела, стрептавидин, биотинилированные зонды, нуклеиновые кислоты) позволяет конструировать практически неограниченный спектр тест-систем, пригодных для упрощенного определения широкого спектра мишеней. При этом формализация результатов, основанная на оценке степени потемнения зоны анализа, может проводиться не только невооруженным глазом, но и при помощи простого планшетного сканирования получаемого изображения и доступной компьютерной обработки. Последнее обеспечивает количественную оценку получаемых визуальных результатов.

(Работа выполняется при частичной финансовой поддержке Комплексной программы фундаментальных исследований УрО РАН, проект № 15-3-4-14)

ЛИТЕРАТУРА

1. Thatai S. et al. Nanoparticles and core-shell nanocomposite based new generation water remediation materials and analytical techniques: A review. *Microchemical J.* 2014. 116: 62-76.
2. Балыкин В.И. Атомная оптика и нанотехнология. *Успехи физических наук.* 2009. 179 (3): 297-305.
3. Kessler R. Engineered nanoparticles in consumer products: understanding a new ingredient. *Environmental perspective.* 2011. 119 (3): 120-125.
4. Aizawa M., Coughtin R., Charles M. Activation of alumina with bovine serum albumin for immobilizing enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* 1975. 17 (9): 1369-1372.
5. Munro P., Dunnill P., Lilly M. Casein hydrolysis in stirred tank reactors using chymotrypsin immobilized on magnetic supports. *Biotechnol. Bioeng.* 1981. 23 (4): 677-689.
6. Oh W.-K., Yoon H., Jang J. Characterization of surface modified carbon nanoparticles by low temperature plasma treatment. *Diamond and Related Materials.* 2009. 18 (10): 1316-1320.
7. Health J.R. Nanotechnologies for biomedical science and translational medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2015. 112 (47): 14436-14443.
8. Kruss S., et al. Carbon nanotubes as optical biomedical sensors. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2013. 65 (15): 1933-1950.
9. Posthuma-Trumpie G.A., et al. Amorphous Carbon Nanoparticles: a Versatile Label for Rapid Diagnostic (Immuno)Assays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2012. 402 (2): 593-600.
10. Wilson R. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. *Chemical Society Reviews.* 2008. 37 (9): 2028-2045.
11. Moeremans M., Daneels G., Van Dijck A. et al. Sensitive visualization of antigen-antibody reactions in dot and blot immune overlay assay with immunogold and immunogold silver staining. *J. Immunol. Meth.* 1984. 74: 353-360.
12. Tarcha P.J., Misun D., Finley D. *et al.* Polymer Latexes: Preparation, Characterization and Application; ACS Symp. Series 492; American Chemical Society: Washington, DC, 1992;

chap.22.

13. Guesdon J.L., Avrameas S. Sensitive titration of antibodies and antigen using eritro-immunoassay. Ann. Immunol. 1980. 131 (3): 389-396.
14. Akzo N.V. Immunoassay using metal-labelled reagent prepd. by coupling metal sol particles to immunological component. NL Pat. 7807532 A. 15.01.1980.
15. Litchfield W.J., Freytag J.W., Adamich M. Highly sensitive immunoassays based on use of liposomes without complement. Clin. Chem. 1984. 30 (9): 1441-1445.
16. Плаксин Д., Раев М., Громаковская Е. Метод стереоспецифического анализа и метод получения конъюгата для стереоспецифического анализа. Патент РФ № 2089912 от 10.09.1997.
17. Раев М.Б. Способ получения конъюгата для стереоспецифического анализа. Патент РФ №2314827 от 20.01.2008.

Поступила 17.05.2016

(Контактная информация:

Раев Михаил Борисович – д.б.н., ведущий научный сотрудник Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; профессор кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета; адрес: 614081 г. Пермь, ул. Голева, 13, тел./факс 8 (342) 2807794; e-mail: mraev@iegm.ru;

Храмцов Павел Викторович – ассистент кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета; адрес: 614990 г. Пермь, ул. Букирева, 15, тел./факс 8 (342) 2807794; e-mail: khramtsovpavel@yandex.ru;

Бочкова Мария Станиславовна – к.б.н., научный сотрудник Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; адрес: 614081 г. Пермь, ул. Голева, 13; тел./факс 8 (342) 2807794; e-mail: krasnykh-m@mail.ru;

Тимганова Валерия Павловна – к.б.н., младший научный сотрудник Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; адрес: 614081 г. Пермь, ул. Голева, 13, тел./факс 8 (342) 2807794; e-mail: timganovavp@gmail.com

Заморина Светлана Анатольевна – д.б.н., старший научный сотрудник Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; доцент кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета; адрес: 614081 г. Пермь, ул. Голева, 13; тел./факс 8 (342) 2807794; e-mail: mantissa7@mail.ru)

LITERATURA

1. Thatai S., et al. Nanoparticles and core-shell nanocomposite based new generation water remediation materials and analytical techniques: A review. Microchemical J. 2014. 116: 62–76.
2. Balykin V. Atomic optics and nanotechnology // Physics-Uspekhi. 2009. 179 (3): 297-305.
3. Kessler R. Engineered nanoparticles in consumer products: understanding a new ingredient. Enviromental perspective. 2011. 119 (3): 120-125.
4. Aizawa M., Coughtin R., Charles M. Activation of alumina with bovine serum albumin for immobilizing enzymes. Biotechnol. Bioeng. 1975. 17 (9): 1369–1372.
5. Munro P., Dunnill P. Lilly M. Casein hydrolysis in stirred tank reactors using chymotrypsin immobilized on magnetic supports. Biotechnol. Bioeng. 1981. 23 (4): 677–689.
6. Oh W.-K., Yoon H., Jang J. Characterization of surface modified carbon nanoparticles by low temperature plasma treatment. Diamond and Related Materials. 2009. 18 (10): 1316–1320.
7. Health J.R. Nanotechnologies for biomedical science and translational medicine. Proceedings

- of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2015. 112 (47): 14436-14443.
8. Kruss S., et al. Carbon nanotubes as optical biomedical sensors. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013. 65 (15): 1933–1950.
 9. Posthuma-Trumpie G.A., et al. Amorphous Carbon Nanoparticles: a Versatile Label for Rapid Diagnostic (Immuno)Assays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012. 402 (2): 593–600.
 10. Wilson R. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. *Chemical Society Reviews*. 2008. 37 (9): 2028–2045.
 11. Moeremans M., Daneels G., Van Dijck A. et al. Sensitive visualization of antigen-antibody reactions in dot and blot immune overlay assay with immunogold and immunogold silver staining. *J. Immunol. Meth.* 1984. 74: 353–360.
 12. Tarcha P.J., Misun D., Finley D. *et al.* Polymer Latexes: Preparation, Characterization and Application; ACS Symp. Series 492; American Chemical Society: Washington, DC, 1992; chap.22.
 13. Guesdon J.L., Avrameas S. Sensitive titration of antibodies and antigen using eritro-immunoassay. *Ann. Immunol.* 1980. 131 (3): 389–396.
 14. Akzo N.V. Immunoassay using metal-labelled reagent prepd. by coupling metal sol particles to immunological component. NL Pat. 7807532 A. 15.01.1980.
 15. Litchfield W.J., Freytag J.W., Adamich M. Highly sensitive immunoassays based on use of liposomes without complement. *Clin. Chem.* 1984. 30 (9): 1441–1445.
 16. Plaksin D., Rayev M., Gromakovskaya E. Method of stereo-specific analysis and a method of preparing a conjugate for the stereo-specific analysis. Patent RU № 2089912, 10.09.1997.
 17. Rayev M. Method of preparing a conjugate for the stereo-specific analysis. Patent RU №2314827, 20.01.2008.

Образец ссылки на статью:

Раев М.Б., Храмцов П.В., Бочкова М.С., Тимганова В.П., Заморина С.А. Биотехнология углеродных наночастиц в диагностике инфекционных заболеваний. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2016. 2: 17с. [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/MBR-2016-2.pdf>).