*ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2012, том 48, № 2, с. 249–256*

*УДК 543.9:543.068.8:615.07*

# РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БОТУЛИНИЧЕСКИХ ТОКСИНОВ

**© 2012 г. А. А. Титов, И. В. Шиленко, А. А. Морозов, С. П. Ярков, В. Н. Злобин**

*Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения Москва, 125424*

*e-mail: niibp@dol.ru*

Поступила в редакцию 18.04.2011 г.

Разработаны иммунохроматографические монопараметрические тесты для выявления ботулинических токсинов типов А, В, а также мультипараметрический тест для одновременного выявления ботулинических токсинов типов А и В. Показано, что на чувствительность тестов влияют размеры наночастиц коллоидного золота, использованных в качестве маркеров антител, величины нагрузки антител на наночастицы коллоидного золота в конъюгатах, тип аналитических мембран, а также химический состав буферных растворов для хранения конъюгата и проведения иммунохроматографического анализа. Предел обнаружения монопараметрических иммунохроматографических тестов составляет 0.5 нг/мл, а мультипараметрических – 5.0 нг/мл. Разработанные иммунохроматографические тесты могут быть использованы для экспресс-анализа качества продуктов питания, контроля содержания ботулинических токсинов в фармацевтических препаратах, контроля окружающей среды.

Восемь типов ботулинических токсинов (A, B, $C_1$, $C_2$, D, E, F, G), обладающих нейротоксическим действием, могут продуцироваться токсикогенными штаммами анаэроба *Clostridium botulinum*. Ботулинические токсины могут присутствовать в консервах, копченостях, рыбе, грибах, представляя опасность для человека [1, 2]. Максимальной токсичностью для человека обладает ботулинический токсин типа А (**БТА**). Важным фактором лечебно-профилактических мероприятий при пищевых отравлениях является определение типа ботулинических токсинов (**БТ**) с целью дальнейшего лечения антитоксическими сыворотками. В медицине препараты “Ботокс”, “Диспорт”, на основе высокоочищенных препаратов БТА и БТ типа В (**БТВ**), применяются как средства для стойкой хемоденервации мышечных волокон, а химически инактивированные препараты БТ в виде анатоксинов используют для индукции иммунного ответа крупных животных с целью получения лечебных антитоксических сывороток. Наконец, ввиду высокой токсичности и устойчивости во внешней среде БТ рассматриваются, как одни из наиболее вероятных поражающих биологических агентов, пригодных для осуществления террористических актов [3].

Разработка высокочувствительных методов обнаружения, идентификации БТ в продуктах питания, объектах окружающей среды, определение концентрации в медицинских препаратах, в т.ч. для контроля их качества, является актуальной задачей. В настоящее время для идентификации типа БТ широко применяется биологический тест – реакция нейтрализации на мышах [2]. Иммунохимические методы анализа, такие, как иммуноферментный анализ (**ИФА**) [4], иммунохроматографический анализ (**ИХА**) [5], реакция непрямой гемагглютинации эритроцитов (**РНГА**), применяются, в основном, для контроля продуктов питания и выявления БТ в окружающей среде. Среди иммунохимических методов выявления БТ иммунохроматография выделяется не только малой длительностью анализа, но и высокой чувствительностью [6].

Современные представления о корреляции между размерами и аффинностью поливалентных конъюгатов антител и наночастиц коллоидного золота **(НКЗ)** [7], а также данные о влиянии размеров конъюгатов НКЗ на чувствительность иммунохроматографических тестов при выявлении поливалентных антигенов с повторяющимися эпитопами, на примере вирусов растений [8], открывают новые возможности для оптимизации ИХА. В частности, представляется интересным сравнить закономерности ИХА при выявлении “корпускулярных” антигенов (вирусы) и белковых растворимых антигенов (БТ) при использовании конъюгатов НКЗ различного размера. Од-

**Сокращения:** **БА** – буфер для проведения иммунохроматографического анализа; **БСА** – бычий сывороточный альбумин; **БТ** – ботулинический токсин; **БТА** – ботулинический токсин типа А; **БТВ** – ботулинический токсин типа В; **БХ** – буфер хранения конъюгата; **ВЦР** – видеоцифровая регистрация; **ИК** – индекс контрастности; **ИХА** – иммунохроматографический анализ; **ИФА** – иммуноферментный анализ; **КрАМ** – антитела кролика к иммуноглобулинам мыши; **МКА** – моноклональные антитела; **НКЗ** – наночастицы коллоидного золота; **ФБ** – фосфатный буферный раствор.

ним из преимуществ ИХА является возможность как визуальной, так и приборной регистрации результатов. В частности, видеоцифровая регистрация (**ВЦР**) иммунохроматограмм может повысить чувствительность аналитической системы и исключить субъективность при интерпретации результатов ИХА [9, 10].

Цель исследования – разработка оптимизированных по своим аналитическим характеристикам моно- и мультипараметрических иммунохроматографических тестов для выявления БТА и БТВ, а также изучение влияния на чувствительность тестов размера маркерных НКЗ, состава конъюгата НКЗ с моноклональными антителами, типа аналитической мембраны, состава буферов хранения конъюгата (**БХ**), буфера для проведения иммунохроматографического анализа (**БА**), а также условий ВЦР данных анализа.

## МЕТОДИКА

**Реактивы.** Применяли золотохлористоводородную кислоту ($HAuCl_4$), сахарозу, бычий сывороточный альбумин (**БСА**), Трис, Твин-20, цитрат натрия дигидрат, аскорбат натрия, NaCl, $Na_2HPO_4$, $KH_2PO_4$, $K_2CO_3$ (“Sigma”, США), азид натрия, динатриевую соль ЭДТА (“ДиаэМ”, Россия), натрийборгидрид ($NaBH_4$) (“Merck”, Германия). Все растворы готовили на деионизованной воде, полученной при помощи установки Nanopure II (“Sybron-Barnstead”, США).

**Иммунокомпоненты.** В качестве рабочих моделей БТА и БТВ использовали паспортизованные очищенные препараты соответствующих анатоксинов, полученные из филиала “Микроген” (Россия). Для изучения перекрестных реакций иммунохроматографических тестов с другими типами БТ использовали ботулинический анатоксин типа Е, дифтерийный и столбнячный анатоксины этого же производителя. Концентрация анатоксинов принималась равной концентрации белкового азота в препарате. МКА к БТА клоны BTA151 и BTA232, МКА к БТВ клоны BTB 224, KBB18 (“Импакт”, Россия). Примененные нами МКА к БТ были типоспецифичны. Кроличьи антитела к IgG мыши (**КрАМ**) фирмы “Sigma” (США).

**Получение наночастиц коллоидного золота.** НКЗ с номинальным диаметром 13 нм (НКЗ-1) получали восстановлением $HAuCl_4$ натрийборгидридом [11]. К 98.4 мл 0.3мМ динатриевой соли ЭДТА при перемешивании добавляли 0.4 мл 0.2 М $K_2CO_3$ и 1 мл 1%-ного $HAuCl_4$, затем быстро при интенсивном перемешивании вносили 250 мкл 0.5%-ного $NaBH_4$. НКЗ с номинальным диаметром 16 нм (НКЗ-2) получали восстановлением $HAuCl_4$ аскорбатом натрия [12]. К 25 мл охлажденной до 4°С деионизованной воды добавляли 1 мл 1%-ного $HAuCl_4$ и 1 мл 0.1 М $K_2CO_3$. Смесь помещали в ледяную баню и быстро при перемешивании вносили 0.25 мл 7%-ного аскорбата натрия, перемешивали, пока окраска не становилась пурпурно-красной. Объем смеси доводили до 400 мл деионизованной водой, кипятили до появления красной окраски. НКЗ диаметром 25–47 нм получали по методу Френса [13] восстановлением $HAuCl_4$ цитратом натрия. К 100 мл деионизованной воды добавляли 1 мл 1%-ного $HAuCl_4$, доводили до кипения и при перемешивании добавляли 1%-ный цитрат натрия. Для НКЗ 25 нм (НКЗ-3) – 2 мл, НКЗ 31 нм (НКЗ-4) – 1.25 мл, НКЗ 47 нм (НКЗ-5) – 1 мл 1%-ного раствора цитрата натрия. Растворы кипятили еще 5 мин и охлаждали до комнатной температуры. Препараты НКЗ хранили при +4–6°С в темноте.

**Получение конъюгатов антител с препаратами НКЗ.** Определяли количество МКА, оптимальное для конъюгации с НКЗ [14]. Растворы НКЗ доводили до pH 9.0 добавлением 0.1 М $K_2CO_3$. К 1 мл НКЗ добавляли 120 мкл раствора МКА в воде с концентрацией 0–120 мкг/мл, перемешивали и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Затем в каждую пробу добавляли 1 мл 2%-ного раствора NaCl, перемешивали, через 5 мин определяли оптическую плотность при 580 нм ($D_{580}$). Строили зависимости $D_{580}$ от концентрации конъюгируемых МКА, т.н. кривые флокулляции. Величины стабилизирующих золь концентраций МКА лежали в диапазоне от 10 до 70 мкг/мл для различных препаратов НКЗ и клонов МКА.

Конъюгаты НКЗ с МКА к БТА, клон BTA151 и НКЗ с МКА к БТВ, клон BTB224 получали следующим образом. К НКЗ с pH 9.0 при перемешивании добавляли выбранное количество МКА. Через 5 мин добавляли БСА до концентрации 0.25%. Конъюгат осаждали центрифугированием в течение 40 мин при 25000 g для НКЗ-1, для остальных НКЗ – в течение 25 мин при 12000 g. Осадки отмывали два раза 0.25%-ным раствором БСА и суспендировали в БХ. Оптическую плотность НКЗ и конъюгатов определяли в 1 см кювете на спектрофотометре СФ-102 (НПО “Интерфотофизика”, Россия).

**Электронная микроскопия.** Для проведения электронной микроскопии образцы НКЗ наносили на медные сеточки, покрытые пленкой-подложкой из поливинилформаля. Снимки препаратов НКЗ получали на электронном трансмиссионном микроскопе JEM-1011 (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении 320000. Изображение фиксировали с помощью цифрового фотоаппарата ES500W (“Gatan”, Германия). Величина выборки гранулометрического анализа варьировала в диапазоне 50–220 частиц для различных препаратов золя золота.

**Расчет объема, диаметра НКЗ.** Номинальный объем частицы $V_{НКЗ}$, нм$^3$, рассчитывали по фор-

муле: $V_{НКЗ} = 4\pi a^2 b/3$, где $a$, $b$ (нм) – длины большой и малой полуосей эллипсоида вращения. Расчет диаметра частиц ($d$, нм), полученных цитратным методом, проводили по формуле: $d = 38.2V^{-0.855}$, где $V$ (мл) объем 1%-ного раствора цитрата натрия в расчете на 100 мл НКЗ [11].

**Приготовление буферных растворов.** Готовили БХ следующего состава: (БХ-1) – водный раствор 10%-ной сахарозы и 0.25%-ного БСА; (БХ-2) – 0.05 М Трис, pH 8.5, с 10% сахарозы и 0.25% БСА; (БХ-3) – 0.05 М K-Na Фосфатный буфер (**ФБ**), pH 8.0, с 10% сахарозы и 0.25% БСА; (БХ-4) – 0.05 М Трис, pH 8.5, с 20% сахарозы и 0.25% БСА; (БХ-5) – 0.05 М Трис, pH 8.5, с 10% сахарозы и 1.0% БСА; (БХ-6) – 0.05 М Трис, pH 8.5, с 20% сахарозы и 1.0% БСА. Для проведения иммунохроматографического анализа готовили БА следующего состава: 0.1 М ФБ, pH 7.8, с 0.4% твин-20 и 0.25% БСА.

**Получение иммунохроматографических тестов.** Для получения иммунохроматографических тестов формировали мультимембранные коньюгаты, представляющие собой последовательно размещенные на единой подложке жесткости – мембрану из целлюлозной бумаги (CFSP) с нанесенным и высушенным конъюгатом НКЗ и МКА к определяемому соединению, аналитическую нитроцеллюлозную мембрану (HF120 или HF240), конечную впитывающую мембрану (CFSP). Указанные мембраны плотно прилегали друг к другу. Внесение определяемого соединения в БА на мембрану для нанесения образца обеспечивало регидратацию конъюгата, перенос капиллярными силами жидкости определяемого образца и иммунореагентов к аналитической и контрольной зоне теста, где были нанесены МКА к определяемому соединению и антивидовые, по отношению к АТ конъюгата, иммуноглобулины соответственно. Все использованные в работе мембраны были производства “Millipore” (США).

Конъюгат НКЗ с $D$ 3.0 наносили на стекловолоконную мембрану GFSP (далее в тексте конъюгатная мембрана) в количестве 0.05 мл на 1 см подложки и высушивали. Для мультипараметрических тестов на конъюгатную мембрану последовательно наносили в равных количествах конъюгаты НКЗ с МКА BTA151 и BTB224 либо проводили конъюгацию НКЗ определенного номинального размера со смесью МКА BTA151 и МКА224, взятых в отношении 2 : 1 минимальных стабилизирующих концентраций, с последующим нанесением на мембрану и высушиванием.

При изготовлении монопараметрических тестов в аналитическую и контрольную зону нитроцеллюлозных мембран HF120 и HF240 наносили антитела с помощью диспенсера IsoFlow (“Imagene Technology”, США). В аналитическую зону – растворы МКА BTA232 против БТА или МКА KBB18 против БТВ в 0.01М ФБ, pH 7.4, в количестве 50–150 нг антител на 1 мм$^2$ мембраны. В контрольную зону – КрАМ в количестве 100 нг/мм. В случае получения мультипараметрических тестов на нитроцеллюлозной мембране HF120 формировали две аналитические зоны из МКА BTA232 и KBB18.

Полученный мультимембранный коньюгат в условиях контролируемой влажности резали с помощью программируемой гильотины Matrix 2360 (“Kinematic Automation”, США) на полоски размером 5 × 60 мм, которые помещали в пластиковые оправы с отверстиями для нанесения образца и считывания результата (“Advanced Microdevices”, Индия). Полученные иммунохроматографические тесты до использования хранили в газонепроницаемых фольгированных пакетах в присутствии активированного силикагеля при комнатной температуре.

**Условия проведения ИХА и регистрация результатов.** ИХА проводили при комнатной температуре. В отверстие для нанесения образца пластиковой оправы иммунохроматографического теста вносили 120–150 мкл раствора определяемого соединения в БА. Регистрацию результата проводили визуально по появлению окрашенных полос в аналитической и контрольной зонах. Для получения количественных данных об интенсивности окрашивания линий иммунохроматограмм использовали видеоцифровые рефлектометры Рефлеком (ООО “Синтэко-Комплекс”, Россия) и Зондаж (разработка ФГУП “ГосНИИ БП”). Показания прибора Рефлеком выше 0.3 усл. ед. достоверно указывали на положительный результат ИХА. Рефлектометр Зондаж позволял проводить регистрацию иммунохроматограмм и их последующую обработку при освещении в различных спектральных диапазонах – зеленом, красном, синем, а также освещении белым светом. Ширина спектральных линий светодиодных источников света прибора на полувысоте максимума эмиссии составляет 30, 28, 25 нм соответственно. Коэффициент вариации при измерении прибором Зондаж интенсивности окрашивания аналитической зоны иммунохроматограмм не превышал 6%, а при измерении окрашивания контрольной зоны – 1%. Индекс контраста (**ИК**) иммунохроматограмм [15] рассчитывали по формуле: $ИК = (S - S_0)/S_0$, где $S_0$ (отн. ед.) – показания рефлектометра вне области аналитической зоны при внесении БА (фоновый сигнал), $S$ (отн. ед.) – показания рефлектометра в области аналитической зоны при различных концентрациях определяемого соединения (полезный сигнал).

**Таблица 1.** Характеристика препаратов НКЗ и их конъюгатов с МКА

| Параметр | Препарат золя золота | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | НКЗ-1 | НКЗ-2 | НКЗ-3 | НКЗ-4 | НКЗ-5 |
| Средний диаметр по длинной оси, ± стандартное отклонение, нм | 13 ± 1 | 16 ± 3 | 23 ± 2 | 31 ± 5 | 47 ± 7 |
| Средний диаметр по короткой оси, ± стандартное отклонение, нм | 10 ± 1 | 12 ± 3 | 19 ± 2 | 26 ± 4 | 40 ± 6 |
| Степень эллиптичности, ±стандартное отклонение | 1.30 ± 0.13 | 1.27 ± 0.13 | 1.19 ± 0.12 | 1.20 ± 0.10 | 1.16 ± 0.10 |
| Средний номинальный объем частицы, нм$^3$ | $0.93 \times 10^3$ | $1.58 \times 10^3$ | $5.32 \times 10^3$ | $1.30 \times 10^4$ | $4.62 \times 10^4$ |
| Расчетный средний диаметр частицы, нм | – | – | 25 | 31 | 40 |
| Длина волны максимума поглощения НКЗ, нм | 510 | 516 | 518 | 522 | 526 |
| Длина волны максимума поглощения конъюгата с МКА, нм | 520 | 526 | 528 | 528 | 532 |

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Гранулометрические и спектральные характеристики препаратов НКЗ и конъюгатов НКЗ с МКА.** Представленные в табл. 1 данные демонстрируют, что полученные в результате восстановления $HAuCl_4$ боргидридом, аскорбатом или цитратом натрия НКЗ имеют сферическую форму или форму эллипсоида вращения с невысокой степенью эллиптичности. Распределение НКЗ по размерам в каждом из полученных препаратов было асимметричным, близким к нормальному.

Спектры поглощения НКЗ демонстрируют красный сдвиг положения максимума по мере увеличения средних размеров НКЗ. То же самое можно сказать и о конъюгатах с МКА. Образование белковых слоев (полислои) на поверхности НКЗ приводит к небольшому, но закономерному сдвигу максимума поглощения по сравнению с НКЗ. Такой же спектральный сдвиг наблюдали при конъюгации НКЗ с овомукоидом в работе [11].

**Таблица 2.** Влияние состава буфера хранения конъюгата и pH БА на интенсивность окрашивания аналитической зоны в отсутствие специфического соединения

| Буфер хранения | Интенсивность окраски аналитической зоны, усл. ед. | | |
|---|---|---|---|
| | pH БА | | |
| | 4.9 | 6.0 | 7.8 |
| БХ-1 | 9.3 | 2.3 | 0 |
| БХ-2 | 4.2 | 1.2 | 0 |
| БХ-3 | 3.1 | 1.5 | 0 |
| БХ-4 | 3.1 | 1.1 | 0 |
| БХ-5 | 3.8 | 0.9 | 0 |
| БХ-6 | 2.1 | 0.3 | 0 |

Расчетные значения средних диаметров частиц, полученных восстановлением цитратом натрия, практически совпадали с экспериментальными.

**Разработка монопараметрических тестов для выявления БТ.** Полученные конъюгаты НКЗ различных номинальных размеров использовали для построения иммунохроматографических тестов. Применили “сэндвич” формат иммунохроматографического теста, в котором использовали МКА, специфичные к различным антигенным эпитопам белковых цепей токсина. Одно из МКА было конъюгировано с НКЗ, а второе – наносилось в аналитическую зону теста. Образовавшийся окрашенный комплекс определяемого соединения, конъюгата и МКА формировал аналитический сигнал, который был пропорционален концентрации определяемого соединения. Для поиска наиболее оптимальной, с точки зрения уменьшения предела обнаружения, конфигурации теста варьировали следующие параметры: номинальный размер НКЗ для получения конъюгатов, нагрузка антител на НКЗ, плотность нанесения антител в аналитическую зону аналитической мембраны, состав БХ и БА. Основные экспериментальные результаты по подбору состава БХ и БА приведены в табл. 2. Смещение pH БА из кислой в щелочную область позволило полностью избежать неспецифической сорбции конъюгатов в аналитической зоне при прохождении пробы, не содержащей определяемого соединения. Явление неспецифической сорбции может привести к появлению ложноположительных результатов ИХА. Замена БХ-2, содержащего фосфатный буфер с 10% сахарозы и 0.25% БСА, pH 8.0, на буфер БХ-6, содержащий 0.05 M Tris с 20% сахарозы и 1.0% БСА, pH 8.5, также уменьшало явление неспецифической сорбции конъюгата в аналитической зоне.

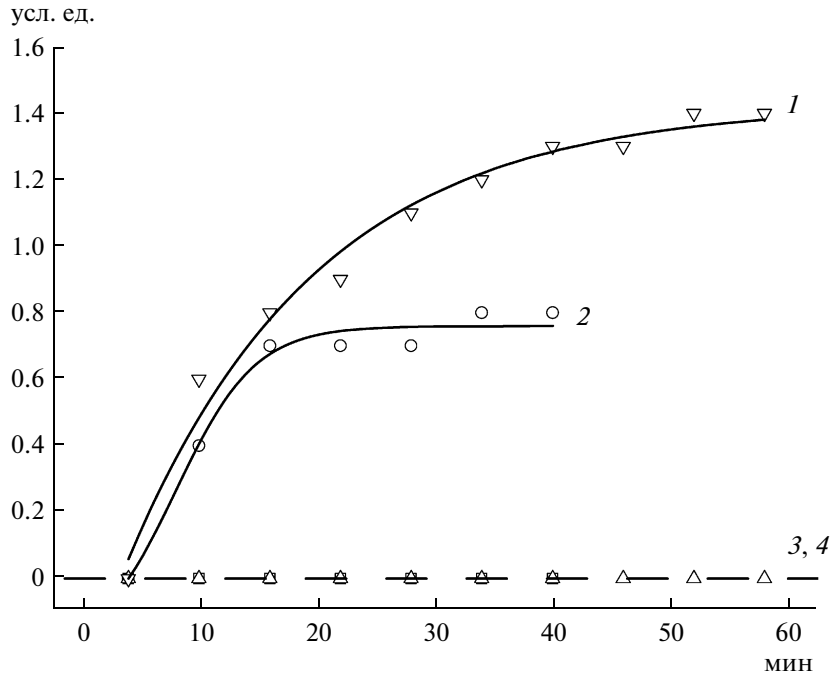


**Рис. 1.** Зависимость интенсивности окрашивания (усл. ед.) аналитической зоны иммунохроматограммы от времени анализа (мин) и типа применяемых аналитических мембран. *1* – мембрана HF240, *2* – мембрана HF120, *3* – отрицательный контроль для мембраны HF240, *4* – отрицательный контроль для мембраны HF120. Концентрация определяемого соединения 2.5 нг/мл БТА.

На возможное появление неспецифической сорбции конъюгата в аналитической зоне значительно влиял состав БХ. Наименее подвержены влиянию pH оказались иммунохроматографические тесты, построенные с использованием БХ-6. При сравнении пределов обнаружения БТ наилучший результат показал тест, где использовался БХ-1, но этот тест оказался наиболее чувствителен к изменению величины pH БА, что, возможно, объясняется отсутствием солей в составе данного БХ. Поэтому, при выборе БХ в процессе оптимизации иммунохроматографических тестов, в большей степени руководствовались целью уменьшения неспецифической сорбции конъюгата в аналитической зоне. В итоге использовали, как компромиссный вариант, тесты, построенные на основе конъюгатов в БХ-6 и применяли БА с величиной pH 7.8.

Предел обнаружения БТ уменьшался при увеличении концентрации МКА в аналитической зоне с 50 до 150 нг/мм и увеличении нагрузки конъюгатов по белку антител до величины, в 2 раза превышающей минимальную стабилизирующую концентрацию. Дальнейшее увеличение нагрузки конъюгатов приводило к появлению неспецифической сорбции конъюгатов в аналитической зоне. Наименьший предел обнаружения БТ – 0.5–1.0 нг/мл достигался на мембранах HF120 (скорость латерального течения жидкости – 120 ± 30 с/4 см) за время 30 мин. Применение более “медленных” аналитических мембран HF240 (скорость латерального течения жидкости – 240 ± 75 с/4 см) не приводило к уменьшению предела обнаружения, но увеличивало время анализа до 50 мин (рис. 1). Причем у иммунохроматографических тестов с НКЗ-5 и аналитической мембраной HF240 наблюдали появление неспецифической сорбции конъюгата к 30 мин времени анализа.

Сравнение предела обнаружения тестов, построенных с использованием НКЗ различного размера, при прочих равных условиях (рис. 2), показало, что применение НКЗ с номинальным диаметром 31 и 47 нм приводило к уменьшению предела обнаружения. Это явление может быть связано с увеличением аффинности конъюгатов НКЗ большого размера, как это было показано в работе [7].

**Разработка и аналитические свойства мультипараметрических тестов.** Мультипараметрические тесты отличались от монопараметрических наличием двух аналитических зон ($A_1$ и $A_2$), в которые были нанесены МКА, специфичные к БТА и БТВ соответственно, и одной контрольной зоны, сформированной из КрАМ. Для получения конъюгата использовали НКЗ-5 с номинальным размером частиц 47 нм. Наблюдаемая картина при анализе индивидуальных токсинов или их смеси мультипараметрическими тестами приведена на рис. 3. Предел обнаружения мультипараметриче-

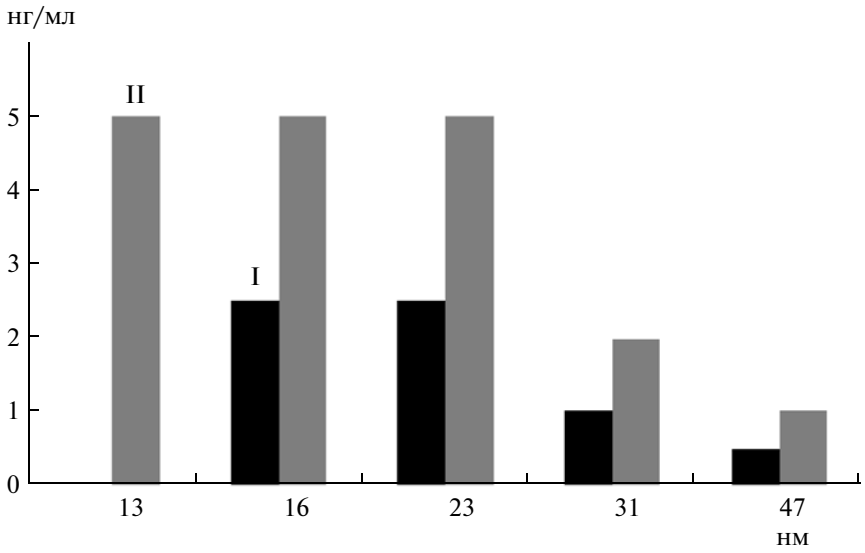


**Рис. 2.** Зависимость определяемого обнаружения БТ (нг/мл) от номинального размера НКЗ конъюгатов (нм) при прочих равных условиях. I – БТА; II – БТВ. Нагрузка конъюгата равна стабилизирующей концентрации МКА. Концентрация МКА в аналитической зоне 100 нг/мм. Тип мембраны HF120.

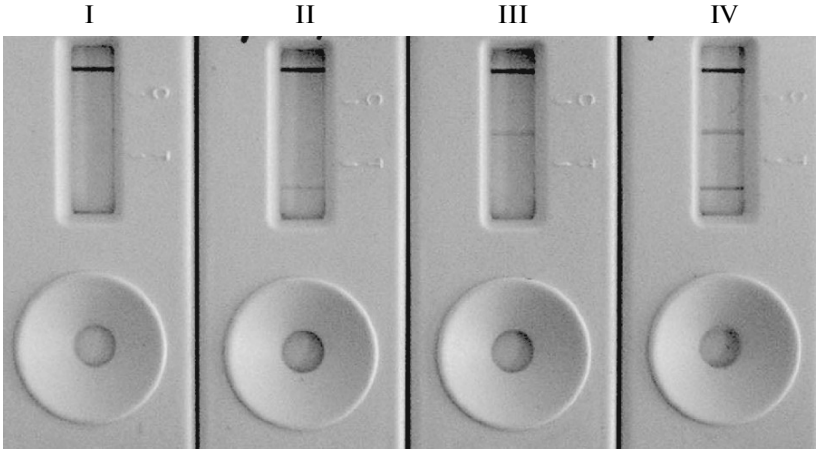


**Рис. 3.** Внешний вид иммунохроматограмм при мультианализе БТ. I – 0 нг/мл БТА и БТВ (отрицательный контроль), II – 10 нг/мл БТА, III – 10 нг/мл БТВ, IV – смесь, содержащая 10 нг/мл БТА и 10 нг/мл БТВ.

ского теста был несколько выше, чем у монопараметрических тестов как в режиме определения индивидуальных соединений, так и их смесей. Исследовали два способа формирования конъюгатной подложки для мультипараметрического теста. Первый – получение конъюгата из смеси антител (см. методику), второй –получение двух конъюгатов с индивидуальными антителами и их последующее смешивание в равных пропорциях на конъюгатной мембране.

Предел обнаружения тестов, в которых использовался второй способ формирования конъюгатной подложки, составил 10 нг/мл по БТА и БТВ, в то время как применение первого способа позволило уменьшить его до 5 нг/мл.

Специфичность разработанных нами моно – и мультипараметрических тестов была проверена на модельных растворах, содержащих 500–10000 нг/мл БТА, БТВ или БТЕ, а также 1.0 мкг/мл дифтерийного и столбнячного анатоксинов. Ни для одного из перечисленных выше определяемых соединений не наблюдалось ложноположительных реакций при проведении ИХА с помощью разработанных тестов.

Приведенные данные по пределу обнаружения моно- и мультипараметрических тестов относят-

ся к модельным растворам в БА. Известно, что матрикс, в котором содержится определяемое соединение, может существенно влиять на предел обнаружения. Представляло интерес определить предел обнаружения разработанных иммунохроматографических тестов при выявлении БТ в других матриксах. Учитывая, что продуцентом БТ являются анаэробные микроорганизмы, БТ вносили в овощные, рыбные и мясные консервы с последующим проведением ИХА. Чтобы уменьшить влияние матрикса, перед ИХА проводили процедуру пробоподготовки, которая заключалась в гомогенизации и суспендировании образца консервов в БА, удалении твердых частиц и жиров центрифугированием и ультразвуковой обработкой, доведении уровня pH образца до 7.0–8.0. Работу проводили с использованием монопараметрических тестов, для построения которых использовали препарат НКЗ-3 и БХ-6. В качестве экстрагирующего буфера использовали БА. Эксперименты показали, что предел обнаружения БТА повышался от 7 раз (овощные консервы) до 13 раз (мясные консервы), а при выявлении БТВ повышение предела обнаружения составило от 10 до 20 раз, по сравнению с модельными образцами. Однако подробное изучение влияния матрикса и процедуры пробоподготовки на предел обнаружения ИХА БТ не входило в цели данной статьи.

В наших исследованиях для получения количественных данных широко использовалась ВЦР результатов ИХА. ВЦР основана на анализе цифровых снимков иммунохроматограмм специализированными программами, позволяющими определять интегральную интенсивность поглощенного света аналитической и контрольной зоны, сформированных окрашенными частицами конъюгата. Для достижения наибольшей чувствительности регистрации должен существовать максимальный контраст между фоном мембраны и окрашенными зонами иммунохроматограммы. Учитывая, что НКЗ и его конъюгаты имеют широкие бесструктурные полосы поглощения в диапазоне 500–600 нм, контраст должен зависеть от спектрального состава освещения иммунохроматограммы. С помощью прибора Зондаж, позволяющего осуществлять освещение иммунохроматограмм в различных диапазонах видимого света, изучили значения ИК для иммунохроматографического теста при выявлении БТВ (рис. 4), в котором использовали НКЗ-3 с размером частиц 23 нм. Наибольшие значения ИК были получены при освещении зеленым светом, а наименьшие – красным. Освещение белым светом дало промежуточные значения ИК. Аналогичная картина наблюдалась и для НКЗ-5 с размером частиц 47 нм. Таким образом, использование зеленого освещения понижало предел обнаружения ВЦР иммунохроматограмм, в которых использовались НКЗ. Соответственно, при применении в качестве дисперсной фазы в иммунохроматографических тестах, окрашенных в различные цвета латексных частиц или золей для повышения ИК, целесообразно использовать освещение в разных спектральных диапазонах.

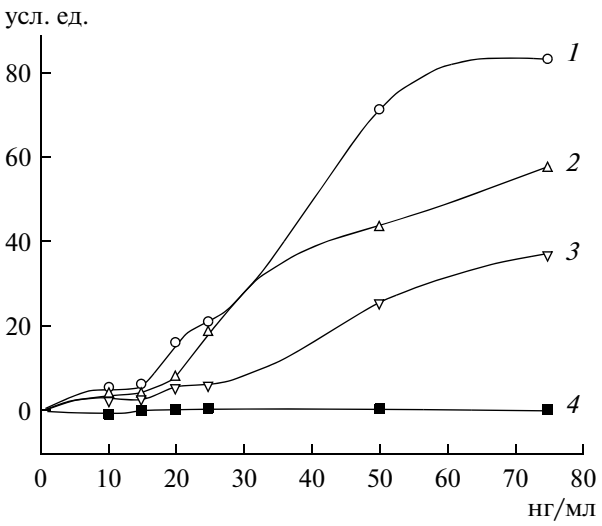


**Рис. 4.** Зависимость ИК аналитической зоны иммунохроматограмм от концентрации БТВ (нг/мл) и спектрального диапазона освещения при ВЦР на приборе Зондаж. *1* – зеленый свет (525 нм), *2* – синий свет (470 нм), *3* – белый свет, *4* – красный свет (630 нм).

Разработаны иммунохроматографические моно- и мультипараметрические тесты для определения БТ, которые имеют предел обнаружения 0.5–5.0 нг/мл, сравнимые по порядку величины с ИФА – 0.1 нг/мл. Мультипараметрический тест для выявления двух типов БТ разработан впервые нами. Выбор объектов исследования (БТА и БТВ) из всей гаммы нейротоксинов, продуцируемых токсикогенными штаммами *Clostridium botulinum* для построения иммунохроматографических тестов, обусловлен их наибольшей токсичностью, широкой распространенностью и практическим применением в медицинских препаратах.

Тесты имеют определенные преимущества по сравнению с ИФА, а именно: процедура проведения анализа более проста и менее длительна по времени (десятки минут), не включает стадий промывания и сенсибилизации планшетов, равно как и необходимости использования субстратов для проведения ферментативной реакции.

Использование инструментальных методов регистрации, в частности ВЦР, расширяет возможности ИХА за счет более объективной регистрации результата и получения количественных данных. Разработанные иммунохроматографические тесты могут быть использованы для экспресс-анализа качества продуктов питания, контроля содержания БТ в фармацевтических препаратах, контроля окружающей среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Тимаков В.Д.* Микробиология. М.: Медицина, 1973. 432 с.
2. *Ракова И.Д., Гуржей С.Н., Сметанин Н.Н.* // Медицина экстремальных ситуаций. 2010. Т. 33. № 3. С. 71–73.
3. *Arnon S.S., Schechter R., Inglesby T.V., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S.* // JAMA. 2001. V. 285. № 8. P. 1059–1070.
4. *Ferreira J.L., Maslanka S., Johnson E., Goodnough M.* // J. Assoc. Off. Agric. Chem. Int. 2003. V. 86. № 2. P. 314–331.
5. *Sharma S.K., Eblen V.S., Bull R.L., Burr D.H., Whiting R.C.* // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. № 7. P. 3935–3941.
6. *Wong R.C., Tse H.Y.* Lateral Flow Immunoassay. N. Y.: Humana Press, 2009. 223 p.
7. *Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* // J. Immunol. Methods. 2010. V. 357. № 1–2. P. 17–25.
8. *Бызова Н.А., Сафенкова И.В., Чирков С.Н., Жердев А.В., Блинцов А.Н., Дзантиев Б.Б, Атабеков И.Г.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 2. С. 225–231.
9. *Старовойтова Т.А., Зайко В.В., Волощук С.Г., Стериополо Н.А., Мартынкина Л.П., Савина М.И., Зайцева Н.А., Тогузов Р.Т., Венгеров Ю.Ю.* // Клиническая лабораторная диагностика. 2005. № 9. С. 24–25.
10. *Ярков С.П., Третьяков С.И., Башарова Л.А., Злобин В.Н.* // Вестник РАМН. 2007. № 12. С. 22–26
11. *Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Мельников А.Г.* // Коллоидный журнал. 1995. Т. 57. № 3. С. 412–423.
12. *Hermanson G.T.* Bioconjugate Techniques. London: Acad. Press, 1996. 785 p.
13. *Frens G.* // Nature Phys Sci. 1973. V. 241. № 1. P. 20–22.
14. *Horisberger M., Rosset J.* // J. Histoch. Cytochem. 1977. V. 25. № 4. P. 295–305.
15. *Qian S., Bau H.H.* // Anal. Biochem. 2003. V. 322. № 1. P. 89–98.


# Development and Optimization of Immunoassays for the Detection of Botulinum Toxins


**A. A. Titov, I. V. Shilenko, A. A. Morozov, S. P. Yarkov, and V. N. Zlobin**

*State Research and Development Institute of Biological Engineering, Moscow, 125424 Russia*

*e-mail: niibp@dol.ru*


Received April 18, 2011


**Abstract**—Monoparametric immunoassay tests for detecting botulinum toxins types A and B and multiparametric assays for simultaneous detection of botulinum toxins type A and B have been developed. It is shown that the sensitivity of assays is affected by the size of nanoparticles of colloidal gold used as a marker of antibodies, load intensity of antibodies of colloidal gold in conjugates, the type of analytical membranes, as well as the chemical composition of buffer solutions used for the storage of conjugates and immunoassay analysis. The detection limit of monoparametric immunoassay tests is 0.5 ng/ml; that of multiparametric assays, 5.0 ng/ml. The developed immunoassay can be used for rapid assay of product quality, for grade control of botulinum toxins in pharmaceuticals, and environmental monitoring.



Сдано в набор 26.10.2011 г. Подписано к печати 11.01.2012 г. Формат бумаги $60 \times 88^1/_8$
Цифровая печать Усл. печ. л. 16.0 Усл. кр.-отт. 2.0 тыс. Уч.-изд. л. 16.0 Бум. л. 8.0
Тираж 116 экз. Зак. 2208

Учредители: Российская академия наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Издатель: Академиздатцентр “Наука”, 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90
Оригинал-макет подготовлен МАИК “Наука/Интерпериодика”
Отпечатано в ППП “Типография “Наука”, 121099 Москва, Шубинский пер., 6