

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ
МЕДИЦИНЫ им. Д.Г. КНОРРЕ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК

Лаборатория биомедицинской химии

На правах рукописи

БАЕВА (ГОРБУНОВА) ЕКАТЕРИНА АНДРЕЕВНА

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах
выполненной научно-
квалификационной работы

Мультиплексные тест-системы на основе наночастиц золота и нуклеиновых кислот для
детекции биологически значимых агентов

Направление подготовки

1.4. Химические науки

Специальность

1.4.9 Биоорганическая химия

Аспирант _____ Е. А. Баева

Научный руководитель _____ к.х.н. А.В. Епанчинцева

Новосибирск – 2026

Работа выполнена в Лаборатории биомедицинской химии ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия.

Научный руководитель

Епанчинцева Анна Валерьевна

Кандидат химических наук, научный сотрудник Лаборатории биомедицинской химии ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность

С-реактивный белок (СРБ) является одним из ключевых биомаркеров воспалительных процессов и инфекционных заболеваний. Установлено, что даже незначительное, но устойчивое повышение концентрации СРБ коррелирует с повышенным риском развития инсулинорезистентности, а также сердечно-сосудистых патологий, включающих атеросклероз и инфаркт миокарда [1-3]. Высокая клиническая значимость мониторинга уровня СРБ требует быстрых, чувствительных и экономически доступных методов анализа, пригодных для использования в формате point-of-care диагностики (диагностики у постели больного) [4].

В клинической практике для количественного определения СРБ наиболее широко применяется турбидиметрический иммуноанализ. По мере развития технологий обнаружения были разработаны новые высокочувствительные методы обнаружения, такие как ELISA (иммуноферментный анализ) [5], капиллярный ELISA [6], иммуноанализ SERRS (резонансная спектроскопия комбинационного рассеяния с усилением поверхности) [7], магнитный иммуноанализ [8], иммунохроматографический анализ [9], иммуноферментный анализ на основе квантовых точек [10], двойной иммуноферментный анализ на основе квантовых точек [11], хемилюминесцентный иммуноанализ с усилением сигнала наночастицами металлов [12], электрохимический иммуноанализ на основе композитного наноматериала, где наночастицы золота интегрированы в структуру металл-органического каркаса (Au/MOF) [13], электрохимический иммуноанализ [14], микрофлюидный чип-биосенсор [15].

Перечисленные методы, как правило, основаны на высокоселективном распознавании СРБ специфическими антителами и зачастую требуют использования ферментативных меток или сложного оборудования. Это приводит к высокой стоимости анализа, вариабельности молекул распознавания от партии к партии и затрудняет их рутинное внедрение в широкую клиническую практику.

Наиболее перспективным направлением в этой области является иммунохроматографический анализ (ИХА), сочетающий простоту выполнения, быстроту получения результата (10–15 минут) и возможность работы без сложного лабораторного оборудования [16].

Однако традиционные ИХА-тест-системы на основе антител имеют ряд ограничений: термоллабильность, сравнительно высокая стоимость производства и вариабельность свойств между партиями. В последние годы активно развиваются альтернативные молекулы распознавания СРБ — аптамеры (синтетические олигонуклеотиды) и низкомолекулярные лиганды (например, цитиколин), которые

потенциально могут обеспечить более высокую стабильность, воспроизводимость и селективность [17].

Идея использования фосфохолина в качестве аффинного лиганда для детекции СРБ не нова. Еще в 1980-х годах были разработаны варианты ИФА, в которых в качестве молекул распознавания применяли фосфохолин, конъюгированный с бычьим сывороточным альбумином (БСА) [18], либо цитидин-5'-дифосфохолин (цитиколин) [19-20]. В более поздних исследованиях цитиколин, конъюгированный с БСА с помощью глутарового альдегида [21] либо с NH₂-модифицированным дендримером [22], применяли как молекулы распознавания в ИФА. При этом до настоящего времени в литературе не представлена разработка иммунохроматографических тест-систем на основе фосфохолина (цитиколина) для детекции СРБ.

В то же время известны примеры создания иммунохроматографических тест-систем на основе аптамеров для выявления СРБ [23]. Однако сравнительные исследования аналитических характеристик ИХА-тест-систем на основе разных типов молекул распознавания (антитела, аптамеры, цитиколин), реализованных на единой платформе для детекции СРБ, до настоящего времени не проводились. Отсутствуют также систематические данные о влиянии состава блокирующих растворов и материалов тест-полоски на аналитические характеристики таких гибридных систем.

В связи с вышеизложенным, **целью** данной работы является разработка и валидация иммунохроматографических тест-систем на основе конъюгатов наночастиц золота (НЧЗ) с различными молекулами распознавания (антителами IgG, цитиколином и аптамерами) для детекции С-реактивного белка (СРБ).

Задачи:

1. синтез и характеристика конъюгатов НЧЗ с молекулами распознавания (антителами IgG, цитиколином и аптамерами к СРБ);
2. разработка оптимального протокола блокировки поверхности полученных конъюгатов для минимизации неспецифического связывания;
3. подбор состава блокирующего раствора для подушки для конъюгата и раствора для обработки подушки для образца, обеспечивающих стабильность и эффективность тестирования;
4. подбор материалов тест-полоски (подушки для образца, подушки для конъюгата, нитроцеллюлозной мембраны, адсорбирующей подушки);
5. разработка иммунохроматографических тест-систем для детекции СРБ на основе трех типов молекул распознавания;
6. оценка аналитических характеристик разработанных тест-систем:

практический предел детекции, линейный диапазон, перекрестная реактивность с компонентами сыворотки.

1.2. Научная новизна и практическая значимость представляемой работы

Фундаментальная новизна работы состоит в использовании фосфохолина (в составе цитиколина) в качестве молекулы распознавания для детекции СРБ в иммунохроматографической тест-системе. Впервые была получена функциональная иммунохроматографическая тест-система сэндвич-формата на основе цитиколина и аптамера в качестве молекул распознавания, иммобилизованных на тестовой линии и НЧЗ соответственно. Впервые проведена сравнительная разработка трёх типов иммунохроматографических тест-систем для детекции СРБ на основе единой платформы с использованием конъюгатов НЧЗ с антителами, цитиколином и аптамерами.

Технологическая новизна работы состоит в разработке подходов для иммобилизации цитиколина или аптамера на тестовой линии тест-полоски, а также разработке подходов для модификации НЧЗ цитиколином или аптамером с сохранением их связывающей активности с СРБ в сыворотке человека. Также разработан протокол сборки тест-полоски в ручном режиме с проведением пилотных экспериментов на основе нитроцеллюлозного фильтра отечественного производства. Получение иммунохроматографической тест-системы на основе фосфохолина (в составе цитиколина) открывает путь к созданию аналогичных систем детекции для других белков, имеющих известные малые природные молекулярные лиганды.

Практическая значимость исследования заключается в том, что разработанные тест-системы могут быть использованы в клинической лабораторной диагностике, отделениях скорой помощи и амбулаторной практике для экспресс-определения уровня СРБ. Поскольку разработанные тест-системы содержат молекулы распознавания, которые можно синтезировать методом химического синтеза, они могут стать экономически доступной и химически стабильной альтернативой тест-системам на основе антител, что особенно ценно для массового скрининга и использования в полевых условиях. Кроме того, тест-система на основе цитиколина может служить платформой для скрининга молекул, ингибирующих взаимодействие СРБ с фосфохолином (потенциальные противовоспалительные препараты).

1.3. Апробация работы

По результатам исследования опубликовано 9 работ, в том числе 1 патент, 1 статья в рецензируемых изданиях и 7 тезисов конференций:

1. Патент РФ № 2 860 467. **Горбунова Е.А.**, Епанчинцева А.В.

Иммунохроматографическая тест-система на основе нуклеиновых кислот для

одновременного определения бактериальных и/или вирусных инфекций». Заявка № 2025101809. Дата приоритета 28.01.2025

2. **Горбунова Е.А.**, Епанчинцева А.В., Пышная И.А. Подход к получению флуоресцирующих наночастиц золота. Вестник Башкирского университета, 2025, 30 (3), 153-160. DOI: 10.33184/bulletin-bsu-2025.3.7
3. **Горбунова Е.А.**, Епанчинцева А.В. Синтез конъюгатов наночастиц золота с цитиколином и поиск условий блокирования их поверхности для повышения специфичности связывания с С-реактивным белком. VII Школа-конференция для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием) (Казань, 2025): тезисы докладов. – Казань: ИОФХ им. А. Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН. 2025. – 80 с.
4. **Е.А. Горбунова**, А.В. Епанчинцева. Исследование способов увеличения эффективности комплементарных взаимодействий ДНК-зондов, иммобилизованных на наночастице золота и нитроцеллюлозной мембране, в иммунохроматографических тест-системах. Материалы V всероссийской конференции, приуроченной к 40-летию ИХБФМ СО РАН. – Новосибирск, 9–12 июля 2024 г. Новосибирск. ООО «Офсет- ТМ». 2024. - 86 с.
5. **Е.А. Горбунова**, А.В. Епанчинцева. Исследование способов усиления эффективности взаимодействия конъюгатов наночастиц золота с ДНК-зондами на нитроцеллюлозной мембране в тест-системах бокового потока на основе нуклеиновых кислот. Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2024», секция «Химия». – М.: Издательство «Перо», 2024. – 967 с.
6. **Е.А. Горбунова**, А.В. Епанчинцева. Исследование способов увеличения интенсивности сигнала основных типов контрольных точек в иммунохроматографических тест-системах на основе нуклеиновых кислот. XI Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов, молекулярных биологов и специалистов фундаментальной медицины — 2024 : сб. тез. / АНО «Инновационный центр Кольцово». — Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2024. — 126 с.
7. **Е.А. Горбунова**, А.В. Епанчинцева. Синтез и характеристика ковалентных конъюгатов наночастиц золота разного диаметра с флуоресцеином. Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и

молодых учёных «Ломоносов-2023», секция «Химия». – М.: Издательство «Перо», 2023. – 1167 с.

8. **Е.А. Баета**, П.Е. Воробьев, И.А. Пышная, А.В. Епанчинцева. Разработка иммунохроматографических тест-систем на основе конъюгатов наночастиц золота с различными молекулами распознавания для детекции С-реактивного белка. Биоинформатика регуляции и структуры геномов / системная биология: 15-я международная мультikonференция : Тез. докл. (Россия, Новосибирск, 6–11 июля 2026 г.) / Ин-т цитологии и генетики СО РАН; Новосиб. нац. исслед. гос. ун-т. – Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2026. – 1757 с. – ISBN 978-5-91291-075-3. – 1364-1366 с. DOI 10.18699/bgrs2026-1364
9. **Баета Е.А.**, Епанчинцева А.В., Воробьев П.Е. Разработка иммунохроматографических тест-систем на основе конъюгатов наночастиц золота с разными типами распознающих молекул для выявления С-реактивного белка. Инженерная биология и биофармацевтика. Материалы всероссийской конференции с международным участием, приуроченной к 100-летию со дня рождения академика Д.Г. Кнорре. Новосибирск, 28–31 июля 2026 г. – Новосибирск. ООО «Офсет-ТМ». 2026. – 30 с.

Вклад автора

Основная часть работы была выполнена автором лично, либо с его непосредственным участием, в том числе: синтез НЧЗ, модификация их поверхности молекулами распознавания и характеристика модифицированных НЧЗ методами оптической и фотонно-корреляционной спектроскопии, разработка оптимального протокола блокировки поверхности НЧЗ с молекулами распознавания методами электрофоретического разделения по Лэммли, подбор материалов тест-полоски, а также её сборка в ручном режиме, оценка аналитических характеристик разработанных иммунохроматографических тест-систем. Синтез аптамеров произведен к.х.н. Мещаниновой М.И. (ЛХРНК ИХБФМ СО РАН). Модификация аптамеров биотином произведена Зыковым В.А. (ЛХРНК ИХБФМ СО РАН). Обработка результатов всех экспериментов проведена лично автором.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Исходные материалы

2.1.1. Реактивы и препараты

В работе использованы следующие *реактивы и растворители*: золотохлористоводородная кислота моногидрат $\text{HAuClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Аурат, Россия), цитрат натрия дигидрат $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, глутаровый альдегид (Fluka, Швейцария), N,N-метилен(бис)акриламид (AppliChem, Германия), трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), бромфеноловый синий, ксиленцианол FF, этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА), мочеви́на, ацетонитрил (о.с.ч.), формамид, персульфат аммония (Acros, США), глицин, додецилсульфат натрия (SDS), дитиотреитол (DTT) (Serva, США), глицерин, борная кислота, хлорид натрия (Panreac, Испания), акриламид (MX Chem, Китай), ацетон (о.с.ч.), уксусная кислота, соляная кислота (Реахим, Россия), этанол (ОАО «Кемеровская фармацевтическая фабрика», Россия), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES) (Suzhou Yacoo Science, Китай), хлорид магния, бычья эмбриональная сыворотка (Thermo Fisher Scientific, США), хлорид кальция, бычий сывороточный альбумин, казеин, N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид (ЕДК) (Sigma, США), сахароза, цианборгидрид натрия, С-реактивный белок (СРБ) (Sigma-Aldrich, США), сыворотка человека, IgG к СРБ (Вектор Бест, Россия), полиэтиленгликоль 20 кДа (ПЭГ-20000), полиэтиленгликоль 2 кДа (ПЭГ-2000) (CDH, Индия), фосфат натрия однозамещенный дигидрат (Реатэкс, Россия), фосфат натрия двузамещенный додекагидрат (АльфаХим Плюс, Россия), Tween 20 (Solarbio, Китай), HS-ПЭГ-COOH 3,2 кДа (Iris Biotech GMBH, Германия), гексаметилендиамин (Aldrich, США), цитиколин (OZON фармацевтика, Россия), АТФ (Reanal, Венгрия), флуоресцеин изотиоционат (Lumiprobe, Россия), Comassie blue R250 (Servicebio, Китай), агароза (Lonza, США), фосфатно-солевой буфер (Росмедбио, Россия).

Все растворы были приготовлены с использованием воды, очищенной с использованием системы очистки воды Simplicity 185 system (Millipore) (18,2 МΩ·см при 25 °C).

2.1.2. Буферы и растворы

Таблица 1. Название растворов и их состав.

Название	Состав
Раствор для подушки для образца	45,5 мМ HEPES pH 7,4, 182 мМ NaCl, 182 мМ CaCl ₂ , 182 мМ MgCl ₂
Раствор для подушки для конъюгата	5% сахароза, 1% БСА, 1%, PEG-20000, 0,05% Tween 20

В работе использованы буферные растворы Трис-Gly-SDS (25 мМ Трис, 250 мМ Gly, pH 8,3, 0,1% SDS), Трис-Gly (25 мМ Трис, 250 мМ Gly, pH 8,3).

2.1.3. Материалы

В качестве материалов для тест-полосок использовали стартовые наборы Easypack: подушка для образца GFB-R4, подушка для конъюгата PT-R7, адсорбирующая подушка AP080, нитроцеллюлозные мембраны 90CNPH, 150 CNPH, CNPC-SS12 (MDI, Индия), а также фильтр мембранный из нитрата целлюлозы (Владисарт, Россия).

2.1.4. Оборудование

Термостатирование с перемешиванием осуществляли в термошейкере Thermomixer C (Eppendorf, Германия). Коллоид НЧЗ осаждали в центрифуге Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Германия). Денатурацию белков перед электрофоретическим разделением проводили в термостате Биосан (Латвия). Электрофорез проводили с использованием высоковольтного источника тока PowerPac HC (Biorad, США). Спектры оптического поглощения записывали в полистирольных планшетах (TPP, Швейцария) с использованием флуориметра Clariostar (BMG Labtech, Германия), или в кюветах ZEN0040 (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) с использованием спектрофотометра NanoDrop (Thermo FS, США), или в кварцевых кюветах (Bio-Rad, США) с использованием спектрофотометра UV-2100 (Shimadzu, Япония). Гидродинамический диаметр и электрокинетический потенциал НЧЗ определяли с помощью анализатора наночастиц Zetasizer Nanoseries Nano ZS (Malvern, США).

2.2. Основные методы

2.2.1. Синтез олигонуклеотидов

Олигонуклеотиды, модифицированные аминокислотой, синтезировали на автоматическом ДНК-синтезаторе ASM-800 («Biosset», Россия) согласно стандартному протоколу твердофазного фосфитамидного метода, используя коммерческие дезоксирибонуклеозидные мономеры и соответствующие пористые стекла («Glen Research», США). Олигодезоксирибонуклеотиды синтезированы в автоматическом режиме на ДНК-синтезаторе Мещаниновой М.И. (ЛХРНК ИХБФМ СО РАН) (таблица 2). Биотинилированные олигонуклеотиды были получены

Зыковым В.А. (ЛХРНК ИХБФМ СО РАН) путем присоединения N-оксисукцинимидного эфира биотина по 3'-аминогруппе [24].

Таблица 2. Последовательности олигонуклеотидов, используемые в работе.

	Обозначение	5'-последовательность-3'
1	M-20-NH ₂	GTT GAC GGG CGA TTG GTC TT-L ₁₈ -NH ₂
2	H0-40-NH ₂	CCC CCG CGG GTC GGC TTG CCG TTC CGT TCG GCG CTT CCC C-L ₁₈ -NH ₂
3	6-40-NH ₂	CGA AGG GGA TTC GAG GGG TGA TTG CGT GCT CCA TTT GGT G-L ₁₈ -NH ₂
4	SRB-40-NH ₂	GTG GAG TTC AGG CTA CTG GTT CGC GAG TCG TGG AGG TAG T-L ₁₈ -NH ₂
5	M-20-биотин	GTT GAC GGG CGA TTG GTC TT-L ₁₈ -биотин
6	H0-40-биотин	CCC CCG CGG GTC GGC TTG CCG TTC CGT TCG GCG CTT CCC C-L ₁₈ -биотин
7	6-40-биотин	CGA AGG GGA TTC GAG GGG TGA TTG CGT GCT CCA TTT GGT G-L ₁₈ -биотин
8	SRB-40-биотин	GTG GAG TTC AGG CTA CTG GTT CGC GAG TCG TGG AGG TAG T-L ₁₈ -биотин

2.2.2. Синтез наночастиц золота

Синтез НЧЗ проводили методом цитратного восстановления HAuCl₄ согласно [25]. В колбу объемом 100 мл добавляли 45 мл H₂O mQ и доводили до кипения, затем при перемешивании добавляли 1 мл 18 мг/мл HAuCl₄·H₂O. В кипящий раствор HAuCl₄ добавляли 5 мл 38,8 мМ цитрата натрия. Кипящую смесь перемешивали на магнитной мешалке 17 минут, а затем оставляли при комнатной температуре на 16 - 24 ч. По истечению этого времени НЧЗ фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм и PTFE-мембраной (Jet Biofil, Китай).

2.2.3. Компоновка тест-полоски

С помощью роликового резака для бумаги (Brauberg, Германия) и канцелярского ножа нарезали НЦМ на ламинированной подложке на полоски шириной 4 мм. Таким же способом нарезали на прямоугольники 4 мм в ширину и 10 мм в длину подушку для конъюгата и подушку для образца. Адсорбирующую подушку нарезали на прямоугольники шириной 4 мм и длиной 12 мм с помощью ножниц. Подушку для конъюгата обрабатывали два раза по 10 мкл раствора, содержащего 5% сахарозы, 1 % БСА, 1 % ПЭГ-20000, 0,05 % Tween 20. Подушку для образца обрабатывали 11 мкл раствора, содержащего 45,5 мМ HEPES pH 7,4, 182 мМ NaCl, 182 мМ CaCl₂, 182 мМ MgCl₂. Высушивание подушки для конъюгата проводили в течение 2 ч при комнатной температуре. Далее подушку для конъюгата обрабатывали два раза по 10 мкл раствора конъюгата НЧЗ с молекулой распознавания, концентрацией 3,9 нМ, затем сушили ее при комнатной температуре в течение 2 ч.

Для формирования тестовой зоны на расстоянии 5 мм от конца подушки для конъюгата автоматическим дозатором наносили раствор молекулы распознавания:

- а) 0,25 мкл IgG к СРБ концентрацией 1 мг/мл;

б) 0,25 мкл конъюгата БСА-цитиколин концентрацией 10 мг/мл;

в) 0,75 мкл (три аликвоты по 0,25 мкл) конъюгата БСА-M20 концентрацией 0,6 мг/мл.

Высушивание нитроцеллюлозной мембраны с нанесенной тестовой зоной проводили в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее снимали защитные пленки и наклеивали на клейкую основу подушку для конъюгата, подушку для образца, адсорбирующую подушку в соответствии с схемой (рис. 1).

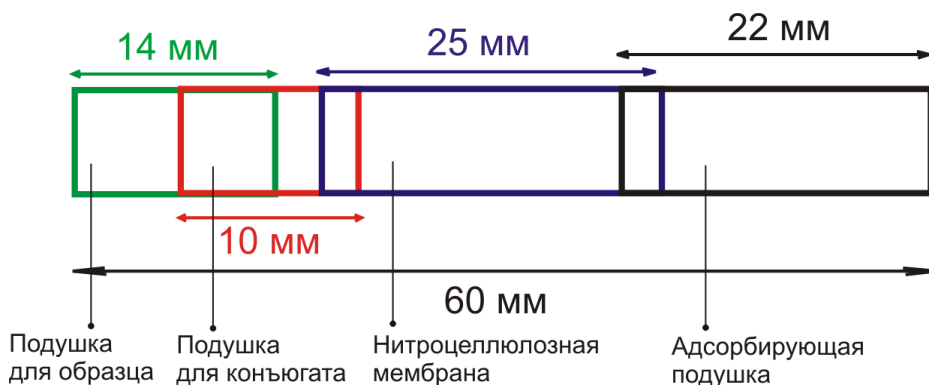


Рисунок 1. Расположение компонентов тест-полоски на ламинированной подложке.

2.2.4. Синтез конъюгатов НЧЗ-IgG к СРБ

К 200 мкл 3,9 нМ НЧЗ добавляли 2 мкл 1х PBS и перемешивали в течение 30 с. Далее в реакционную смесь добавляли 10 мкл 10 % ПЭГ-2000, 2 мкл 10 % Tween 20, перемешивали и инкубировали при 25 °С при перемешивании 350 об./мин. Спустя 20 мин в реакционную смесь добавляли 1,2 мкл IgG концентрацией 1,0 мг/мл и инкубировали в течение 20 мин при 25 °С при перемешивании 350 об./мин. Коллоид золота с IgG центрифугировали в течение 30 мин при 4000 g в течение 30 мин, убрали супернатант и добавляли H₂O mQ до конечного объема раствора 200 мкл. Затем раствор разделяли на 10 пробирок по 20 мкл и в каждую пробирку добавляли по 1 мкл блокирующего буфера (5 % сахарозы, 1 % БСА, 1 % ПЭГ-20000, 0,05 % Tween 20).

2.2.5. Синтез конъюгатов БСА-цитиколин

К 50 мкл БСА 10 мг/мл добавляли 0,33 мкл 25 % водного раствора глутарового альдегида и перемешивали. Спустя 1 мин добавляли 1,32 мкл цитиколина концентрацией 125 г/л и инкубировали при 25 °С при 700 об./мин в течение 30 мин. Далее реакционную смесь очищали методом гель-фильтрации с использованием спин-колонок Micro Bio-Spin P-30 Tris Chromatography columns (Bio-Rad) с порогом исключения 40 кДа. Далее на холоду добавляли 0,5 мкл 1 % раствора NaBCNH₃ и инкубировали реакционную смесь при перемешивании 700 об./мин в течение 30 минут при 4 °С с последующим очищением реакционной смеси вышеуказанным методом.

2.2.6. Синтез НЧЗ/БСА-цитиколин

К 200 мкл 3,9 нМ НЧЗ добавляли 2 мкл 1х PBS и перемешивали в течение 30 с. Далее в реакционную смесь добавляли 10 мкл 10 % ПЭГ-2000, 2 мкл 10 % Tween 20, инкубировали

при 25 °С при перемешивании 350 об./мин. Спустя 20 мин в реакционную смесь добавляли 1 мкл 10 мг/мл раствора БСА-цитиколин и инкубировали при перемешивании 350 об./мин в течение 1 ч. Далее раствор центрифугировали при 4000 g в течение 30 мин, убирали супернатант и добавляли H₂O mQ до конечного объема раствора 200 мкл. Затем раствор разделяли на 10 пробирок по 20 мкл и в каждую пробирку добавляли по 1 мкл блокирующего буфера (5 % сахароза, 1% БСА, 1 % ПЭГ-20000, 0,05 % Tween 20).

2.2.7. Синтез конъюгатов БСА с аптамером

К 1 мкл БСА 10 мг/мл добавляли 1,5 мкл 100 мМ РВ рН 6,0 и 10 мкл ЕДК 0,1М и перемешивали. Спустя 1 мин добавляли 4 мкл 100 мкМ раствора аптамера. Далее раствор инкубировали в течение 2,5 ч при 25 °С при перемешивании 350 об./мин.

2.2.8. Синтез НЧЗ/БСА-аптамер

К 200 мкл 3,9 нМ НЧЗ добавляли 2 мкл 1х PBS и перемешивали в течение 30 с. Далее в реакционную смесь добавляли 10 мкл 10 % ПЭГ-2000, 2 мкл 10 % Tween 20, инкубировали при перемешивании 350 об./мин при 25°С. Спустя 20 мин добавляли 16,5 мкл раствора конъюгатов БСА-аптамер и инкубировали в течение 1 ч. Далее реакционную смесь центрифугировали при 4000 g в течение 30 мин, убирали супернатант и добавляли H₂O mQ до конечного объема раствора 200 мкл. Затем раствор разделяли на 10 пробирок по 20 мкл и в каждую пробирку добавляли по 1 мкл блокирующего буфера (5 % сахарозы, 1 % БСА, 1 % ПЭГ-20000, 0,05 % Tween 20).

2.2.9. Синтез комплекса стрептавидин/биотин-аптамер

К 5 мкл 1 мг/мл раствора стрептавидина добавляли 2,5 мкл 100 мкМ раствора аптамера. Далее реакционную смесь инкубировали при перемешивании 700 об./мин при 25 °С в течение 1 ч.

2.2.10. Синтез НЧЗ, модифицированных комплексом стрептавидин/биотин-аптамер

К 200 мкл 3,9 нМ НЧЗ добавляли 2 мкл 10 мМ РВS и перемешивали в течение 30 с. Далее в реакционную смесь добавляли 10 мкл 10 % ПЭГ-2000, 2 мкл 10 % Tween 20, инкубировали в течение 350 об./мин при 25 °С. Спустя 20 мин добавляли 0,75 мкл комплекса стрептавидин/биотин-аптамер, инкубировали в течение 1 ч при 25 °С. Далее реакционную смесь центрифугировали при 4000 g в течение 30 мин, убирали супернатант, добавляли H₂O mQ до конечного объема раствора 200 мкл. Затем раствор разделяли на 10 пробирок по 20 мкл и в каждую пробирку добавляли по 1 мкл блокирующего буфера (5 % сахарозы, 1 % БСА, 1 % ПЭГ-20000, 0,05 % Tween 20).

2.2.11. Синтез конъюгатов НЧЗ-S-ПЭГ-CO-NH-(CH₂)₆-NH-цитиколин

Синтез состоял из четырех стадий. На первой стадии к 4 пмоль НЧЗ (1200 мкл, 3,0 нМ) добавляли 30 мкл 10^{-3} М раствора HS-ПЭГ-COОН (3,2 кДа). Реакционную смесь инкубировали при перемешивании 900 об./мин при 25 °С в течение 16 ч. Далее раствор центрифугировали при 16100g, убирали супернатант и трижды промывали 1 мл 4,0 mM раствором цитрата натрия.

На второй стадии к 4 пмоль НЧЗ-S-ПЭГ-COОН, полученных на первой стадии, добавляли 100 мкл 100 mM PB (pH 6,0) и 40 мкл свежеприготовленного 0,1 М раствора ЕДК. Реакционную смесь перемешивали. Спустя одну минуту к ней добавляли 40 мкл 10^{-3} М раствора гексаметилендиамина. Суммарный объем реакционной смеси составлял 1,0 мл. Раствор инкубировали при перемешивании 900 об./мин при 25 °С в течение 16 ч, далее центрифугировали при 16100 g, убирали супернатант и трижды промывали 1 мл 4,0 mM раствором цитрата натрия.

На третьей стадии к 4 пмоль НЧЗ-NH₂, полученным на второй стадии, добавляли 100 мкл 100 mM PB (pH 8,3), 2 мкл 0,025 % раствора глутарового альдегида. Далее спустя минуту в реакционную смесь добавляли 3 мкл 1,25 мг/мл раствора цитиколина и H₂O mQ до конечного объема раствора 1,0 мл. Реакционную смесь инкубировали при перемешивании 900 об./мин при 25 °С в течение 16 ч. Далее раствор центрифугировали при 16100 g, убирали супернатант и трижды промывали 1 мл 4,0 mM раствором цитрата натрия.

На четвертой стадии на холоду (на льду) к 4 пмоль НЧЗ-цитиколин, полученным на третьей стадии, добавляли 10 мкл 1 % раствора NaBCNH₃, инкубировали в течение 30 мин при 4 °С. Далее реакционную смесь центрифугировали при 16100g, убирали супернатант и трижды промывали 1 мл 4,0 mM раствором цитрата натрия. Затем раствор разделяли на отдельные пробирки по 20 мкл и в каждую пробирку добавляли по 1 мкл блокирующего буфера (5 % сахарозы, 1 % БСА, 1 % ПЭГ-20000, 0,05 % Tween 20).

2.2.12. Синтез конъюгатов НЧЗ-S-ПЭГ-CO-NH-аптамер

К 200 мкл 3,9 нМ НЧЗ добавляли 5 мкл 10^{-3} М НЧЗ-S-ПЭГ-COОН (3,2 кДа). Реакционную смесь инкубировали при перемешивании 900 об./мин при 25 °С в течение 16 ч. Далее раствор центрифугировали при 16100g, убирали супернатант и трижды промывали 1 мл 4,0 mM раствором цитрата натрия. Далее к осадку конъюгатов НЧЗ-S-ПЭГ-COОН добавляли 20 мкл 100 mM раствора PB pH 6,0, 5 мкл 0,1 М раствора ЕДК и добавляли H₂O mQ до конечного объема раствора 200 мкл. Реакционную смесь перемешивали. Спустя одну минуту к ней добавляли 5 мкл 10^{-4} М раствора NH₂-модифцированного аптамера и инкубировали в течение 16 ч при перемешивании 900 об./мин при 25 °С. Далее реакционную смесь центрифугировали при 16100g, убирали супернатант и добавляли H₂O

mQ до конечного объема раствора 200 мкл. Затем раствор разделяли на 10 пробирок по 20 мкл и в каждую пробирку добавляли по 1 мкл блокирующего буфера (5 % сахарозы, 1 % БСА, 1 % ПЭГ-20000, 0,05 % Tween 20).

2.2.13. Белковый электрофорез по Лэммли

Электрофоретическое разделение проб осуществляли с использованием 5 % концентрирующего полиакриламидного геля (ПААГ) в буферном растворе 0,375 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1 % SDS и 11 % разделяющего ПААГ в буферном растворе 0,25M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % SDS. Концентрирующий и разделяющий гели готовили соответствующим разведением из 30% раствора акриламида и бисакриламида (97:3). К реакционной смеси предварительно добавляли 10 мкл раствора красителя (0,05 % бромфеноловый синий, 5 % глицерин, 1 % SDS, 50 mM ДТТ, 30 mM Tris HCl pH 6,8). Электродный буфер для камеры содержал 25 mM Трис, 250 mM Gly, 0,1 % SDS, pH 8,3. Электрофорез проводили при постоянном напряжении 90 В в течение 2 ч. Окрашивание геля осуществляли с помощью Comassie blue R250 в течение 1 ч, после чего промывали при 25 °С в течение 24 ч в растворе, содержащем 10 % уксусную кислоту и 10 % этиловый спирт.

2.2.14. Электрофорез в агарозном геле

Пробы, содержащие НЧЗ и олигонуклеотиды в 5 % глицерине, подвергали электрофоретическому разделению в геле, содержащем 0,8 % агарозы, в буферном растворе Трис-глицин (25 mM Трис, 250 mM Gly, pH 8,3) при напряженности электрического поля 5 В/см и температуре 25 °С в течение 30 мин.

2.2.15. Определение предела обнаружения (LOD)

Предел обнаружения рассчитывали по формуле: $LOD = 3 \cdot SD/\alpha$, где SD – стандартное отклонение интенсивности тестовой линии тест-полосок отрицательного контроля (концентрация СРБ равна 0 мг/л); α - угловой коэффициент уравнения линейной аппроксимации зависимости интенсивности тестовой линии от концентрации СРБ в наносимом на тест-полоску анализируемом растворе [26]. Интенсивность окрашивания тестовых линий оценивали с помощью программы GelAnalyzer 19.1. Для четырех повторов тестовой линии отрицательного контроля на основе данных программы рассчитали стандартное отклонение (SD) полученных значений. Далее оценили интенсивность тестовых линий тест-полосок для серии растворов СРБ с концентрациями 5, 10, 20, 40 и 80 мг/л. По полученным данным в программе Microsoft Excel строили калибровочный график зависимости интенсивности тестовой линии от концентрации СРБ в анализируемом растворе, добавляли линию тренда с указанием уравнения линейной аппроксимации, из которого определяли угловой коэффициент α .

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Дизайн тест-полосок для детекции СРБ

Целью данной работы является разработка новых высокочувствительных методов иммунохроматографического экспресс-анализа СРБ в сыворотке человека в заданном диапазоне концентраций. Сейчас СРБ активно используется в качестве маркера кардиориска (1-5 мг/л) и является маркером воспаления при концентрации 10 мг/л и выше (таблица 3).

Таблица 3. Уровни СРБ в сыворотке человека.

Уровень СРБ (мг/л)	Категория	Клиническое значение (диагностика воспаления)	Клиническое значение (кардиориск)
<1,0	Оптимальная норма	Активного воспаления нет	Низкий риск сердечно-сосудистых заболеваний
1,0-3,0	Норма/серая зона	Активного воспаления нет	Средний риск
3,0-5,0	Верхняя граница нормы	Воспаления нет	Высокий риск
5-10	Незначительное повышение	Возможно хроническое или вялотекущее воспаление	-
10-50	Умеренное повышение	Есть воспалительный процесс средней активности	-
50-100	Выраженное повышение	Острое, активно текущее воспаление	-
>100	Резкое (критическое) повышение	Тяжелое воспаление	-

Устройство для проведения иммунохроматографического анализа представляет собой узкую тест-полоску шириной 4 мм и длиной 6 см, состоящую из нескольких прочно фиксированных на пластиковой подложке примыкающих друг к другу пористых мембран, по которым поток жидкости, содержащей анализируемый образец, движется самопроизвольно вследствие капиллярных сил (рис. 2). Пористые мембранные носители содержат заранее иммобилизованные в них молекулы распознавания, позволяющие выявлять наличие в анализируемой смеси определяемого соединения по окрашиванию тестовой линии детектирующей мембраны.

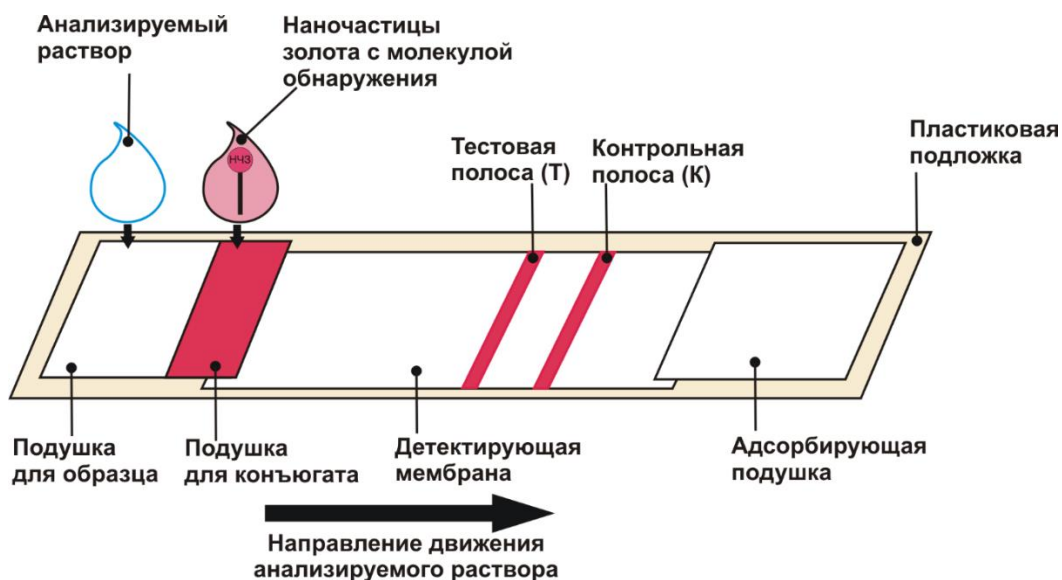


Рисунок 2. Схематическое изображение устройства иммунохроматографической тест-полоски.

Последовательность расположения соприкасающихся между собой компонентов тест-полоски включает подушку для образца, подушку для конъюгатов, детектирующую мембрану (чаще всего нитроцеллюлозную), адсорбирующую подушку. Подушки для образца и конъюгата представляют собой целлюлозные или стекловолоконные высокопористые материалы с минимальной сорбционной способностью по отношению к компонентам жидкости, способные быстро впитывать в себя анализируемый образец и перемещать его к нитроцеллюлозной мембране.

В качестве визуального детектирующего агента в ИХА, как правило, используют НЧЗ благодаря их высокому коэффициенту молярного поглощения [27] и малым размерам. Время анализа методом ИХА занимает около 10 минут.

В работе предстояло подобрать материалы тест-полоски, отработать протоколы сборки тест-полоски, получить конъюгаты НЧЗ с молекулами распознавания, минимизировать неспецифические взаимодействия компонентов тест-полоски с молекулами, входящими в состав сыворотки человека.

Мы разрабатывали ИХА для детекции СРБ сэндвич-формата, когда на тестовой линии иммобилизована одна молекула распознавания, а на НЧЗ иммобилизована другая молекула распознавания. Выбранные молекулы распознавания должны иметь разные эпитопы связывания с белком, чтобы была возможность реализовать тройной комплекс между ними и молекулой белка на тестовой линии. Поскольку СРБ имеет пентамерную структуру [28], теоретически для этой мишени можно использовать одинаковые молекулы распознавания и на НЧЗ, и на тестовой линии.

Пентамерная структура СРБ формируется за счет комбинации нековалентных взаимодействий между его идентичными мономерными субъединицами. Самый значимый

вклад в стабилизацию пентамера вносят гидрофобные взаимодействия [28]. В сыворотке человека нативный мономерный СРБ не встречается. Пентамерная форма является его единственной стабильной структурой в крови [29]. Переход в мономерную форму происходит только в искусственных экстремальных условиях *in vitro*: резкое снижение pH, денатурация мочевиной или гуанидин гидрохлоридом, нагрев до 60–70 °С, обработка детергентами в отсутствие Ca^{2+} [30]. В сыворотке человека такие условия не реализуются. Если пентамер диссоциирует (например, при замораживании-оттаивании с нарушением pH), то образовавшиеся мономеры немедленно агрегируют или ренатурируют [30-31], поэтому диагностического значения мономерная форма СРБ в анализе сыворотки не имеет.

В качестве молекул распознавания использовали цитиколин, аптамер и IgG. Они имеют разное сродство к СРБ (таблица 4). Наименьшую константу диссоциации имеет комплекс IgG с СРБ, а наибольшую – комплекс СРБ с цитиколином.

Таблица 4. Значения констант диссоциации комплекса СРБ с рассматриваемыми в работе молекулами обнаружения: цитиколином, аптамером, IgG.

Молекула обнаружения	K_d , нМ	Источник
цитиколин	10^3 - 10^4	[28]
аптамер	23,58 нМ	[32]
IgG	1-10 нМ	[33]

Цитиколин является структурным аналогом фосфохолина (рис. 3Б). Фосфохолин является одним из лигандов, распознаваемых СРБ, который связывается с ним на поверхности поврежденных клеток или некоторых патогенов. Это связывание активирует систему комплемента по классическому пути и запускает процессы опсонизации, способствуя элиминации апоптотических клеток и возбудителей [34].

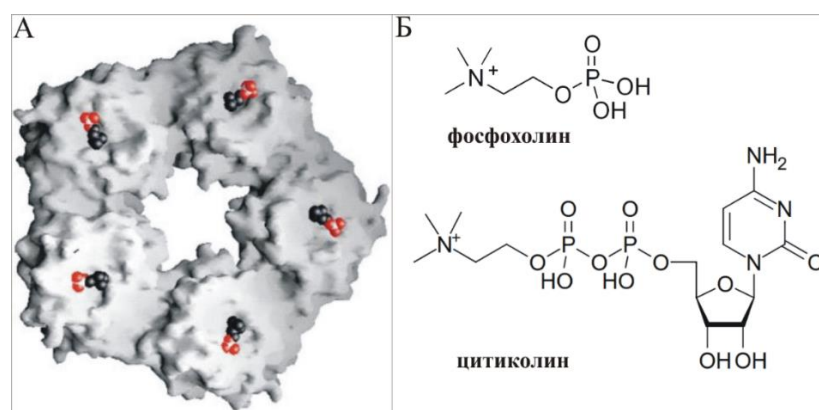


Рисунок 3. Взаимодействие СРБ с фосфохолином и его структурными аналогами. (А) Структура СРБ с пятью молекулами фосфохолина (красно-черный). Адаптировано из [28], (Б) структурные формулы цитиколина и фосфохолина.

Каждая субъединица гомопентамерного белка может связывать одну молекулу фосфохолина, а также два иона Ca^{2+} (рис. 3А). Ионы Ca^{2+} поддерживают правильное

положение фосфатной группы фосфохолина, тогда как холиновый фрагмент стабилизируется за счет взаимодействия с кислой аминокислотой Glu81 [28].

Описан ряд работ, в которых успешно в качестве молекул распознавания используют фосфохолин или цитиколин в формате ИФА для детекции СРБ [21-22]. Однако ИХА на основе цитиколина и аптамера в литературе не описано.

Мы протестировали 9 вариантов тест-полосок, полученных комбинацией трех типов молекул распознавания (IgG, цитиколин, аптамер), иммобилизованных на НЧЗ, с тремя такими же молекулами распознавания, иммобилизованными на тестовой линии (рис. 4).

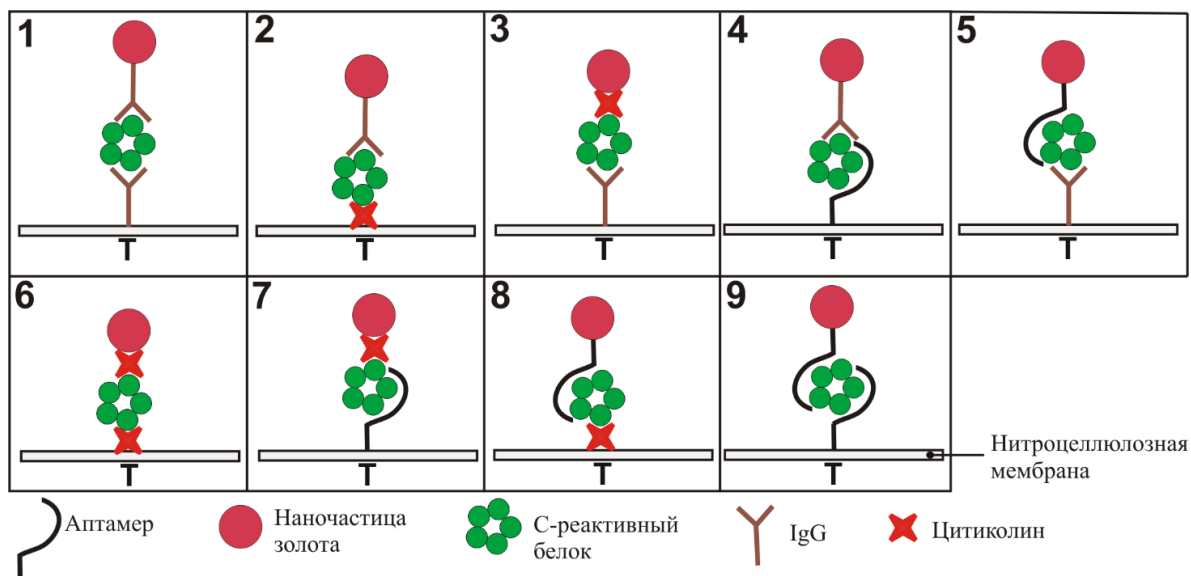


Рисунок 4. Варианты тест-систем, исследованные в данной работе: 1 – Тест-система на основе конъюгатов НЧЗ-IgG и IgG, иммобилизованных на НЦМ; 2 – Тест-система на основе конъюгатов НЧЗ-IgG и конъюгатов БСА-цитиколин, иммобилизованных на НЦМ; 3 – Тест-система на основе конъюгатов НЧЗ-цитиколин и IgG, иммобилизованных на НЦМ; 4 – Тест-система на основе конъюгатов НЧЗ-IgG и аптамера, иммобилизованного на НЦМ; 5 – Тест-система на основе конъюгатов НЧЗ-аптамер и IgG, иммобилизованных на НЦМ; 6 – Тест-система на основе конъюгатов НЧЗ-цитиколин и цитиколина, иммобилизованного на НЦМ; 7 – Тест-система на основе конъюгатов НЧЗ-цитиколин и аптамеров, иммобилизованных на НЦМ; 8 – Тест-система на основе конъюгатов НЧЗ-аптамер и цитиколина, иммобилизованного на НЦМ; 9 – Тест-система на основе конъюгата НЧЗ-аптамер и аптамера, иммобилизованного на НЦМ.

Далее рассмотрим особенности получения конъюгатов НЧЗ с молекулами распознавания (IgG, цитиколином, аптамером), условия их блокирования, а также состав буферного раствора для связывания мишени. Эти параметры являются критически важными для функционирования любой тест-системы наряду с оценкой эффективности работы разрабатываемых вариантов тест-полосок.

3.2. Получение конъюгатов НЧЗ с IgG к СРБ

Существует несколько способов конъюгации НЧЗ с IgG: нековалентная сорбция и ковалентное связывание. В своей работе мы использовали нековалентный подход.

В литературе описано множество вариаций нековалентной модификации поверхности НЧЗ антителами IgG. Чаще всего раствор НЧЗ титруют до нужного pH, значение которого подбирают экспериментально, оно обычно соответствует pI антитела, далее добавляют антитела, смесь инкубируют и в заключение добавляют ПЭГ или БСА для стабилизации ассоциата [35-41].

Мы решили использовать другой подход – стабилизировать НЧЗ перед добавлением к ним антител. Из рисунка 5 видно, что спектр оптического поглощения НЧЗ без стабилизирующего слоя НЧЗ/IgG имеет широкий пик в области 530-600 нм, соответствующий синему цвету частиц, который они приобретают при агрегации и потере (полной или частичной) коллоидной стабильности.

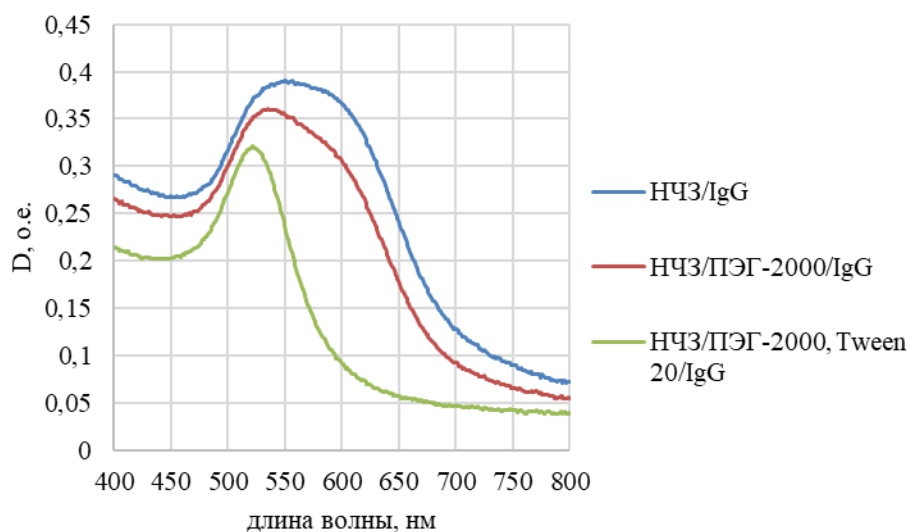


Рисунок 5. Спектры оптического поглощения НЧЗ, модифицированных IgG, с разным составом стабилизирующего слоя на поверхности НЧЗ.

Предварительная иммобилизация ПЭГ на поверхность НЧЗ не дает существенного эффекта в их стабилизации перед добавлением антител. На рисунке наблюдается широкий пик НЧЗ/ПЭГ-2000/IgG в области 530-600 нм, кроме того, происходит увеличение гидродинамического диаметра ассоциатов примерно в 7 раз в сравнении с исходными НЧЗ (таблица 5).

Таблица 5. Гидродинамический диаметр и ζ -потенциал НЧЗ, модифицированных IgG, с разным составом стабилизирующего слоя на поверхности НЧЗ.

Образец	d_h , нм	ζ , мВ	PdI
Исходные НЧЗ	24 ± 9	-18 ± 1	0,213
НЧЗ/ПЭГ-2000, Tween20/ IgG	34 ± 13	-16 ± 1	0,378
НЧЗ/ПЭГ-2000/ IgG	176 ± 93	-32 ± 1	0,245

Детергенты, например, Tween 20 также используют в качестве стабилизирующего слоя [42]. При добавлении Tween 20 в стабилизирующий раствор помимо ПЭГ наблюдали стабилизацию НЧЗ с антителами по спектру оптического поглощения (узкий пик на 520 нм)

(рис. 5) и методом ФКС гидродинамический диаметр составил 34 нм (таблица 5). Гидрофобная часть молекулы Tween 20 (C12) действует как якорь при взаимодействии с поверхностью НЧЗ, поскольку имеет высокое сродство к ней [43]. Tween 20 создает плотную, устойчивую к вытеснению мицеллоподобную пленку на поверхности золота. Антитела адсорбируются поверх слоя Tween 20, или на свободную поверхность НЧЗ, или встраиваются в слой Tween 20, в конечном итоге их адсорбция не приводит к агрегации частиц. ПЭГ в стабилизирующем слое «резервирует» поверхность НЧЗ для адсорбции антител, которые далее могут вытеснить его и адсорбироваться на его место.

Таким образом, были получены стабильные конъюгаты НЧЗ/ПЭГ-2000, Tween 20/IgG, пригодные к хранению в течение двух недель без потери коллоидной стабильности, которые в дальнейшем использовали для сборки тест-полосок.

3.3. Синтез и иммобилизация на НЧЗ конъюгатов БСА-цитиколин

Иммобилизация белков на нитроцеллюлозной мембране имеет сорбционную природу. Для нитроцеллюлозных мембран основными движущими силами связывания их с белками являются электростатические взаимодействия, а именно диполь-дипольные взаимодействия сильно поляризованных нитроэфирных групп мембраны и карбонильных групп пептидных связей белков [44]. Для того, чтобы иммобилизовать цитиколин на тестовой линии нитроцеллюлозной мембраны, необходимо было его конъюгировать с каким-либо белком. Наиболее распространенный в лабораторной практике белок – это бычий сывороточный альбумин (БСА), поэтому в качестве белка-носителя использовали его.

БСА имеет около 30 поверхностно доступных аминогрупп [45]. Для присоединения цитиколина к БСА использовали глутаровый альдегид, который одной карбонильной группой присоединялся к NH_2 -группе БСА, а второй карбонильной группой - к NH_2 -аромагруппе цитиколина с образованием основания Шиффа (рис. 6). Методика получения конъюгата БСА-цитиколин была адаптирована из статьи [21] с уменьшением молярного соотношения глутарового альдегида к БСА в 20000 раз до 100:1; соотношение цитиколина к БСА составило 45:1 без изменений. Такие молярные избытки глутарового альдегида и цитиколина к БСА необходимы, чтобы обеспечить максимальную загрузку БСА цитиколином, но при этом не допустить соединения молекул БСА между собой. Очистку продукта реакции проводили методом гель-фильтрации с использованием спин-колонок с порогом исключения 40 кДа. Далее для восстановления основания Шиффа конъюгат обрабатывали в мягких условиях раствором цианборгидридом натрия (молярное соотношение к БСА 11:1). Поскольку избыток глутарового альдегида был удален методом

гель-фильтрации, то ожидается восстановление именно $-\text{CH}=\text{N}-$ связи. Альтернативой стадии восстановления может быть лиофилизация продукта для минимизации дальнейшего гидролиза основания Шиффа [21].

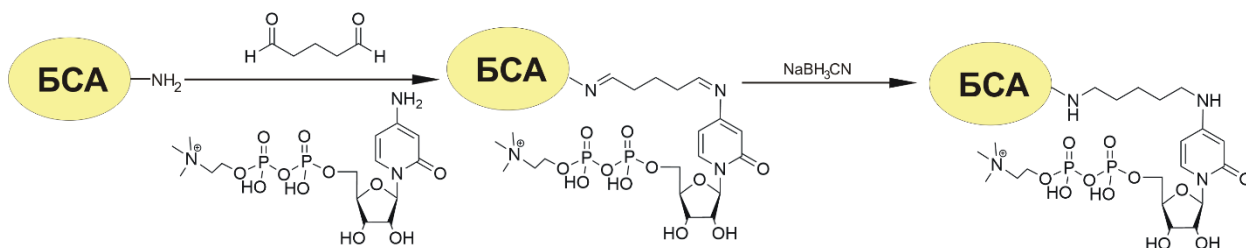


Рисунок 6. Схема реакции получения БСА-цитиколин.

Важно, что стадия восстановления должна быть ограниченной во времени и проводиться при охлаждении, поскольку при иных условиях происходит агрегация конъюгатов БСА-цитиколин с полной потерей функциональной активности цитиколина, которую мы наблюдали в дальнейших экспериментах по проточному анализу СРБ. Если использовать большее количество цианборгидрида, то может произойти медленное разрушение дисульфидных мостиков в молекуле БСА [46], хотя по литературным данным этот побочный процесс, также приводящий к потере функциональной активности, чаще происходит при использовании в качестве восстановителя NaBH_4 [47].

Для оценки эффективности очистки конъюгата БСА-цитиколин от несвязавшегося цитиколина в качестве контроля очистили смесь исходных реагентов, БСА и цитиколина, без проведения реакции. Коэффициенты молярного поглощения БСА и цитиколина равны $43824 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $9167 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ соответственно [48, 19], то есть одного порядка величины, что делает возможной такую оценку методом оптического поглощения по положению максимума оптического поглощения полученных растворов. Исходная смесь БСА и цитиколина имеет максимум поглощения на 272 нм, что соответствует максимуму оптического поглощения цитиколина [21]. Однако за счет значительного молярного избытка цитиколина в анализируемой смеси, максимум поглощения смеси БСА и цитиколин находится на той же длине волны (272 нм), что и максимум поглощения цитиколина. Однако после очистки максимум поглощения конъюгата БСА-цитиколин становится равным максимуму поглощения БСА (277 нм), то есть смесь БСА и цитиколина обедняется по цитиколину, а значит, очистка эффективна для удаления избытка непрореагировавшего цитиколина (рис. 7).

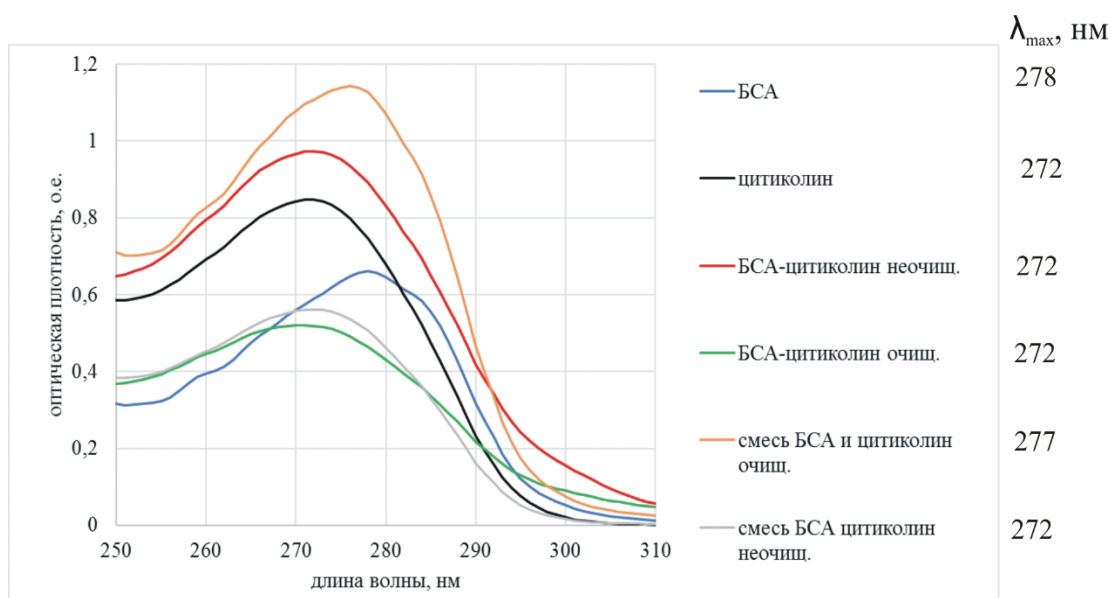


Рисунок 7. Спектры оптического поглощения БСА, конъюгатов БСА-цитиколин и смеси БСА и цитиколин (реакционных смесей и очищенных продуктов методом гель-фильтрации).

Таким образом, были установлены условия очистки конъюгатов БСА-цитиколин. Максимум поглощения очищенного конъюгата соответствует максимуму поглощения цитиколина (рис. 7), что подтверждает ковалентное присоединение цитиколина к БСА в соответствии с литературными данными [21].

Раствор конъюгата БСА-цитиколин сразу же наносили на тестовую линию НЦМ для сохранения его максимальной функциональности и минимизации денатурации БСА.

Кроме того, свежеприготовленные конъюгаты БСА-цитиколин использовали для иммобилизации на поверхности НЧЗ. Для этого НЧЗ предварительно стабилизировали растворами ПЭГ-2000 и Tween 20, как описано в п. 3.2.

3.4. Получение конъюгатов НЧЗ-S-ПЭГ-цитиколин и НЧЗ-S-ПЭГ-аптамер

Ранее нами был разработан способ ковалентного присоединения флуоресцеина к НЧЗ через линкер $-S-ПЭГ-NH-(CH_2)_6-NH-$ [49]. Для иммобилизации цитиколина на НЧЗ решили использовать данную стратегию, которая показала свою эффективность. HS-ПЭГ-COOH – широко распространенный реагент в химии НЧЗ [50-51]. За счет тиольной группы происходит ковалентное присоединение HS-ПЭГ-COOH с образованием связи Au-S. Далее после отмывки конъюгата НЧЗ-S-ПЭГ-COOH от непрореагировавшего HS-ПЭГ-COOH провели активацию карбоксильной группы с помощью ЕДК в буфере РВ pH 6,0 в течение 1 минуты (рис. 8, таблица 6). pH 6,0 – оптимальное значение для ЕДК-опосредованной конденсации (при более высоком значении pH ЕДК быстро гидролизует) [52-54]. Также важен порядок добавления реагентов. В течение первой минуты ЕДК реагирует с COOH-группой, образуя O-ацилизомочевину, которая в дальнейшем реагирует с NH₂-группой.

Если гексаметилендиамин добавить позже, то активированная форма гидролизуетя обратно с образованием -COOH.

Таблица 6. Количество моль реагентов при синтезе конъюгатов НЧЗ с цитиколином.

Реагент	Количество вещества, моль
НЧЗ	$4 \cdot 10^{-12}$
HS-ПЭГ-COOH	$3 \cdot 10^{-8}$
ЕДК	$4 \cdot 10^{-6}$
гексаметилендиамин	$4 \cdot 10^{-8}$
Глутаровый альдегид	$5 \cdot 10^{-9}$
Цитиколин	$7,7 \cdot 10^{-9}$
NaBCNH ₃	$1,6 \cdot 10^{-6}$

Модифицированные гексаметилендиамином НЧЗ отмывали от избытка непрореагировавших реагентов. На следующей стадии к конъюгатам в строгой последовательности добавляли глутаровый альдегид, а затем через минуту цитиколин; это необходимо для предотвращения сшивки молекул цитиколина между собой и образования мостиков между разными НЧЗ (рис. 8, таблица 6). рКа алифатических аминов составляет около 9-10, соответственно, при рН 8,3 часть аминогрупп депротонирована, что позволяет реакции протекать более контролируемо. Продукт реакции отмывали от непрореагировавших реагентов. На завершающей этапе необходимо провести восстановление оснований Шиффа, для чего достаточно 30 минут взаимодействия с раствором NaBCNH₃ с концентрацией в реакционной смеси 1,6 мМ (рис. 8, таблица 6). При использовании NaBH₄ в той же концентрации или NaBCNH₃ в большей концентрации происходит агрегация НЧЗ. Более сильный восстановитель NaBH₄ способен восстанавливать поверхностные атомы Au(I) до Au(0) [55], что приводит к разрыву связи Au-S и десорбции ПЭГ с поверхности НЧЗ, вызывая их агрегацию.

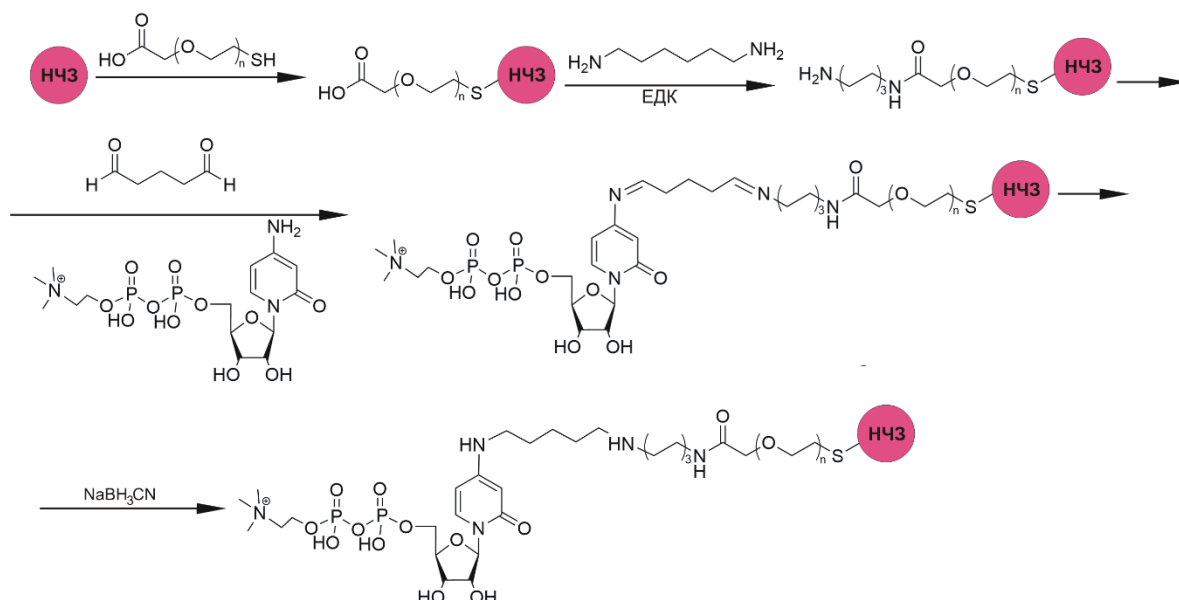


Рисунок 8. Схема синтеза конъюгата НЧЗ-S-ПЭГ-цитиколин.

На каждом этапе синтеза измеряли гидродинамический диаметр и электрохимический потенциал конъюгатов методом ФКС для оценки эффективности протекания реакции (таблица 7).

Таблица 7. ФКС образцов в 5 мМ HEPES pH 7,4.

Образец	d_H , нм	ζ , мВ	PdI
Исходные НЧЗ	24±9	-18±1	0,213
НЧЗ-ПЭГ	52±22	-27±3 (80%)	0,312
НЧЗ-NH ₂	49±22	-21±2 (80%)	0,211
НЧЗ-цитиколин	45±20	-22±4	0,202
НЧЗ-цитиколин-восстановленные	53±40	-24±1	0,342

Карбоксильные группы НЧЗ-ПЭГ при pH 7,4 отрицательно заряжены, соответственно при иммобилизации на исходные НЧЗ HS-ПЭГ-COO⁻ электрохимический потенциал частиц уменьшается (таблица 7). Далее при присоединении гексаметилендиамина к конъюгату НЧЗ-S-ПЭГ-COO⁻ получающийся конъюгат НЧЗ-NH₃⁺ при pH 7,4 имеет положительно заряженные аминогруппы на конце, но поскольку на НЧЗ адсорбирован также отрицательно заряженный цитрат-анион, общий электрохимический потенциал остается отрицательным, но модуль электрохимического потенциала уменьшается. Это согласуется с данными электрофоретического разделения в агарозном геле: конъюгаты НЧЗ-ПЭГ за счет большего по модулю электрохимического потенциала имеют большую электрофоретическую подвижность, чем конъюгаты НЧЗ-NH₂ (pH 8,3) (рис. 9).

Пирофосфатная группа цитиколина несет постоянный заряд, равный -2, холин несет положительный заряд. Соответственно, при присоединении цитиколина к НЧЗ-NH₂ при pH 8,3 (условия агарозного электрофореза) общий электрохимический потенциал становится меньше в сравнении с конъюгатами НЧЗ-NH₂. Соответственно, конъюгаты НЧЗ-цитиколин

имеют большую подвижность в агарозном геле в сравнении с конъюгатами НЧЗ-NH₂ (рис. 9).

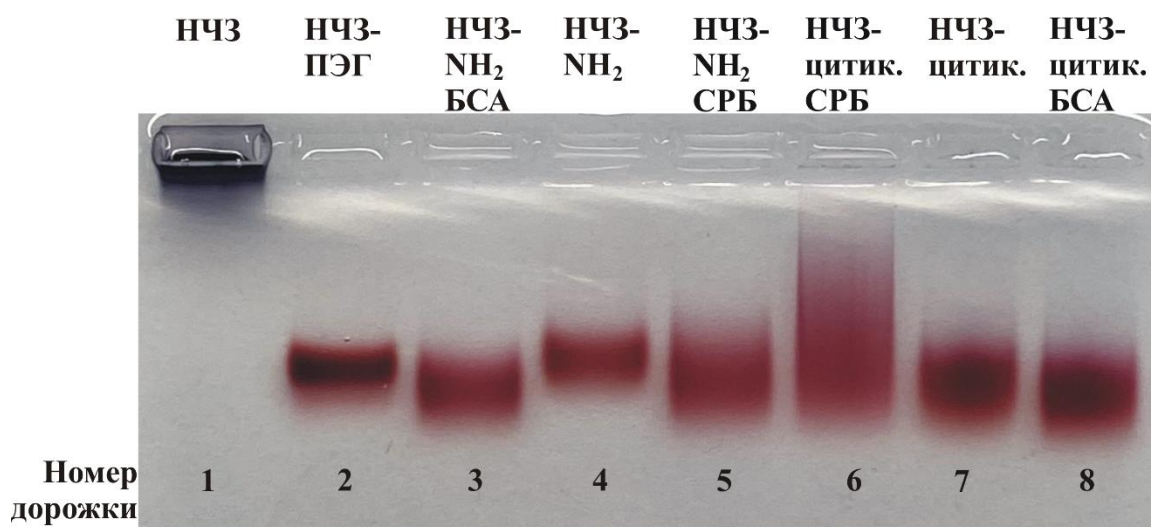


Рисунок 9. Сканированное изображение 0,4 % агарозного геля для анализа электрофоретической подвижности конъюгатов НЧЗ и их комплексов с СРБ и/или БСА.

Наблюдали разную электрофоретическую подвижность конъюгатов НЧЗ-NH₂ и НЧЗ-цитиколин после 1 ч инкубации со смесью СРБ и БСА (молярное соотношение 1:60 к пентамерной форме СРБ) (дорожки 5, 6 рис. 9). Это говорит о разном характере связывания СРБ с данными конъюгатами, поскольку подвижность конъюгатов НЧЗ-цитиколин и НЧЗ-NH₂ после инкубации с БСА сравнима (дорожки 3, 8 рис. 9). Подвижность конъюгатов НЧЗ-цитиколин после инкубации со смесью СРБ и БСА и чистым БСА также различаются (дорожки 6, 8 рис. 9), то есть на конъюгатах НЧЗ-цитиколин преимущественно адсорбируется СРБ, и это определяет подвижность полученного комплекса в геле.

На основе конъюгатов НЧЗ-S-ПЭГ-COON с использованием ЕДК и NH₂-модифицированных аптамеров были получены конъюгаты НЧЗ-S-ПЭГ-аптамер (рис. 10).

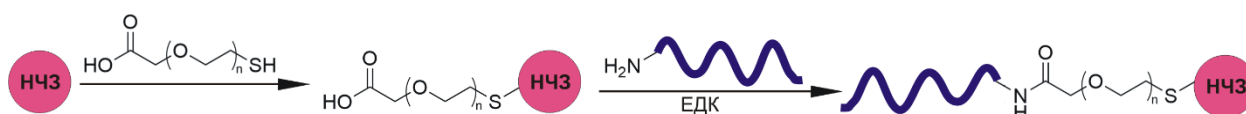


Рисунок 10. Схема синтеза конъюгата НЧЗ-S-ПЭГ-аптамер.

3.5. Получение конъюгатов БСА-аптамер и ассоциатов НЧЗ/БСА-аптамер

Для иммобилизации аптамера на тестовой линии получали конъюгат NH₂-модифицированного аптамера с БСА с помощью ЕДК (рис. 11).

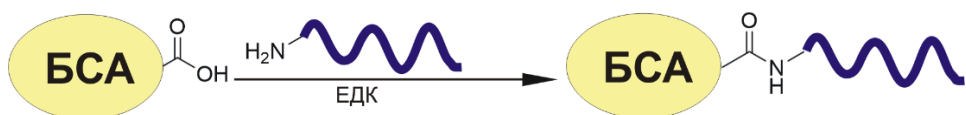


Рисунок 11. Схема синтеза конъюгата БСА-аптамер.

БСА имеет около 60 поверхностно доступных карбоксильных групп [45], соответственно, при данной методике синтеза можно получить до 60 молекул аптамера на поверхности БСА.

БСА выполняет функцию белка-носителя, так как непосредственная иммобилизация олигонуклеотидов на нитроцеллюлозной мембране неэффективна из-за их малого размера и вымывания при промывке [56]. Ковалентное присоединение аптамера к БСА увеличивает молекулярную массу конъюгата, что обеспечивает его надежное удерживание на тестовой линии на счет нековалентных взаимодействий.

3.6. Определение условий блокирования конъюгатов НЧЗ с молекулами распознавания и состава буфера для связывания мишени

В процессе синтеза конъюгатов НЧЗ с молекулами распознавания полное покрытие поверхности НЧЗ целевыми молекулами чаще всего не достигается. Это, вероятнее всего, обусловлено стерическими ограничениями. В результате после иммобилизации часть поверхности НЧЗ остается свободной, а значит, сохраняет исходно высокую способность к адсорбции разнообразных соединений. Это приводит к высокой неспецифической сорбции на поверхность НЧЗ любых белков или иных молекул, присутствующих в анализируемой пробе, что повышает фоновый сигнал.

Таким образом, блокировка остаточной свободной поверхности НЧЗ инертными соединениями является обязательным технологическим этапом для реализации специфического связывания мишени.

Для поиска условий блокирования поверхности НЧЗ в качестве модельного конъюгата НЧЗ, на который потенциально можно иммобилизовать молекулы распознавания, использовали НЧЗ-S-PEG-COOH. Этот конъюгат был использован как предшественник для ковалентной иммобилизации цитиколина и аптамера.

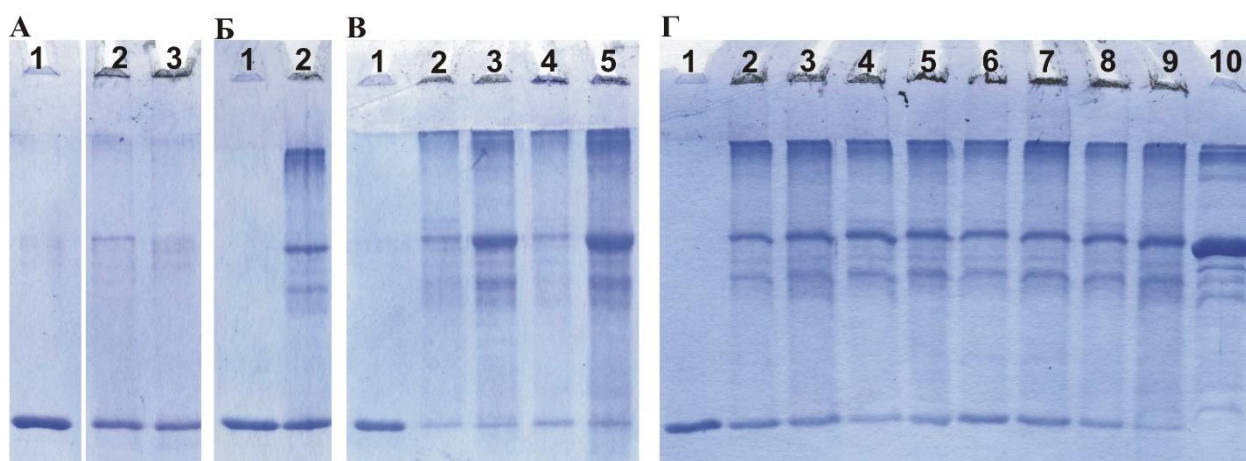


Рисунок 12. Сканированные изображения гелей после белкового электрофореза по Лэммли. **(А)** Сорбция молекул СРБ на поверхности исходных НЧЗ и модифицированных НЧЗ в течение 1 ч при комнатной температуре в водном растворе: **(1)** контроль интенсивности СРБ; **(2)** НЧЗ-S-ПЭГ-СООН/СРБ; **(3)** НЧЗ/СРБ. **(Б)** Сорбция СРБ на конъюгаты НЧЗ, блокированные раствором, содержащим 1% Tween 20, 0,16% БСА в течение 1 ч: **(1)** контроль интенсивности СРБ; **(2)** НЧЗ-S-ПЭГ-СООН (блок.)/СРБ. **(В)** Сорбция СРБ на блокированные конъюгаты НЧЗ-S-ПЭГ-СООН или блокированные НЧЗ в 2 мМ растворе CaCl_2 в течение 10 мин: **(1)** контроль интенсивности СРБ; разные варианты блокирующих буферов **(2)** блокирование НЧЗ-S-ПЭГ-СООН послойно 1) раствором, содержащим 0,16% БСА, 1% Tween 20, 2) 400-кратным молярным избытком FAM по отношению к НЧЗ-S-ПЭГ-СООН; **(3)** блокирование НЧЗ послойно 1) раствором, содержащим 0,16% БСА, 1% Tween 20, 2) 400-кратным молярным избытком FITC по отношению к НЧЗ; **(4)** блокирование НЧЗ-S-ПЭГ-СООН послойно 1) раствором, содержащим 0,16% БСА, 1% Tween 20, 2) раствором, содержащим 0,16% казеин; **(5)** блокирование НЧЗ послойно 1) раствором, содержащим 0,16% БСА, 1% Tween 20, 2) раствором, содержащим 0,16% казеин. **(Г)** Сорбция СРБ на блокированные конъюгаты НЧЗ-S-ПЭГ-СООН или блокированные НЧЗ-S-ПЭГ-цитиколин в растворе 2 мМ CaCl_2 , 40 мМ MES pH 5,0 в течение 10 мин: **(1)** контроль интенсивности СРБ; разные варианты блокирующих буферов **(2)** блокирование НЧЗ-S-ПЭГ-цитиколин послойно 1) раствором, содержащим 0,16% БСА, 1% Tween 20, 2) 400-кратным молярным избытком FAM по отношению к НЧЗ; **(3)** блокирование НЧЗ-S-ПЭГ-СООН послойно 1) раствором, содержащим 0,16% БСА, 1% Tween 20, 2); **(4)** блокирование НЧЗ-S-ПЭГ-цитиколин послойно 1) 400-кратным молярным избытком FITC по отношению к НЧЗ, 2) раствором, содержащим 0,16% БСА, 1% Tween 20; **(5)** блокирование НЧЗ-S-ПЭГ-СООН послойно 1) 400-кратным молярным избытком FITC по отношению к НЧЗ, 2) раствором, содержащим 0,16% БСА, 1% Tween 20; **(6)** блокирование НЧЗ-S-ПЭГ-цитиколин послойно 1) раствором, содержащим 0,16% БСА, 1% Tween 20, 2) 400-кратным молярным избытком АТР по отношению к НЧЗ; **(7)** блокирование НЧЗ-S-ПЭГ-СООН послойно 1) раствором, содержащим 0,16% БСА, 1% Tween 20, 2) 400-кратным молярным избытком АТР по отношению к НЧЗ; **(8)** блокирование НЧЗ-S-ПЭГ-цитиколин послойно 1) 400-кратным молярным избытком АТР по отношению к НЧЗ, 2) раствором, содержащим 0,16% БСА, 1% Tween 20; **(9)** блокирование НЧЗ-S-ПЭГ-СООН послойно 1) 400-кратным молярным избытком АТР по отношению к НЧЗ, 2) раствором, содержащим 0,16% БСА, 1% Tween 20.

Для оценки уровня неспецифического связывания белков на поверхности НЧЗ был выбран метод белкового электрофореза по Лэммли. Этот метод позволяет проанализировать, с какой интенсивностью тот или иной белок сорбируется на поверхности конъюгатов НЧЗ относительно всех присутствующих в смеси белков. Из рисунка 12А

видно, что СРБ неспецифически сорбируется и на исходные НЧЗ, и на конъюгаты НЧЗ-S-PEG-COOH, что подтверждает необходимость блокировки поверхности конъюгатов НЧЗ.

Мы решили блокировать поверхность НЧЗ-S-ПЭГ-COOH раствором, содержащим 0,16% БСА, 1% Tween 20 в течение 10 минут, а далее проинкубировать обработанные таким образом конъюгаты с СРБ течение 1 ч в 2 мМ CaCl₂ (рис. 12Б). Обнаружили, что при такой блокировке СРБ сорбируется количественно на конъюгаты НЧЗ после 1 ч инкубации. Т.е., такая блокировка недостаточна для минимизации неспецифических взаимодействий поверхности конъюгата НЧЗ с СРБ. Опробовали два варианта двухстадийной блокировки поверхности НЧЗ, а именно сначала блокирование НЧЗ раствором, содержащим БСА и Tween 20, далее отмывка от избытка блокирующих реагентов, а затем обработка НЧЗ раствором, содержащим FITC или раствором, содержащим казеин. Логика данного протокола блокировок была следующая: сначала поверхность НЧЗ покрывали БСА – белком с молярной массой 66 кДа, а затем незакрытые поверхности покрывали в первом случае FITC – низкомолекулярным соединением, а во втором случае казеином – белком с меньшей молекулярной массой (около 25 кДа). НЧЗ или их конъюгаты отмывали от избытка блокировочных реагентов и инкубировали с СРБ в 2 мМ растворе CaCl₂ в течение 10 мин. Из рисунка 12В видно, что вне зависимости от варианта блокирования присутствует неспецифическое связывание НЧЗ или конъюгата НЧЗ-S-ПЭГ-COOH с СРБ. При адсорбции FITC или казеина в качестве второго слоя на поверхность конъюгатов НЧЗ-S-ПЭГ, предварительно блокированных БСА, наблюдается снижение количества неспецифически связавшегося СРБ в течение 10 минут.

Изменили стратегию блокирования конъюгатов НЧЗ: сначала обрабатывали конъюгаты низкомолекулярными соединениями (FITC или АТР), убрали несвязавшиеся FITC или АТР и обрабатывали НЧЗ раствором, содержащим 0,16% БСА и 1% Tween 20 (рис. 12Г). Видим, что обработка НЧЗ сначала низкомолекулярным соединением, а затем полимером является более удачной стратегией блокирования, поскольку в дорожках 4, 5, 8, 9 интенсивность полосы СРБ меньше, чем в дорожках 2, 3, 6, 7. Однако также наблюдается высокая степень неспецифических взаимодействий.

Можно заключить, что неспецифические взаимодействия реализуются преимущественно из-за электростатических взаимодействий, а значит, нужно варьировать состав раствора для связывания СРБ с конъюгатами НЧЗ (рис. 13).

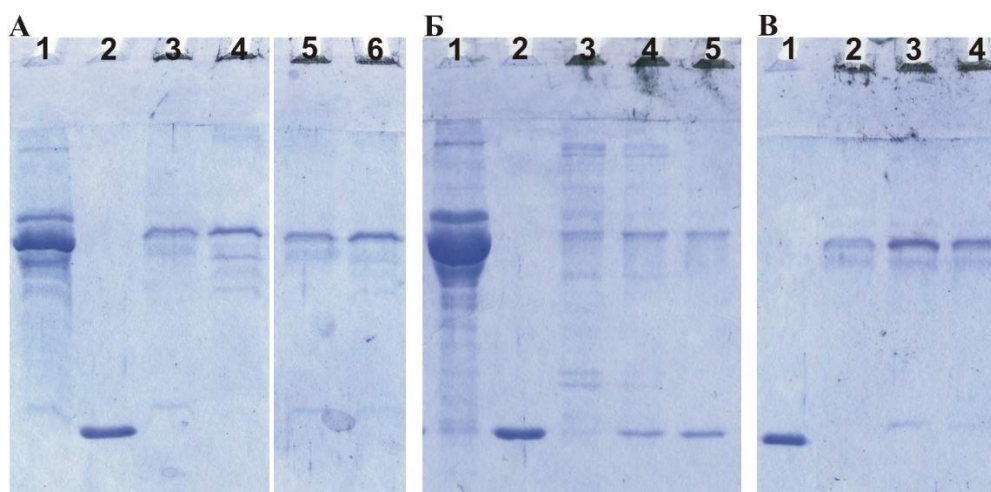


Рисунок 13. Сканированные изображения гелей после белкового электрофореза по Лэмбли.

(А) Сорбция молекул СРБ на поверхности конъюгатов НЧЗ-S-ПЭГ-COОН в течение 10 мин при комнатной температуре в 10 мМ растворе PBS: **(1)** контроль FBS; **(2)** контроль СРБ; **(3)** инкубация конъюгатов НЧЗ-S-ПЭГ-COОН, блокированных раствором, содержащим 4% FBS и 1% Tween 20, с СРБ; **(4)** инкубация конъюгатов НЧЗ-S-ПЭГ-COОН, блокированных предварительно в две стадии 1) 0,16% БСА и 1% Tween 20, 2) 400-кратный молярный избыток АТР, с СРБ; **(5)** инкубация конъюгатов НЧЗ-S-ПЭГ-COОН с 4% раствором FBS; **(6)** инкубация конъюгатов НЧЗ-S-ПЭГ-COОН, блокированных предварительно в две стадии 1) 0,16% БСА и 1% Tween 20, 2) 400-кратный молярный избыток АТР, с СРБ в 4% растворе FBS. **(Б)** Сорбция молекул СРБ на конъюгаты НЧЗ-S-ПЭГ-COОН в течение 10 мин при комнатной температуре в 10 мМ HEPES pH 7,4, 1 мМ CaCl₂: **(1)** контроль FBS; **(2)** контроль СРБ; инкубация конъюгатов НЧЗ-S-ПЭГ-COОН, блокированных в две стадии 1) 400-кратный молярный избыток АТР, 2) 0,16% БСА и 1% Tween 20, **(3)** с 4% раствором FBS; **(4)** с СРБ в 4% растворе FBS; **(5)** с СРБ. **(В)** Сорбция молекул СРБ на конъюгаты НЧЗ-S-ПЭГ-COОН в течение 10 мин при комнатной температуре в 10 мМ HEPES pH 7,4, 1 мМ CaCl₂, 150 мМ NaCl: **(1)** контроль FBS; **(2)** контроль СРБ; инкубация конъюгатов НЧЗ-S-ПЭГ-COОН, блокированных в две стадии 1) 400-кратный молярный избыток АТР, 2) 0,16% БСА и 1% Tween 20, **(3)** с СРБ в 4% растворе FBS; **(4)** с 4% раствором FBS; **(5)** с СРБ.

Согласно рисунку 13А при взаимодействии конъюгатов НЧЗ-S-ПЭГ-COОН с СРБ в бычьей эмбриональной сыворотке в 10 мМ PBS доля неспецифических взаимодействий СРБ с поверхностью конъюгатов НЧЗ заметно уменьшилась и в случае, когда конъюгаты НЧЗ-S-ПЭГ-COОН были блокированы раствором, содержащим 4% FBS и 1% Tween 20 (*дорожка 3* рис. 13А), и в случае, когда конъюгаты блокированы в две стадии 1) 0,16% БСА и 1% Tween 20, 2) 400-кратный молярный избыток АТР (*дорожка 4, 6* рис. 13А), и в случае, когда конъюгаты НЧЗ предварительно ничем не были блокированы (*дорожка 5* рис. 13А).

Однако известно, что для реализации взаимодействия цитиколина как молекулы распознавания, иммобилизованной на НЧЗ, с СРБ необходимо присутствие Ca²⁺. При добавлении CaCl₂ в 10 мМ PBS образуются нерастворимые осадки гидрофосфата и дигидрофосфата кальция. Поэтому заменили PBS pH 7,4 на 10 мМ HEPES pH 7,4. На рисунке 13Б видно, что при инкубации СРБ с конъюгатами НЧЗ-S-ПЭГ-COОН в 10 мМ HEPES pH 7,4 с добавлением 1 мМ CaCl₂, высока доля неспецифических взаимодействий и

в присутствии FBS, и без FBS. Далее добавили 150 мМ NaCl в раствор для инкубации, эта концентрация равна содержанию NaCl в 10 мМ PBS. При инкубации СРБ с конъюгатами НЧЗ-S-ПЭГ-COOH в буферном растворе, содержащем 10 мМ HEPES pH 7,4, 1 мМ CaCl₂, 150 мМ NaCl неспецифические взаимодействия СРБ с конъюгатами НЧЗ-S-ПЭГ-COOH минимальны и в присутствии FBS, и без FBS: в дорожках 3 и 5 не наблюдается полоса СРБ (рис. 13В).

Таким образом, для минимизации неспецифического взаимодействия СРБ с конъюгатами НЧЗ-S-ПЭГ-COOH необходимо обеспечить определенную ионную силу в буферном растворе для связывания. Высокая ионная сила может ослабить электростатические взаимодействия [57]. Оптимальный раствор для связывания СРБ и конъюгата НЧЗ содержал 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl и 1 мМ CaCl₂.

Далее методом белкового электрофореза по Лэммли оценили уровень неспецифического взаимодействия СРБ с НЧЗ, модифицированными антителами IgG к СРБ (рис. 14). Связывание между антителом и антигеном происходит за счет участия электростатических сил, водородных связей, ван-дер-ваальсовых сил, гидрофобных взаимодействий [58]. Соответственно, для минимизации гидрофобных, ван-дер-ваальсовых взаимодействий необходимо заблокировать свободную поверхность НЧЗ, а для минимизации электростатических сил проводить связывание СРБ с НЧЗ, модифицированными IgG, в буферном растворе с достаточной ионной силой.

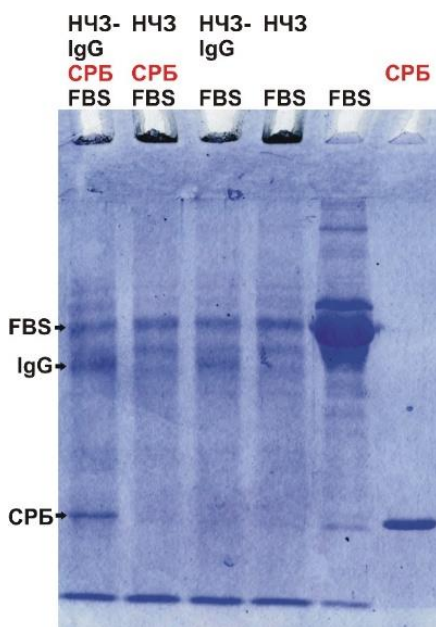


Рисунок 14. Сканированное изображение геля после белкового электрофореза по Лэммли. Сорбция СРБ на исходные НЧЗ и НЧЗ, модифицированные IgG в течение 10 мин при комнатной температуре в растворе, содержащем 100 мМ NaCl, 10мМ CaCl₂, 10 мМ HEPES pH 7,4, 50% FBS.

Поверхность конъюгатов НЧЗ-IgG блокировали от неспецифических взаимодействий раствором, содержащим 5% сахарозы, 1% БСА, 1%, PEG-20000, 0,05% Tween20, для

блокирования. БСА – основной агент, блокирующий поверхность НЧЗ, сахараза выступает в качестве криопротектора, ПЭГ-20000 уменьшает трение конъюгата о волокна мембраны, что делает фронт жидкости более ровным, Tween 20 защищает конъюгаты НЧЗ от агрегации и снижает поверхностное натяжение жидкости, обеспечивая равномерный поток образца с достаточной скоростью по порам нитроцеллюлозы. Этап блокирования поверхности конъюгата проводили при комнатной температуре и перемешивании в течение 10 мин. Далее отмывали конъюгаты от избытка блокировочного раствора и инкубировали их с 50 мкл анализируемого раствора, содержащего 100 мМ NaCl, 10мМ CaCl₂, 10 мМ HEPES pH 7,4, 50% FBS, 0,5 мкг СРБ. Затем центрифугировали при 16100 g и делали две отмывки конъюгата раствором 100 мМ NaCl, 10мМ CaCl₂, 10 мМ HEPES pH 7,4 объемом 1 мл каждая.

Исходные НЧЗ подвергали такой же обработке: блокировали поверхность, убирали избыток блокировочного раствора, а затем инкубировали с СРБ. СРБ сорбируется только на конъюгаты НЧЗ с IgG, но не на НЧЗ (*дорожка 1, 2* рис. 14).

Таким образом, данные электрофоретического анализа подтверждают специфическое связывание СРБ с конъюгатами НЧЗ-IgG в условиях блокирования, идентичных условиям проточного анализа.

3.7 Различные варианты тест-систем

Анализируемый раствор для детекции СРБ в разрабатываемых тест-системах содержал 50-100% бычьей фетальной сыворотки (FBS) или сыворотки человека (HS), 0-80 мг/л СРБ, 0-10 мМ HEPES pH 7,4, 0-40 мМ NaCl, 0-40 мМ CaCl₂, 0-40 мМ MgCl₂. На подушку для образца тест-полоски наносили 50 мкл анализируемого раствора. Результат анализа фиксировали по истечении 10 минут.

3.7.1. Тест-система на основе конъюгатов НЧЗ-IgG и IgG, иммобилизованных на НЦМ

В первой сконструированной в данном исследовании тест-системе молекулы IgG были иммобилизованы как на поверхности НЧЗ, так и на тестовой линии нитроцеллюлозной мембраны. Данная тест-система в дальнейшем служила отправной точкой при анализе функциональных характеристик тест-систем, сконструированных с использованием иных комбинаций молекул распознавания на тестовой линии и на НЧЗ (рис. 15А).

Это тест-система сэндвич-формата, в которой один тип молекул распознавания иммобилизован и на тестовую линию, и на НЧЗ, а значит, тройной комплекс на тестовой линии может реализоваться только в том случае, если СРБ находится в пентамерной форме. Ионы Ca²⁺ могут влиять на сборку пентамерной структуры СРБ [59], поэтому проверили

чувствительность анализа к присутствию ионов Ca^{2+} . Анализируемый раствор (50% FBS, 1 мг/мл) либо содержал ионы Ca^{2+} , либо нет, при этом в данном эксперименте подушка для образца тест-полоски не была ничем обработана. Как оказалось, ионы Ca^{2+} не влияют на связывание СРБ с IgG в данной системе (рис. 15В). Соответственно, пентамерная форма СРБ реализуется и в присутствии, и в отсутствие Ca^{2+} , что позволяет использовать сэндвич формат тест-системы с одинаковыми молекулами распознавания на тестовой линии и на НЧЗ.

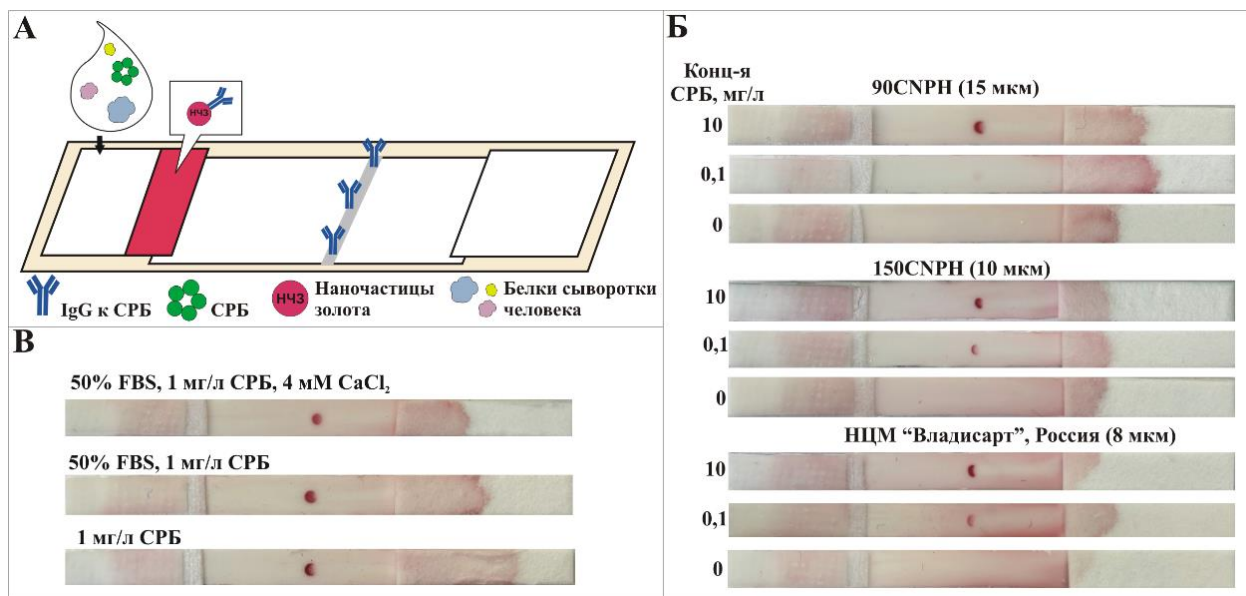


Рисунок 15. Тест-система НЧЗ-IgG, IgG на тестовой линии. (А) Схематическое изображение устройства тест-полоски на основе IgG как молекулы распознавания. (Б) Фотографии тест-полосок с НЧЗ разного размера пор (90CNPH, 150CNPH, Владисарт 8,0 мкм) после анализа. (В) Фотографии тест-полосок после анализа, демонстрирующие отсутствие влияния ионов Ca^{2+} в анализируемом растворе на результат детекции.

В работе были рассмотрены различные виды широко используемых на практике коммерчески доступных нитроцеллюлозных аналитических мембран фирмы MDI (Индия). При выборе оптимальной мембраны учитывали такие параметры как размер пор и степень связывания белков.

Таблица 8. Зависимость характеристик анализа от размера пор аналитической мембраны.

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

Например, при увеличении размера пор увеличивается скорость потока жидкости в толще мембраны, соответственно, уменьшается время анализа. Мембраны с меньшим

размером пор имеют большую площадь поверхности, и позволяют связывать гораздо большее количество мишени в тестовой зоне, что способствует регистрации их в меньшем количестве и созданию более чувствительного анализа (таблица 8).

Для мембран с разным размером пор: 90CNPН (15 мкм), 150CNPН (10 мкм), нитроцеллюлозный фильтр «Владисарт», Россия (8 мкм) – практический предел детекции составил 0,1 мг/л (рис. 15Б), с меньшей интенсивностью тестовой полосы для 90CNPН, что коррелирует с размером пор мембраны. Поскольку клинически значимая концентрация СРБ для детекции воспаления должна составлять 5 мг/л, а для оценки риска сердечно-сосудистых заболеваний – 1,0 мг/л, в зависимости от задачи тестирования необходимо будет проводить 10-кратное или 50-кратное разведение анализируемого образца для достижения клинически значимого порога. Таким образом, данная тест-система позволяет диагностировать острые воспалительные процессы, и диагностировать пациентов по группам риска сердечно-сосудистых заболеваний.

Рассмотрим теперь соотношения реагентов в представленной тест-системе. На тестовую линию наносили 0,25 мкл 1,0 мг/мл IgG, что соответствует 1,67 пмоль IgG. В составе порции конъюгата НЧЗ/IgG, загруженной в подушку для конъюгата, иммобилизовано (принимая эффективность иммобилизации IgG на НЧЗ за 100 %) 0,12 мкл 1,0 мг/мл IgG, что соответствует 0,8 пмоль IgG. На подушку для конъюгата наносили 20 мкл 3,9 нМ НЧЗ, что соответствует 0,078 пмоль НЧЗ. Таким, образом на одной НЧЗ может быть иммобилизовано до 10 молекул IgG. Ниже в таблице 9 представлены расчеты для разных концентраций СРБ в объеме пробы 50 мкл.

Таблица 9. Соотношения количества IgG на тестовой линии, IgG на НЧЗ и СРБ в анализируемом растворе.

Концентрация СРБ, мг/л	Количество СРБ, пмоль	Соотношение IgG (НЧЗ): IgG (тестовая линия): СРБ
0,1	0,04	20: 41,75: 1
1	0,4	2: 4,175: 1
10	4	1: 2: 5
100	40	1: 2: 50

При низких концентрациях СРБ (0,1-1 мг/л) IgG на НЧЗ и тестовой линии находятся в избытке относительно СРБ. Это обеспечивает эффективный захват антигена и формирование видимого сигнала. При высоких концентрациях СРБ (10-100 мг/л) количество СРБ превышает количество иммобилизованного IgG (как на НЧЗ, так и на тестовой линии). Это может приводить к эффекту крючка – снижению сигнала при очень высоких концентрациях СРБ из-за связывания на тестовой линии свободного СРБ, без НЧЗ-IgG. Однако с учетом того, что для достижения клинически значимых результатов необходимо 10-кратное или 50-кратное разведение образца перед анализом, исходная концентрация СРБ в сыворотке 10 мг/л будет разбавляться в анализируемом образце до 1 и

0,2 мг/л СРБ соответственно, а для концентрации СРБ в сыворотке 100 мг/л до 10 мг/л и 2 мг/л соответственно. Т.е. разбавление образца в данном случае предотвращается ложнозаниженные результаты.

Таким образом, была продемонстрирована возможность детекции СРБ в клинически значимом диапазоне концентраций в сэндвич-формате с парой IgG-IgG, что показало релевантность предложенной конструкции тест-полоски и позволило перейти к системам детекции на основе других молекул распознавания.

3.7.2. Тест-система на основе конъюгатов НЧЗ-IgG и конъюгатов БСА-цитиколин, иммобилизованных на НЦМ

В следующем варианте тест-системы для детекции СРБ IgG на тестовой линии заменили на цитиколин в качестве молекулы распознавания. Соответственно, на НЧЗ иммобилизовали IgG, а на тестовую линию – конъюгат бычьего сывороточного альбумина с цитиколином (рис. 16А). Чувствительность тест-системы оценивали с использованием серийных разведений СРБ. Минимальная концентрация, при которой наблюдалось визуально детектируемое окрашивание тестовой полосы, составила 1,0 мг/л в FBS, что соответствует клинически значимому порогу для оценки сердечно-сосудистого риска.

Также мы исследовали, влияет ли использование в тест-полоске мембран 90CNPН и CNPC-SS12 с одинаковым размером пор 15,0 мкм, но отличающихся способностью связывать белки (наивысший и высокий уровень связывания белка соответственно), на чувствительность анализа. Не было выявлено различий в детекции для данной тест-системы в рассматриваемом диапазоне концентраций. Соответственно, можно использовать оба типа мембраны для детекции СРБ (рис. 16Б, 16В).

Из рисунка 16Б, 16В видно, что при концентрации СРБ 61,2 мг/л в сыворотке человека, что характеризуется острым, активно текущим воспалением, также наблюдается интенсивное окрашивание тестовой линии, соответственно, не наблюдается эффекта крючка в данном диапазоне концентраций.

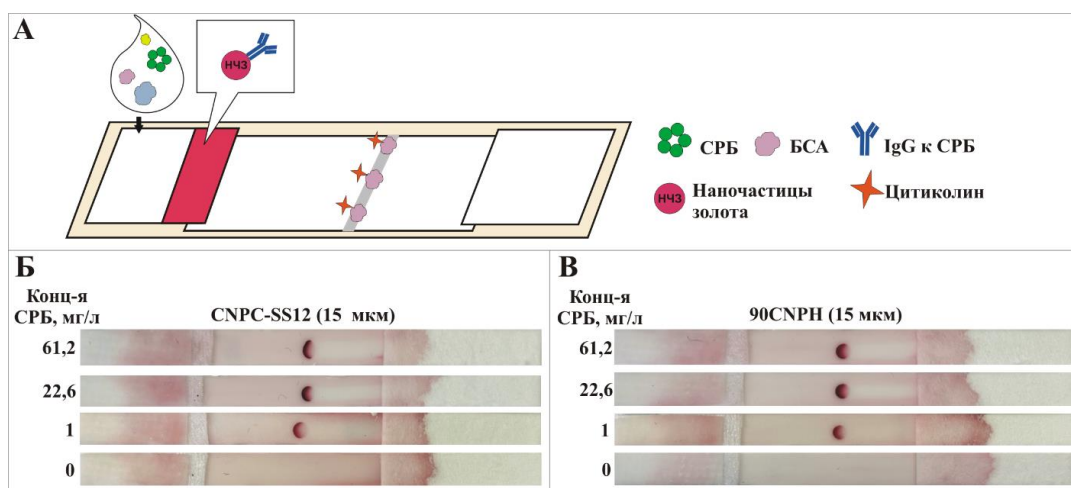


Рисунок 16. Тест-система НЧЗ-IgG, цитиколин на тестовой линии. (А) Схематическое изображение устройства тест-полоски на основе пары IgG-цитиколин. (Б) Фотографии тест-полосок с НЦМ CNPC-SS12 (15 мкм) после анализа. (В) Фотографии тест-полосок с НЦМ 90CNPH (15 мкм) после анализа.

Кроме того, проводили эксперименты с контрольным типом тест-полосок, когда на тестовую линию был иммобилизован БСА, для подтверждения вывода о том, что детекция СРБ происходит за счет связывания с цитиколином на тестовой линии, а не из-за неспецифического связывания СРБ с БСА. В концентрации СРБ 61,2 мг/л в сыворотке человека не наблюдали окрашивания тестовой полосы в данном типе тест-полоске, что говорит о связывании СРБ на тестовой линии исключительно за счет цитиколина.

3.7.3. Тест-система на основе конъюгатов НЧЗ-цитиколин и IgG, иммобилизованных на НЦМ

Поскольку предыдущий вариант тест-полоски оказался функциональным, была предпринята попытка установить, влияет ли пространственное расположение цитиколина (на поверхности НЧЗ или на тестовой линии) на эффективность определения СРБ. Соответственно, теперь на НЧЗ был иммобилизован цитиколин (с помощью разных подходов), а на тестовой линии - IgG (рис. 17А).

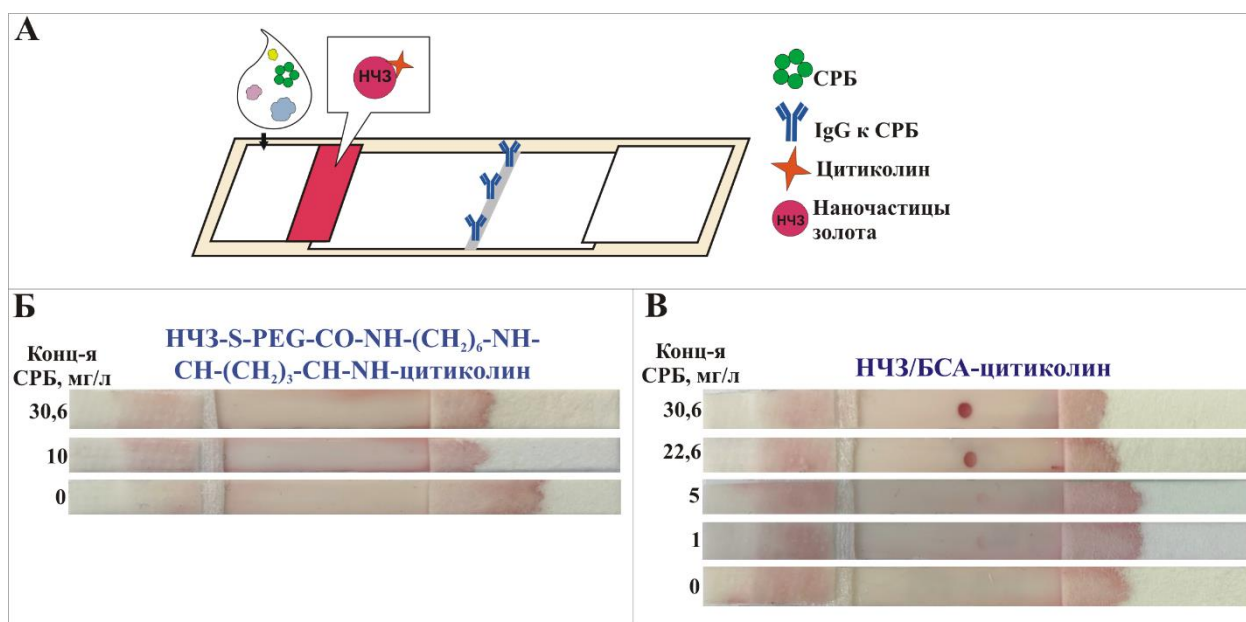


Рисунок 17. Тест-система НЧЗ-цитиколин, IgG на тестовой линии. (А) Схематическое изображение устройства тест-полоски на основе пары молекул распознавания цитиколин и IgG. (Б) Фотографии тест-полосок после анализа, где на подушку для конъюгата были нанесены НЧЗ-S-PEG-CO-NH-(CH₂)₆-NH-CH-(CH₂)₃-CH-NH-цитиколин. (В) Фотографии тест-полосок после анализа, где на подушку для конъюгата были нанесены НЧЗ/БСА-цитиколин.

Для модификации НЧЗ цитиколином использовали два подхода: ковалентная иммобилизация цитиколина на НЧЗ, модифицированных HS-PEG-COOH, и нековалентная адсорбция конъюгата БСА-цитиколин на НЧЗ. В случае ковалентного подхода не наблюдалось специфичности взаимодействия СРБ с цитиколином на НЧЗ (рис. 17Б). Вероятно, в данном типе наночастиц молекулы цитиколина оказываются экранированными в пространстве вблизи НЧЗ, заполненном длинными цепями ПЭГ. В случае же нековалентного подхода, при адсорбции конъюгата БСА-цитиколин на поверхности НЧЗ наблюдали специфическое связывание комплекса цитиколин-СРБ с IgG на тестовой линии (рис. 17В). Данная тест-система, как и предыдущая, в которой конъюгат БСА-цитиколин был иммобилизован на тестовой линии, показала возможность детекции СРБ.

Практический предел детекции в данной тест-системе для мембраны 90CNPН составил 1 мг/л СРБ в 100% FBS (рис. 3В). Кроме того, из рисунка 17В видно, что по мере увеличения концентрации СРБ интенсивность окрашивания тестовой линии увеличивается.

Также был проведен эксперимент с контрольным типом тест-полосок, где на НЧЗ был иммобилизован БСА, а на тестовую линию - IgG. В концентрации СРБ 61,2 мг/л в сыворотке человека не наблюдали окрашивания тестовой полосы в данном типе тест-полоске, что говорит о том, что связывание СРБ с модифицированными НЧЗ происходит за счет образования комплекса СРБ и цитиколина.

Важно отметить, что при обеспечении пространственной доступности цитиколина образование тройного комплекса IgG-СРБ-цитиколин осуществимо в обоих вариантах иммобилизации цитиколин: и на НЧЗ, и на тестовой линии.

3.7.4. Тест-система на основе конъюгатов НЧЗ-IgG и аптамера, иммобилизованного на НЦМ

Помимо цитиколина и IgG в качестве молекулы распознавания для детекции СРБ можно использовать аптамеры к СРБ. Ранее в ЛХРНК СО РАН были отобраны три аптамера к СРБ на основе литературных данных: М-20 [32], Н0-40 [60], 6-40 [61]. В рассматриваемой тест-системе сэндвич-формата на НЧЗ иммобилизовали IgG, а на тестовую линию – аптамер (рис. 18А).

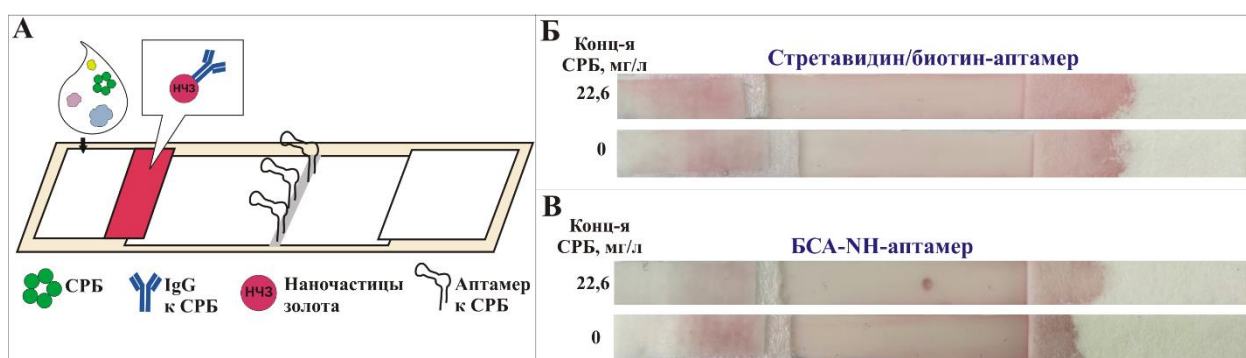


Рисунок 18. Тест-система НЧЗ-IgG, аптамер на тестовой линии. (А) Схематическое изображение устройства тест-полоски на основе пары IgG-аптамер. (Б) Фотографии тест-полосок после анализа, где на тестовую линию был иммобилизован комплекс стрептавидин/биотин-аптамер. (В) Фотографии тест-полосок после анализа, где на тестовую линию был иммобилизован конъюгат БСА-NH-аптамер.

Для иммобилизации аптамера на тестовой линии использовали два подхода. Первый подход заключался в адсорбции на нитроцеллюлозную мембрану комплекса биотинилированного аптамера со стрептавидином, второй подход – в адсорбции конъюгата БСА и NH₂-модифицированного аптамера, полученного с использованием ЕДК. Иммобилизация биотинилированных нуклеиновых кислот с помощью стрептавидина на нитроцеллюлозной мембране – достаточно распространенная практика в ИХА на основе нуклеиновых кислот [62-64]. Однако в данной работе было показано, что иммобилизация аптамера в составе комплекса «стрептавидин/биотин» не обеспечивает детекции СРБ, что, вероятно, связано с жесткой фиксацией и экранированием активного центра аптамера крупным тетрамерным белком (рис. 18Б). Протестировали все три аптамера, и ни один из них не привел к появлению аналитического сигнала на тестовой линии при таком способе иммобилизации. Ковалентная иммобилизация NH₂-модифицированного аптамера на БСА с использованием ЕДК оказалась эффективным подходом (рис. 18В). Несмотря на то, что NH₂-модифицированный аптамер и аптамер с биотином имеют одинаковые линкеры L₁₈,

только в ковалентном конъюгате с БСА аптамер пространственно доступен для связывания комплекса «НЧЗ-IgG-СРБ». При этом только аптамер М-20 из трех тестируемых вариантов продемонстрировал способность связывать СРБ в условиях анализа в 100% сыворотке человека (рис. 18В).

3.7.5. Тест-система на основе конъюгатов НЧЗ-аптамер и IgG, иммобилизованных на НЦМ

Убедившись в работоспособности предыдущего варианта тест-полоски с аптамером М-20, далее исследовали, как пространственная ориентация аптамера (на поверхности НЧЗ либо на тестовой линии) влияет на чувствительность выявления СРБ. В связи с этим в следующей тест-системе аптамер был иммобилизован на НЧЗ различными способами, тогда как IgG был нанесен на тестовую линию (рис. 19А).

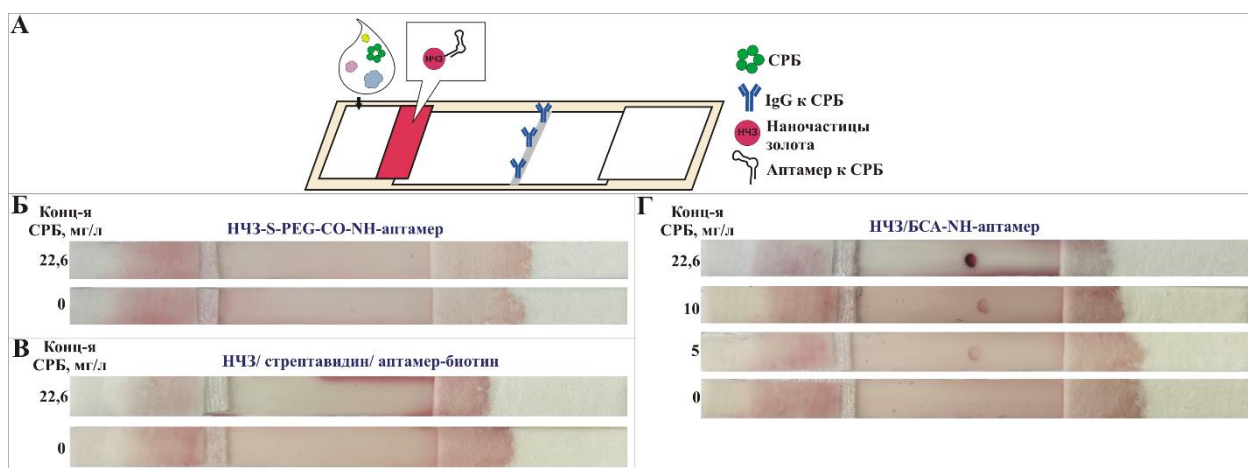


Рисунок 19. Тест-система НЧЗ-аптамер, IgG на тестовой линии. (А) Схематическое изображение устройства тест-полоски на основе пары аптамер-IgG. (Б) Фотографии тест-полосок после анализа, где на подушку для конъюгата нанесен НЧЗ-S-PEG-CO-NH-аптамер. (В) Фотографии тест-полосок после анализа, где на подушку для конъюгата нанесен НЧЗ/стрептавидин/аптамер-биотин. (Г) Фотографии тест-полосок после анализа, где на подушку для конъюгата нанесен НЧЗ/BSA-NH-аптамер.

Для иммобилизации аптамера М-20 на НЧЗ использовали три подхода: ковалентная иммобилизация NH_2 -модифицированного аптамера на НЧЗ-S-PEG-COOH (рис. 19Б); нековалентная адсорбция комплекса стрептавидин/биотинилированный аптамер (рис. 19В); нековалентная адсорбция конъюгата БСА-аптамер на НЧЗ (рис. 19Г). Функциональным оказался вариант нековалентной адсорбции аптамера на НЧЗ в составе конъюгата бычьего сывороточного альбумина с NH_2 -модифицированным аптамером. Практический предел детекции СРБ в такой тест-системе составил 5 мг/л (рис. 19Г). С увеличением количества СРБ в сыворотке человека интенсивность тестовой линии увеличивается.

Показано, что подход ковалентной иммобилизации NH_2 -модифицированного аптамера с использованием ЕДК на НЧЗ-PEG-COOH, также как ковалентная

иммобилизация цитиколина на НЧЗ-PEG-COOH, не является работоспособным. Вероятно, это связано со стерическими затруднениями ковалентно присоединенной к поверхности НЧЗ молекулы цитиколина или аптамера. В тоже время и подход, основанный на иммобилизации комплекса стрептавидина и биотинилированного аптамера на НЧЗ, также не показал положительных результатов. Закономерности для НЧЗ, модифицированных разными молекулами распознавания с использованием одного метода иммобилизации, сохраняются, что говорит о том, что помимо характеристик самих молекул распознавания важным фактором является способ их иммобилизации на гетерофазе, будь то НЧЗ или нитроцеллюлозная мембрана.

Таким образом, были разработаны функциональные системы, где одной молекулой распознавания является IgG, а другой молекулой распознавания является цитиколин или аптамер. Глобальной целью исследования был поиск альтернативы использованию IgG, которые имеют ряд своих ограничений (способность к денатурации, варьирование от партии к партии, высокая стоимость), поэтому на следующем этапе работы были исследованы тест-системы на основе пар молекул распознавания цитиколин-цитиколин, аптамер-цитиколин, аптамер-аптамер.

3.7.6. Тест система на основе конъюгатов НЧЗ-цитиколин и цитиколина, иммобилизованного на НЦМ

Далее предприняли попытку разработать тест-систему сэндвич-формата на основе цитиколина в качестве молекулы распознавания и на НЧЗ, и на тестовой линии (рис. 20А). Цитиколин был иммобилизован на нитроцеллюлозную мембрану в составе конъюгата БСА-цитиколин, как и для системы НЧЗ-IgG и БСА-цитиколин, которая показала свою функциональность.

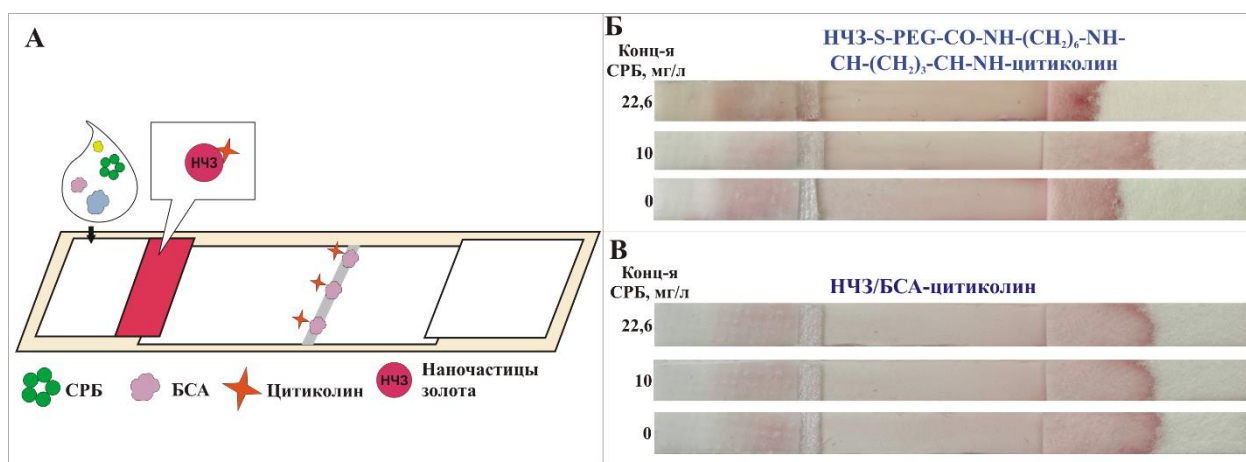


Рисунок 20. Тест-система НЧЗ-цитиколин, цитиколин на тестовой линии. (А) Схематическое изображение устройства тест-полоски на основе пары цитиколин-цитиколин. (Б) Фотографии тест-полосок после анализа, где на подушку для конъюгата нанесен НЧЗ-S-PEG-CO-NH-(CH₂)₆-NH-CH-(CH₂)₃-CH-NH-цитиколин. (В) Фотографии тест-полосок после анализа, где на подушку для конъюгата нанесен НЧЗ/БСА-цитиколин.

Цитиколин был иммобилизован на НЧЗ с помощью двух подходов: ковалентной иммобилизации на НЧЗ-S-ПЭГ-COОН и нековалентной адсорбции конъюгата БСА-цитиколин на НЧЗ. Вариант с ковалентной иммобилизацией цитиколина на НЧЗ-S-PEG-COОН не показал эффективности в связывании СРБ (рис. 20Б), что было ожидаемо, поскольку в тест-системе на основе НЧЗ-S-ПЭГ-COОН и IgG на тестовой линии не наблюдали окрашивания тестовой линии в присутствии СРБ.

Предварительно система, в которой цитиколин иммобилизован в составе конъюгата БСА-цитиколин на НЧЗ и на тестовую линию, представлялась перспективной, поскольку две тест-системы - на основе НЧЗ-IgG и БСА-цитиколин на тестовой линии и на основе НЧЗ-БСА-цитиколин и IgG на тестовой линии - оказались работоспособными. Однако в обсуждаемой системе не наблюдали окрашивание тестовой полосы в присутствии СРБ в 100% сыворотке человека (рис. 20В).

Связывание тройного комплекса СРБ – цитиколин/НЧЗ – цитиколин/тестовая линия в проточном формате не реализуется и в случае конъюгатов НЧЗ-PEG-CO-NH-(CH₂)₆-NH-CH-(CH₂)₃-CH-NH-цитиколин, и в случае конъюгатов НЧЗ/БСА-цитиколин. Вероятно, это связано с неспособностью второй молекулы цитиколина связаться с комплексом СРБ-цитиколин вблизи НЧЗ в силу стерических затруднений.

3.7.7. Тест-система на основе конъюгатов НЧЗ-цитиколин и аптамеров, иммобилизованных на НЦМ

Рассмотрим тест-систему сэндвич-формата, в которой конъюгат БСА-цитиколин адсорбирован на НЧЗ, а конъюгат БСА-аптамер – на тестовую линию (рис. 21А). Конъюгаты БСА-цитиколин и БСА-аптамер показали свою эффективность в тест-системах, где в паре с каждым из них использовали IgG. Однако в обсуждаемой тест-системе не наблюдали

окрашивания тестовой полосы при концентрации СРБ 61,2 мг/л в сыворотке человека (рис. 21Б).

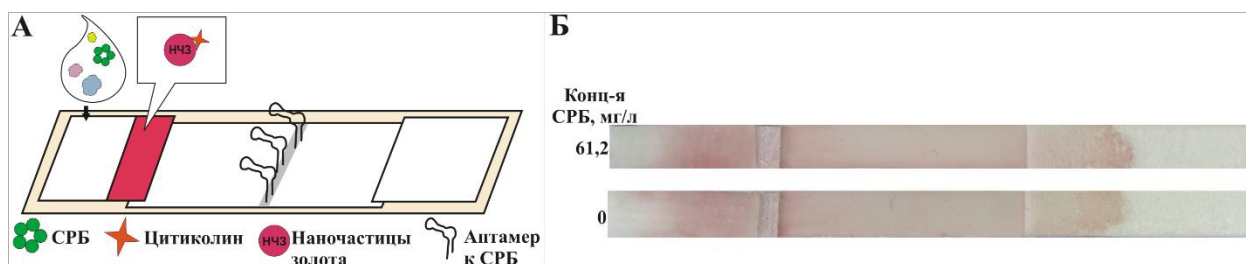


Рисунок 21. Тест-система НЧЗ-цитиколин, аптамер на тестовой линии. (А) Схематическое изображение устройства тест-полоски на основе пары цитиколин-аптамер. (Б) Фотографии тест-полосок после анализа.

В тест-системе «НЧЗ-цитиколин/ IgG–тестовая линия» эффективно детектируется СРБ, тогда как замена IgG на аптамер на тестовой линии приводит к полной потере сигнала. Это свидетельствует о том, что антитела и аптамер распознают разные эпитопы СРБ, и СРБ в комплексе «СРБ-цитиколин» доступен для связывания с IgG, но недоступен для связывания с аптамером.

Таким образом, тест-система, в которой цитиколин иммобилизован на поверхности НЧЗ, а аптамер иммобилизован на тестовой линии, не обеспечивает связывания СРБ.

3.7.8. Тест-система на основе конъюгатов НЧЗ-аптамер и цитиколина, иммобилизованного на НЦМ

На следующем этапе изменили схему расположения элементов распознавания на тест-полоске. В новом варианте сборки предполагалось на первом этапе образование комплекса СРБ с аптамером, иммобилизованным на НЧЗ и затем связывание этого комплекса с цитиколином, иммобилизованным на тестовой линии (рис. 22А). Цитиколин был иммобилизован на тестовую линию в составе конъюгата БСА-цитиколин. Аптамер иммобилизовали на НЧЗ нековалентно одним из двух вариантов: в составе комплекса стрептавидин/биотин-аптамер или в составе конъюгата БСА-НН-аптамер.

Иммобилизация аптамера на НЧЗ в составе комплекса стрептавидин/биотин/аптамер не приводит к образованию комплекса с СРБ на тестовой линии при концентрации СРБ 61,2 мг/л в сыворотке человека, что коррелирует с ранее полученными нами данными (рис. 22Б). Такой способ иммобилизации, вероятно, препятствует формированию вторичной структуры аптамера, необходимой для связывания СРБ или создает стерические затруднения.

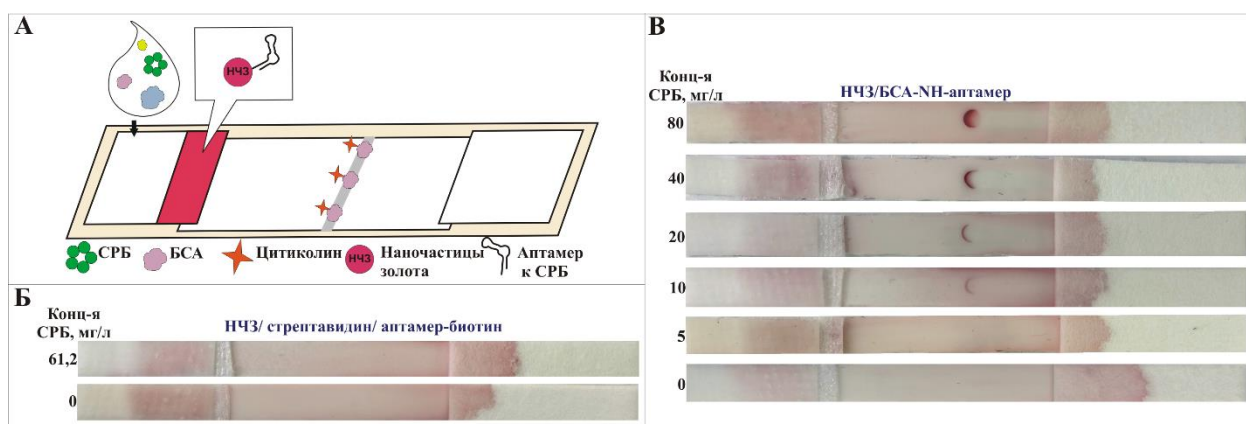


Рисунок 22. Тест-система НЧЗ-аптамер, цитиколин на тестовой линии. (А) Схематическое изображение устройства тест-полоски на основе пары аптамер-цитиколин. (Б) Фотографии тест-полосок после анализа, где на подушку для конъюгата нанесен НЧЗ-S-PEG-CO-NH-(CH₂)₆-NH-CH-(CH₂)₃-CH-NH-цитиколин. (В) Фотографии тест-полосок после анализа, где на подушку для конъюгата нанесен НЧЗ/БСА-цитиколин.

Напротив, при адсорбции аптамера на НЧЗ в составе конъюгата с БСА наблюдали окрашивание тестовой линии в присутствии СРБ. Практический предел детекции составил 10 мг/л в 100% FBS (рис. 22В), что соответствует нижней границе клинического проявления воспалительного процесса средней активности. Наблюдали тенденцию к увеличению интенсивности сигнала на тестовой линии по мере роста концентрации СРБ в сыворотке, что говорит об отсутствии в диапазоне концентраций 10-80 мг/л эффекта крючка. Использование данной тест-системы не подразумевает разбавление сыворотки перед нанесением на подушку для образца, поскольку практический предел детекции укладывается в диапазон концентраций СРБ, характерный для воспаления.

Рассчитали также предел обнаружения (LOD) СРБ в данной тест-системе. Стандартное отклонение интенсивности тестовой линии для отрицательных контролей составило 130,4 (рис. 23А), а угловой коэффициент калибровочного графика – 60,137 (рис. 23Б). Соответственно, предел обнаружения составил 6,5 мг/л СРБ. Определение LOD важно для разработки портативных ридеров и автоматизированной системы анализа результата тестирования, поскольку задает нижнюю границу концентрации, ниже которой прибор не может гарантировать достоверное детектирование сигнала. Однако, несмотря на рассчитанное значение LOD, для практического применения разработанной тест-системы в условиях, не оснащенных портативными оптическими ридерами, приоритетное значение имеет практический предел детекции. Поскольку регистрация результатов анализа осуществляется человеком невооруженным глазом, именно этот параметр имеет реальную диагностическую ценность в условиях без дополнительного оборудования.

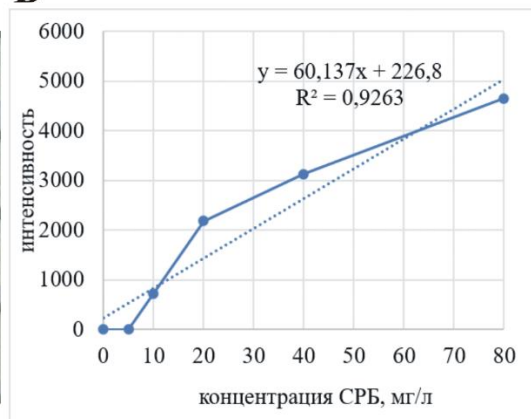
А**Б**

Рисунок 23. Определение предела обнаружения тест-системы на основе конъюгатов НЧЗ-аптамер и цитиколина, иммобилизованного на НЦМ. (А) Фотография тест-полосок отрицательного контроля (концентрация СРБ 0 мг/л). (Б) Калибровочный график зависимости интенсивности тестовой линии от концентрации СРБ.

Ранее в работе [21] была продемонстрирована принципиальная возможность создания подобной тест-системы на основе метода ИФА для обнаружения СРБ с использованием цитиколина и аптамера в качестве распознающих молекул. В указанной работе конъюгат БСА-цитиколин также получали с помощью глутарового альдегида, однако без последующей стадии восстановления, а на НЧЗ иммобилизовали HS-модифицированный аптамер в присутствии ТСЕР. Метод иммобилизации HS-аптамера в присутствии ТСЕР является широко распространенным [65]. В данной работе этот подход рассматривали как альтернативный вариант иммобилизации аптамера на НЧЗ, однако приняли решение о целесообразности метода нековалентной адсорбции аптамера на НЧЗ в составе конъюгата с БСА. Такой подход упрощает процедуру, так как не требует введения тиольной метки в аптамер и использования восстановителя. Кроме того, БСА выступает не только как носитель аптамера, но и как блокирующий агент, что, как показали представленные данные, обеспечивает достаточную конформационную свободу аптамера для эффективного связывания с СРБ.

3.7.9. Тест-система на основе конъюгата НЧЗ-аптамер и аптамера, иммобилизованного на НЦМ

Рассмотрим тест-систему сэндвич-формата на основе пары аптамеров, в которой конъюгат БСА-аптамер адсорбирован на НЧЗ и конъюгат БСА-аптамер адсорбирован на тестовую линию (рис. 24А).

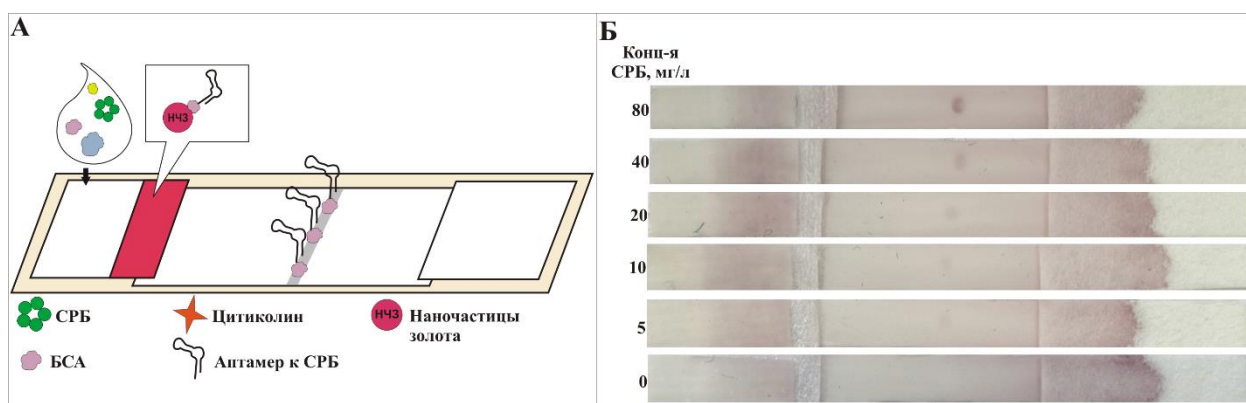


Рисунок 24. Тест-система НЧЗ-аптамер, аптамер на тестовой линии. (А) Схематическое изображение устройства тест-полоски на основе пары аптамер-аптамер. (Б) Фотографии тест-полосок после анализа.

Практический предел детекции СРБ в данной тест-системе, где используется пара аптамеров в качестве молекул распознавания, составил 5 мг/л в 100% FBS (рис. 24Б), что соответствует клиническому значению воспалительного процесса низкой активности. Наблюдала тенденцию к увеличению интенсивности сигнала на тестовой линии с увеличением концентрации СРБ в сыворотке.

Сравнительный анализ дизайна разработанной тест-системы с прототипом тест-системы с практическим пределом детекции СРБ в 10 мг/л, описанным в работе [66], выявляет как сходство в выборе формата анализа, так и существенные различия в подходах к формированию ключевых элементов. Обе системы представляют собой сэндвич-ИХА на основе пары аптамеров, специфичных к СРБ. Принципиальное различие заключается в способе иммобилизации аптамера на нитроцеллюлозной мембране и на НЧЗ. В работе [66] реализована прямая иммобилизация: аминокислотный аптамер наносится непосредственно на мембрану в цитратно-солевом растворе (SSC). Такой подход опирается на способность ДНК нековалентно связываться с нитроцеллюлозой за счёт гидрофобных взаимодействий [67]. В нашем исследовании аптамер был использован иначе — в составе конъюгата с бычьим сывороточным альбумином (БСА), который адсорбировали на поверхность НЧМ. Таким образом, взаимодействие с нитроцеллюлозой осуществляется не через молекулу ДНК, а через белковый компонент конъюгата.

Различаются и подходы к получению конъюгатов НЧЗ с аптамером. В работе [66] конъюгат НЧЗ-аптамер получали инкубацией НЧЗ с аптамером, модифицированным PEG-SS-C6 (5'-аптамер-3'- PEG-SS-C6). В разработанной нами тест-системе конъюгат НЧЗ-аптамер формировали иным способом — путём адсорбции предварительно полученного конъюгата БСА-аптамер на поверхность НЧЗ.

Таким образом, в отличие от работы [66], где для тестовой линии и НЧЗ применялись разные типы модификации аптамеров, в представленном исследовании для обоих элементов

использован один и тот же тип конъюгата — БСА-аптамер. Это упрощает процедуру приготовления реагентов и делает конструкцию тест-системы более унифицированной. Следует отметить, что выбор стратегии иммобилизации аптамера как на поверхности НЧЗ, так и на нитроцеллюлозной мембране во многом определяет аналитические характеристики тест-системы, поскольку влияет на его пространственную ориентацию и доступность для связывания с мишенью. Кроме того, различные подходы к иммобилизации различаются воспроизводимостью, стабильностью полученных компонентов при хранении и трудоемкостью синтеза.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данной работы были разработаны иммунохроматографические тест-системы для детекции СРБ на основе конъюгатов НЧЗ с различными распознающими молекулами: антителами IgG, цитиколином и аптамерами.

Для иммобилизации цитиколина на поверхности НЧЗ были исследованы два методических подхода: 1) ковалентное присоединение цитиколина к НЧЗ-S-PEG-NH₂ с использованием глутарового альдегида в качестве сшивающего агента (конъюгат НЧЗ-PEG-цитиколин); 2) нековалентная адсорбция на НЧЗ предварительно полученного конъюгата БСА-цитиколин, синтез которого проводили с использованием глутарового альдегида (НЧЗ/БСА-цитиколин). Положительный результат при связывании с СРБ был получен лишь во втором случае, что, вероятно, обусловлено лучшей стерической доступностью цитиколина в составе конъюгата с белковым носителем (таблица 10).

Для иммобилизации аптамера на НЧЗ были исследованы три подхода: 1) ковалентное присоединение NH₂-модифицированного аптамера к НЧЗ-S-PEG-COOH с использованием ЕДК (НЧЗ-PEG-аптамер); 2) нековалентная адсорбция на НЧЗ конъюгата БСА-аптамер, полученного присоединением NH₂-модифицированного аптамера к БСА с помощью ЕДК (НЧЗ/БСА-аптамер); 3) нековалентная адсорбция предварительно сформированного комплекса стрептавидин/биотин-аптамер на поверхность НЧЗ (НЧЗ/стрептавидин/биотин-аптамер).

Как и в случае с цитиколином, функциональным оказался только вариант с иммобилизацией аптамера в составе конъюгата с БСА (таблица 10). Полученные данные указывают на то, что БСА способствует корректной пространственной ориентации распознающей молекулы и повышает её доступность для взаимодействия с мишенью.

Таблица 10. Анализ эффективности тест-систем в зависимости от способа иммобилизации молекул распознавания на НЧЗ и на тестовой линии нитроцеллюлозной мембраны.

		На НЧЗ					
		НЧЗ/IgG	НЧЗ-PEG-цитиколин	НЧЗ/БСА-цитиколин	НЧЗ-PEG-аптамер	НЧЗ/БСА-аптамер	НЧЗ/стрептавидин/биотин-аптамер
На тестовой линии	IgG						
	БСА-цитиколин				-		
	Стрептавидин/биотин-аптамер		-	-	-	-	-
	БСА-аптамер		-		-		-

Все разработанные тест-системы продемонстрировали предел обнаружения, соответствующий клинически значимому диапазону концентраций СРБ или ниже него. Это делает предложенные системы пригодными для практического применения без необходимости дополнительного усиления аналитического сигнала.

В заключение следует отметить, что в ходе работы были успешно реализованы две

тест-системы на основе цитиколина и/или аптамера. Первая включала конъюгат НЧЗ/БСА-аптамер в сочетании с конъюгатом БСА-цитиколином, нанесённым на тестовую линию НЦМ. Вторая конфигурация была полностью сконструирована на основе аптамеров: НЧЗ/БСА-аптамер и конъюгатов БСА-аптамер на тестовой линии НЦМ. Принципиально важным результатом является возможность отказа от использования антител в качестве распознающих элементов. Вместо иммуноглобулинов применяются молекулы аптамеров и цитиколина, которые могут быть получены методами химического синтеза. Это открывает перспективу создания более стандартизованных и потенциально менее затратных тест-систем, не зависящих от использования биологического сырья животного происхождения.

5. ВЫВОДЫ

1. Исследованы подходы к детекции С-реактивного белка (СРБ) в проточных (иммунохроматографических) тест-системах с использованием молекул распознавания разной природы: цитиколин (низкомолекулярное соединение), аптамер (олигонуклеотид), IgG (белок). Показано, что:

а) блокирование конъюгатов НЧЗ с молекулами распознавания раствором, содержащим 5% сахарозы, 1% бычьего сывороточного альбумина, 1% PEG-20000, 0,5 % Tween 20, позволяет уменьшить неспецифические взаимодействия СРБ с компонентами сыворотки и реагентами тест-полоски;

б) адсорбция цитиколина или аптамера в составе конъюгата с бычьим сывороточным альбумином на НЧЗ и/или на тестовую линию нитроцеллюлозной мембраны позволяет реализовать взаимодействие молекулы распознавания (цитиколина или аптамера) с СРБ, в то время как при ковалентной иммобилизации цитиколина или NH_2 -модифицированного аптамера на НЧЗ образование комплекса с СРБ не происходит;

в) образование тройного комплекса между СРБ, цитиколином, иммобилизованным на НЧЗ, и цитиколином/аптамером на тестовой линии нитроцеллюлозной мембраны (НЦМ) в проточном формате не реализуется;

2. Разработаны иммунохроматографические тест-системы для детекции СРБ на основе аптамера в качестве распознающей молекулы (как на НЧЗ, так и на НЦМ), а также тест-система типа «аптамер на НЧЗ и цитиколин на тестовой линии НЦМ», что позволяет отказаться от использования IgG и использовать молекулы распознавания, которые можно получить методом химического синтеза.

3. Установлены количественные характеристики разработанных тест-систем:

а) практический предел детекции СРБ в данной тест-системе «НЧЗ-аптамер и цитиколин на тестовой линии составил 10 мг/л, что соответствует клиническому значению воспалительного процесса средней активности;

б) практический предел детекции СРБ в данной тест-системе, где используется пара аптамеров в качестве молекул распознавания, составил 5 мг/л, что соответствует клиническому значению воспалительного процесса низкой активности.

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pepys, M. B., & Hirschfield, G. M. C-reactive protein: a critical update // *The Journal of clinical investigation* – 2003. - Vol. 111. – N. 12. – P. 1805-1812
2. Black, S., Kushner, I., & Samols, D. C-reactive protein // *Journal of biological chemistry* – 2004. Vol. 279. – N. 47. – P. 48487-48490
3. Kushner, I., & Agrawal, A. CRP can play both pro-inflammatory and anti-inflammatory roles // *Molecular Immunology* – 2006. Vol. 44. – N. 4. – P. 670-671
4. Tang, M. Q., Xie, J., Rao, L. M., Kan, Y. J., Luo, P., & Qing, L. S. Advances in aptamer-based sensing assays for C-reactive protein // *Analytical & Bioanalytical Chemistry* – 2022. Vol. 414. – N. 2. – P. 867
5. M. Kjelgaard-Hansen, A.T. Kristensen, A.L. Jensen, Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of C-reactive protein in canine serum // *J. Vet. Med. Ser. A* – 2003. Vol. 50. – N. 3. – P. 164–168
6. W.-J. Kim, S.H. Hyun, H.Y. Cho, S. Byun, B.K. Kim, C. Huh, K.H. Chung, Y.J. Kim, Sensitive “capillary ELISA” via vapor-phase surface modification // *Sensor. Actuator. B Chem* – 2016. Vol. 233. – P. 281–288
7. F.M. Campbell, A. Ingram, P. Monaghan, J. Cooper, N. Sattar, P.D. Eckersall, D. Graham, SERRS immunoassay for quantitative human CRP analysis // *Analyst* – 2008. Vol. 133. – N. 10. – P. 1355–1357
8. H.Y. Tsai, C.F. Hsu, I.W. Chiu, C.B. Fuh, Detection of C-reactive protein based on immunoassay using antibody-conjugated magnetic nanoparticles // *Anal. Chem* – 2007. Vol. 79. – N. 21. – P. 8416–8419
9. J. Oh, H.-A. Joung, H.S. Han, J.K. Kim, M.-G. Kim, A hook effect-free immunochromatographic assay (HEF-ICA) for measuring the C-reactive protein concentration in one drop of human serum // *Theranostics* – 2018. – P. 3189–3197
10. Y. Lv, R. Wu, K. Feng, J. Li, Q. Mao, H. Yuan, H. Shen, X. Chai, L.S. Li, Highly sensitive and accurate detection of C-reactive protein by CdSe/ZnS quantum dot-based fluorescence-linked immunosorbent assay // *J. Nanobiotechnol.* – 2017. Vol. 15. – N. 1. – P. 35
11. Y. Lv, F. Wang, N. Li, R. Wu, J. Li, H. Shen, L.S. Li, F. Guo, Development of dual quantum dots-based fluorescence-linked immunosorbent assay for simultaneous detection on inflammation biomarkers // *Sensor. Actuator. B Chem.* – 2019. Vol. 301. – P. 127118
12. C. Zong, D. Zhang, F. Jiang, H. Yang, S. Liu, P. Li, Metal-enhanced chemiluminescence detection of C-reaction protein based on silver nanoparticle hybrid probes // *Talanta* – 2019. Vol. 199. – P. 164–169
13. T.-Z. Liu, R. Hu, X. Zhang, K.-L. Zhang, Y. Liu, X.-B. Zhang, R.-Y. Bai, D. Li, Y.-H. Yang, Metal-organic framework nanomaterials as novel signal probes for electron transfer mediated ultrasensitive electrochemical immunoassay // *Anal. Chem.* – 2016. Vol. 88. – N. 24. – P. 12516–12523
14. M. Thangamuthu, C. Santschi, O.J.F. Martin, Label-free electrochemical immunoassay for C-reactive protein // *Biosensors* – 2018. Vol. 8. – N. 2. – P. 34
15. M.-Z. Tsai, C.-T. Hsiung, Y. Chen, C.-S. Huang, H.-Y. Hsu, P.-Y. Hsieh, Real-time CRP detection from whole blood using micropost-embedded microfluidic chip incorporated with label-free biosensor // *Analyst* – 2018. Vol. 143. – N. 2. – P. 503–510
16. Kinyua, D. M., Memeu, D. M., Mugo Mwenda, C. N., Ventura, B. D., & Velotta, R. Advancements and applications of lateral flow assays (LFAs): A comprehensive review // *Sensors* – 2025. Vol. 25. – N. 17. – P. 5414

17. Majdinasab, M., Badea, M., & Marty, J. L. Aptamer-based lateral flow assays: current trends in clinical diagnostic rapid tests // *Pharmaceuticals* – 2022. Vol. 15. – N. 1. – P. 90
18. Tanaka, T., Robey, F.A., 1983. A new sensitive assay for calcium-dependent binding of C-reactive protein to phosphorylcholine // *J. Immunol. Methods* – 1983. Vol. 65. – P. 333
19. Eckersall, P.D., Conner, J.G., Parton, H. Conjugation of cytidine-5'-diphosphocholine to bovine serum albumin in the development of an enzyme-linked immunosorbent assay for canine C-reactive protein // *Biochem. Soc. Trans.* – 1989. Vol. 17. – P. 114
20. Eckersall, P.D., Conner, J.G., Parton, H. An enzyme-linked immunosorbent assay for canine C-reactive protein // *Vet. Rec.* – 1989. Vol. 124. – P. 490
21. Xie, J., Tang, M. Q., Chen, J., Zhu, Y. H., Lei, C. B., He, H. W., & Xu, X. H. A sandwich ELISA-like detection of C-reactive protein in blood by citicoline-bovine serum albumin conjugate and aptamer-functionalized gold nanoparticles nanozyme // *Talanta* – 2020. Vol. 217. – P. 121070
22. Heegaard, P. M., Pedersen, H. G., Jensen, A. L., & Boas, U. A robust quantitative solid phase immunoassay for the acute phase protein C-reactive protein (CRP) based on cytidine 5'-diphosphocholine coupled dendrimers // *Journal of immunological methods* – 2009. Vol. 343. – N. 2. – P. 112-118
23. Phung, N. L., Walter, J. G., Jonczyk, R., Seiler, L. K., Scheper, T., & Blume, C. Development of an aptamer-based lateral flow assay for the detection of C-reactive protein using microarray technology as a prescreening platform // *ACS Combinatorial Science* – 2020. Vol. 22. – N.11. – P. 617-629
24. Bengtström M., Jungell-Nortamo A., Syvänen A. C. Biotinylation of oligonucleotides using a water soluble biotin ester // *Nucleosides & nucleotides* – 1990. Vol. 9. – N. 1. – P. 123-127
25. Frens, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Nature physical science* – 1973. Vol. 241. – N. 105. – P. 20-22
26. Tsai T. T. et al. Diagnosis of tuberculosis using colorimetric gold nanoparticles on a paper-based analytical device // *ACS sensors*. – 2017. Vol. 2. – N. 9. – P. 1345-1354
27. Haiss, W., Thanh, N. T., Aveyard, J., & Fernig, D. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV– Vis spectra // *Analytical chemistry* – 2007. Vol. 79. – N. 11. – P. 4215-4221
28. Thompson, D., Pepys, M.B., Wood, S.P. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine // *Science* – 1999. Vol. 284. – N. 5415. – P. 1295-1297
29. Taylor, K. E., & Van Den Berg, C. W. (2007). Structural and functional comparison of native pentameric, denatured monomeric and biotinylated C-reactive protein // *Immunology* – 2007. Vol. 120. – N. 3. – P. 404-411
30. Potempa, L. A., Maldonado, B. A., Laurent, P., Zemel, E. S., & Gewurz, H. Antigenic, electrophoretic and binding alterations of human C-reactive protein modified selectively in the absence of calcium // *Molecular immunology* – 1983. Vol. 20. – N. 11. – P. 1165-1175
31. Kresl, J. J., Potempa, L. A., & Anderson, B. E. Conversion of native oligomeric to a modified monomeric form of human C-reactive protein // *The international journal of biochemistry & cell biology* – 1998. Vol. 30. – N. 12. – P. 1415-1426
32. Tsao S.-M. Generation of Aptamers from A Primer-Free Randomized ssDNA Library Using Magnetic-Assisted Rapid Aptamer Selection // *Scientific Reports* – 2017. Vol.7. – P. 45478

33. Lee, S. K., Kim, H. C., Cho, S. J., Jeong, S. W., & Jeon, W. B. Binding behavior of CRP and anti-CRP antibody analyzed with SPR and AFM measurement // *Ultramicroscopy* – 2008. Vol. 108. – N. 10. – P. 1374-1378
34. Volanakis, J. E., & Narkates, A. J. Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayers and complement // *The Journal of Immunology* – 1981. Vol. 126. – N. 5. – P. 1820-1825
35. Ruiz, G., Tripathi, K., Okyem, S., & Driskell, J. D. pH impacts the orientation of antibody adsorbed onto gold nanoparticles // *Bioconjugate chemistry* – 2019. Vol. 30. – N. 4. – P. 1182-1191
36. Pollitt, M. J., Buckton, G., Piper, R., & Brocchini, S. (2015). Measuring antibody coatings on gold nanoparticles by optical spectroscopy // *RSC advances* – 2015. Vol. 5. – N. 31. – P. 24521-24527.
37. Di Nardo, F., Cavallera, S., Baggiani, C., Giovannoli, C., & Anfossi, L. Direct vs mediated coupling of antibodies to gold nanoparticles: the case of salivary cortisol detection by lateral flow immunoassay // *ACS applied materials & interfaces* – 2019. Vol. 11. – N. 36. P. 32758-32768
38. Oliveira, J. P., Prado, A. R., Keijok, W. J., Antunes, P. W. P., Yapuchura, E. R., & Guimarães, M. C. C. Impact of conjugation strategies for targeting of antibodies in gold nanoparticles for ultrasensitive detection of 17 β -estradiol // *Scientific reports* – 2019. Vol. 9. – N. 1. – P. 13859
39. Geng, S. B., Wu, J., Alam, M. E., Schultz, J. S., Dickinson, C. D., Seminer, C. R., & Tessier, P. M. Facile preparation of stable antibody–gold conjugates and application to affinity-capture self-interaction nanoparticle spectroscopy // *Bioconjugate chemistry* – 2016. Vol. 27. – N. 10. – P. 2287-2300
40. Zhang, L., Hu, D., Salmain, M., Liedberg, B., & Boujday, S. Direct quantification of surface coverage of antibody in IgG-Gold nanoparticles conjugates // *Talanta* – 2019. Vol. 204. – P. 875-881
41. Garcia-Fernandez, L., Garcia-Pardo, J., Tort, O., Prior, I., Brust, M., Casals, E., ... & Puentes, V. F. Conserved effects and altered trafficking of Cetuximab antibodies conjugated to gold nanoparticles with precise control of their number and orientation // *Nanoscale* – 2017. Vol. 9. – N. 18. – P. 6111-6121
42. Jazayeri, M. H., Amani, H., Pourfatollah, A. A., Pazoki-Toroudi, H., & Sedighimoghaddam, B. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies // *Sensing and bio-sensing research* – 2016. Vol. 9. – P. 17-22
43. Hormozi-Nezhad, M. R., Karami, P., & Robatjazi, H. (2013). A simple shape-controlled synthesis of gold nanoparticles using nonionic surfactants // *RSC advances* – 2013. Vol. 3. – N. 21. – P. 7726-7732
44. Mansfield M. The use of nitrocellulose membranes in lateral flow assays // New York:Humana Press. – 2005. – P. 71-85
45. Bujacz, A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin // *Biological Crystallography* – 2012. Vol. 68. – N. 10. – P. 1278-1289
46. Практическая химия белка: Пер. с англ./Пол ред. А. Дабре. – М.: Мир, 1989. – 623 с.
47. Lundblad, R. L. Chemical reagents for protein modification // *CRC press* – 2004
48. Gill, S. C., & Von Hippel, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data // *Analytical biochemistry* – 1989. Vol. 182. – N. 2. – P. 319-326
49. Горбунова, Е. А., Епанчинцева, А. В., & Пышная, И. А. (2025). Подход к получению флуоресцирующих наночастиц золота // *Вестник Башкирского университета* – 2025. Vol. 30. – N. 3. – P. 153-160

50. Hao Y., Yang X., Shi Y., Song S., Xing J., Marowitch J., Chen J., Chen J. Magnetic gold nanoparticles as a vehicle for fluorescein isothiocyanate and DNA delivery into plant cells // *Botany* – 2013. Vol. 91. – N. 7. – P. 457–466
51. Alba-Patiño A., Russel S. M., Borges M., Pazos-Perez N., Alvarez-Puebla R. A., de la Rica R. Nanoparticle-based mobile biosensors for the rapid detection of sepsis biomarkers in whole blood // *Nanoscale Advances* – 2020. Vol. 2. – N. 3. - P. 1253–1260
52. Grabarek, Z., & Gergely, J. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters // *Analytical biochemistry* – 1990. Vol. 185. – N. 1. – P. 131-135
53. Gilles, M. A., Hudson, A. Q., & Borders Jr, C. L. Stability of water-soluble carbodiimides in aqueous solution // *Analytical biochemistry* – 1990. Vol. 184. – N. 2. – P. 244-248
54. Nakajima, N., & Ikada, Y. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media // *Bioconjugate chemistry* - 1995. Vol. 6. – N. 1. P. – 123-130
55. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. - М.: Химия, 1989. - 448 с.
56. Huang, L., Tian, S., Zhao, W., Liu, K., Ma, X., & Guo, J. Aptamer-based lateral flow assay on-site biosensors // *Biosensors and Bioelectronics* – 2021. Vol. 186. – P. 113279
57. Israelachvili, J. N. Intermolecular and surface forces // Academic press – 2011
58. Sundberg, E. J. Structural basis of antibody–antigen interactions // In *Epitope Mapping Protocols: Second Edition* Totowa, NJ: Humana Press – 2009. P. 23-36.
59. Mullenix, M. C., & Mortensen, R. F. Calcium ion binding regions in C-reactive protein: location and regulation of conformational changes // *Molecular immunology* – 1994. Vol. 31. – N.8. – P. 615-622
60. Yang, X., Wang, Y., Wang, K., Wang, Q., Wang, P., Lin, M., Chen, N., Tan, Y. DNA aptamer-based surface plasmon resonance sensing of human C-reactive protein // *RSC Adv.* – 2014. Vol. 4. – P. 30934–30937
61. Wu, B., Jiang, R., Wang, Q., Huang, J., Yang, X., Wang, K., Li, W., Chen, N., Li, Q. Detection of C-reactive protein using nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance using an aptamer-antibody sandwich assay // *Chem. Commun.* – 2016. Vol. 52. – P. 3568–3571
62. Huang, Y., Wen, W., Du, D., Zhang, X., Wang, S., & Lin, Y. (2014). A universal lateral flow biosensor for proteins and DNAs based on the conformational change of hairpin oligonucleotide and its use for logic gate operations // *Biosensors and Bioelectronics* – 2014. Vol. 61. – P. 598-604
63. Jauset-Rubio, M., Svobodová, M., Mairal, T., McNeil, C., Keegan, N., Saeed, A., ... & Alyoubi, A. O. Ultrasensitive, rapid and inexpensive detection of DNA using paper based lateral flow assay // *Scientific reports* – 2016. Vol. 6. – N. 1. – P. 37732
64. He, Y., Zeng, K., Gurung, A. S., Baloda, M., Xu, H., Zhang, X., & Liu, G. Visual detection of single-nucleotide polymorphism with hairpin oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles // *Analytical chemistry* – 2010. Vol. 82. – N. 17. – P. 7169-7177
65. Lee, B.H., Kim, S.H., Ko, Y., Park, J.C., Ji, S., Gu, M.B. The sensitive detection of ODAM by using sandwich-type biosensors with a cognate pair of aptamers for the early diagnosis of periodontal disease // *Biosens. Bioelectron.* – 2019. Vol. 126. – P. 122–128
66. Phung, N. L., Walter, J. G., Jonczyk, R., Seiler, L. K., Scheper, T., & Blume, C. Development of an aptamer-based lateral flow assay for the detection of C-reactive protein using microarray technology as a prescreening platform // *ACS Combinatorial Science* – 2020. Vol. 22. – N. 11. – P. 617-629
67. Brown, T. Dot and slot blotting of DNA // *Current Protocols in Molecular Biology* – 1993. Vol. 21. – P. 2.9.15–2.9.20



Отчет о проверке

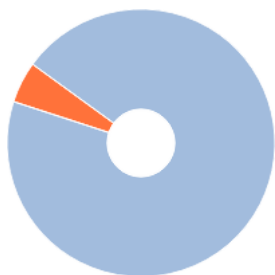
Автор: Мирошниченко Светлана Константиновна

Проверяющий: Мирошниченко Светлана Константиновна

Название документа: научный доклад_Баева Е.А._wr

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ

Тариф: FULL



Совпадения:
5,34%



Оригинальность:
94,66%



ИИ-контент:
0%



Цитирования:
0%



Самоцитирования:
0%



«Совпадения», «Цитирования», «Самоцитирования», «Оригинальность» являются отдельными показателями, отображаются в процентах и в сумме дают 100%, что соответствует проверенному тексту документа.



Проверено: 97,79% текста документа, исключено из проверки: 2,21% текста документа. Разделы и элементы, отключенные пользователем: Библиография, Таблицы

- Совпадения** — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.
- Самоцитирования** — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» — это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.
- Цитирования** — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы; библиография; фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.
- Текстовое пересечение** — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
- Источник** — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
- Оригинальный текст** — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые совпадения проверяемого документа с проиндексированными в системе источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности совпадений или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

Номер документа: 6

Тип документа: Не указано

Дата проверки: 07.09.2026 12:28:40

Дата корректировки: 07.09.2026 13:06:59

Количество страниц: 50

Символов в тексте: 92090

Слов в тексте: 11894

Число предложений: 880

Комментарий: не указано

ПАРАМЕТРЫ ПРОВЕРКИ

Выполнена проверка с учетом редактирования: Да

Выполнено распознавание текста (OCR): Нет

Выполнена проверка с учетом структуры: Да

Разделы и элементы, отключенные пользователем: Библиография, Таблицы

Модули поиска: Перефразирования по Коллекции открытых публикаций международных издательств, ИПС Адилет, Коллекция НБУ, Сводная коллекция научных работ Беларуси, Переводные заимствования, Профессиональная лексика. АПК и биотех, Профессиональная лексика. Юриспруденция, Профессиональная лексика. Медицина, Цитирование, Перефразирования по базе публикаций открытого доступа PubMed, Шаблонные фразы, СМИ России и СНГ, IEEE, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Рувики, PubMed, Перефразирования по коллекции IEEE, Патенты СССР, РФ, СНГ, СПС ГАРАНТ: аналитика, Публикации РГБ, Коллекция INVENTORUS, Переводные заимствования IEEE, Медицина, Сводная коллекция ЭБС, Кольцо вузов, Публикации РГБ (переводы и перефразирования), Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Переводные заимствования по Коллекции открытых публикаций международных издательств, Коллекция открытых публикаций международных издательств, Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования), Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Переводные заимствования по базе публикаций открытого доступа PubMed, Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика, Кольцо вузов (переводы и перефразирования), Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Публикации eLIBRARY, Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, Интернет Плюс Онлайн

ИСТОЧНИКИ

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Комментарий
[01]	3,78%	0%	Шуйская_Юлия_диплом	25 Мая 2026	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[02]	2,77%	0,58%	Сафронова, Валентина Андреевн... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2016	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	
[03]	2,74%	0%	https://www.chem.msu.ru/rus/thes... https://chem.msu.ru	16 Дек 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[04]	2,74%	0%	http://www.chemnet.ru/rus/theses... http://chemnet.ru	29 Янв 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[05]	2,74%	1,9%	http://www.chem.msu.ru/rus/these... http://chem.msu.ru	19 Янв 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[06]	2,73%	0%	Экспресс-методы иммуноанализа... https://docplayer.ru	19 Янв 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[07]	2,73%	0%	Экспресс-методы иммуноанализа... https://docplayer.ru	18 Янв 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[08]	2,32%	0%	https://www.chem.msu.ru/rus/thes... https://chem.msu.ru	23 Фев 2025	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[09]	2,32%	0%	http://www.chem.msu.ru/rus/these... http://chem.msu.ru	19 Янв 2025	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[10]	2,32%	0%	http://www.chemnet.ru/rus/theses... http://chemnet.ru	29 Янв 2025	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[11]	2,32%	0%	https://esu.citis.ru/dissertation/TW... https://esu.citis.ru	20 Мар 2018	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[12]	2,16%	0,37%	Сафронова, Валентина Андреевн... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2016	Публикации РГБ	
[13]	1,91%	0%	Дипломная работа Горбуновой Е...	26 Мая 2022	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[14]	1,88%	1,33%	Дипломная работа Горбуновой Е...	26 Мая 2022	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[15]	1,46%	0%	%D0%BD%D0%B0%D1%83%D1%8... http://niboch.nsc.ru	28 Фев 2025	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.

[16]	1,34%	0,59%	Епанчинцева, Анна Валерьевна ... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2020	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	
[17]	1,22%	0%	не указано	11 Мар 2026	Шаблонные фразы	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[18]	1,18%	0%	Семкина, Алевтина Сергеевна Ве... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2016	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[19]	1,16%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	16 Янв 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[20]	1,16%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	04 Фев 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[21]	1,14%	0%	Шуйская_Юлия_диплом	25 Мая 2026	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[22]	1,11%	0%	Наночастицы металлов как новы... http://elibrary.ru	01 Янв 2015	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[23]	1,05%	0%	Влияние размера наночастиц зо... http://elibrary.ru	01 Янв 2025	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[24]	1,04%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	11 Июл 2020	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[25]	1,01%	0%	Епанчинцева, Анна Валерьевна ... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2020	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[26]	1,01%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	21 Фев 2025	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[27]	0,89%	0%	Наночастицы металлов как новы... http://elibrary.ru	01 Янв 2015	Публикации eLIBRARY	
[28]	0,67%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	21 Фев 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[29]	0,64%	0%	Радаев, Дмитрий Денисович Син... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2025	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[30]	0,64%	0%	Балдина, Анна Андреевна Физик... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2023	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Библиография определена неверно.
[31]	0,61%	0%	https://iopc.ru/wp-content/uploads... https://iopc.ru	24 Июн 2026	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Библиография определена неверно.
[32]	0,57%	0%	Малова Е. А._ИХБФМ_История соз...	11 Янв 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[33]	0,55%	0,55%	ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ ФЛУОРЕ... http://elibrary.ru	01 Янв 2025	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[34]	0,48%	0%	http://elibrary.udsu.ru/xmlui/bitstr... http://elibrary.udsu.ru	08 Дек 2025	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Библиография определена неверно.
[35]	0,48%	0%	Попова, Виктория Константинов... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2025	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[36]	0,45%	0%	ASSOCIATION OF SNP <i>CYP2... https://platform.inventorus.ru	13 Июл 2022	Коллекция INVENTORUS	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[37]	0,41%	0%	1диплом Шуйская ЮД-12.06.24-н...	12 Июн 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[38]	0,38%	0%	ДИПЛОМ_Булгакова_А.Е.	24 Мая 2021	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[39]	0,35%	0%	Киришанов, Кирилл Андреевич Хи... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2025	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[40]	0,32%	0%	Кононов, Александр Игоревич Эл... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2024	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[41]	0,32%	0%	https://www.dissercat.com/content... https://dissercat.com	17 Ноя 2025	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[42]	0,32%	0%	Perspektivnye materialy s ierarkhic... https://platform.inventorus.ru	01 Ноя 2018	Коллекция INVENTORUS	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[43]	0,32%	0%	Заведующая кафедрой химии МГ... http://murmansk.bezformata.com	11 Авг 2019	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Библиография определена неверно.
[44]	0,31%	0%	CARDIAC RADIOLOGY https://platform.inventorus.ru	22 Апр 2020	Коллекция INVENTORUS	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[45]	0,31%	0%	ВКР МАГ Ахмедов final 21_06_2024	21 Июн 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[46]	0,3%	0%	Метастатический гормончувстви... http://elibrary.ru	01 Янв 2025	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[47]	0,29%	0%	Любина, Анна Павловна Биохим... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2026	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[48]	0,29%	0%	Три бердских предприятия назва... http://berdsk.bezformata.ru	07 Апр 2014	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[49]	0,29%	0%	БЭМЗ, Нотис и Продсиб из Бердс... http://berdsk.bezformata.ru	07 Апр 2014	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[50]	0,29%	0%	Искитимцемент стал надежным р... http://vesiskitim.ru	05 Апр 2014	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[51]	0,29%	0%	Список кавалеров ордена Алекса... https://ru.ruwiki.ru	18 Фев 2026	Рувики	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[52]	0,29%	0%	Рекомбинантная плазмидная ДН... https://fips.ru	25 Мар 2026	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	0,29%	0%	«База молекулярно-генетических... https://fips.ru	27 Апр 2026	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[54]	0,29%	0%	RU 2014620509 https://fips.ru	13 Мая 2026	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[55]	0,29%	0%	«База молекулярно-генетических... https://fips.ru	27 Апр 2026	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[56]	0,29%	0%	Time course of fluorescent-labelled... https://platform.inventorus.ru	03 Июн 2024	Коллекция INVENTORUS	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[57]	0,29%	0%	Трансформация государственной... https://directmedia.ru	01 Янв 2026	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[58]	0,29%	0%	Формирование подходов к оценк... https://book.ru	01 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	0,29%	0%	Time course of fluorescent-labelled... https://openalex.org	03 Июн 2024	Коллекция открытых публикаций международных издательств	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	0,29%	0%	Распоряжение Губернатора Ново... http://ivo.garant.ru	14 Фев 2024	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	0,29%	0%	Постановление Правительства Н... http://ivo.garant.ru	27 Июл 2015	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[62]	0,29%	0%	Распоряжение Губернатора Ново... http://ivo.garant.ru	18 Фев 2024	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[63]	0,28%	0%	Яковлева, Елена Алексеевна Лате... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2013	Публикации РГБ	
[64]	0,28%	0%	Яковлева, Елена Алексеевна Лате... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2013	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	
[65]	0,28%	0%	Назаров, Кирилл Вячеславович ... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2025	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Библиография определена неверно.
[66]	0,27%	0%	ПОЛУЧЕНИЕ ТРИАЗИНИЛАМИДО... http://elibrary.ru	01 Янв 2025	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[67]	0,27%	0%	https://www.chem.msu.ru/rus/thes... https://chem.msu.ru	23 Фев 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[68]	0,27%	0%	Диссертация 17.06.25	17 Июн 2025	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Библиография определена неверно.
[69]	0,27%	0%	Судебная экспертиза контролиру... http://ivo.garant.ru	16 Мар 2024	Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика	
[70]	0,26%	0%	Назаров, Кирилл Вячеславович ... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2025	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Библиография определена неверно.
[71]	0,26%	0%	212117	25 Июн 2026	Сводная коллекция научных работ Беларуси	Источник исключен. Причина: Библиография определена неверно.
[72]	0,26%	0%	222151	25 Июн 2026	Сводная коллекция научных работ Беларуси	Источник исключен. Причина: Библиография определена неверно.
[73]	0,25%	0%	The effect of dimeric bisbenzimidaz... https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov	01 Дек 2025	PubMed	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[74]	0,25%	0%	Differentiation of subgenomes in S... https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov	01 Июл 2026	PubMed	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[75]	0,24%	0%	Всероссийская научно-практичес... http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[76]	0,24%	0%	Артериальная гипертония у лиц ... http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[77]	0,24%	0%	РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТ... http://elibrary.ru	01 Янв 2017	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[78]	0,23%	0%	не указано https://openalex.org	12 Ноя 2024	Коллекция открытых публикаций международных издательств	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[79]	0,23%	0%	Dynamics of miRNA expression in ... https://openalex.org	05 Апр 2024	Коллекция открытых публикаций международных издательств	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[80]	0,22%	0%	Разработка латерального проточ... http://elibrary.ru	01 Янв 2026	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[81]	0,22%	0%	Гарипова, Рамиля Ильдусовна Д... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2022	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[82]	0,21%	0%	360 Dx: Российские ученые созда... http://ctv.by	06 Фев 2018	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[83]	0,19%	0%	ПучковАА_диссертация_финал	18 Мар 2025	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[84]	0,17%	0%	Т. 2 part#1 http://emil.ru	08 Июл 2017	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[85]	0,17%	0%	не указано https://openalex.org	02 Апр 2023	Коллекция открытых публикаций международных издательств	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[86]	0,15%	0%	Аспирант ВГУ приняла участие в ... http://voronej.bezformata.com	11 Мая 2019	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[87]	0,12%	0%	Обеспечение баланса частнопра... http://ivo.garant.ru	30 Мар 2024	СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[88]	0,11%	0%	Билан, Дмитрий Сергеевич Генет... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2014	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[89]	0,11%	0%	2 Генетически кодируемые флуо... http://libed.ru	12 Мая 2021	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[90]	0,11%	0%	Optimization of Surface Functionali... https://platform.inventorus.ru	14 Мая 2024	Коллекция INVENTORUS	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[91]	0,11%	0%	Aptamer-based biosensors for the ... https://openalex.org	19 Июл 2021	Коллекция открытых публикаций международных издательств	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[92]	0,11%	0%	не указано https://openalex.org	08 Июл 2023	Коллекция открытых публикаций международных издательств	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[93]	0,11%	0%	Бирюков_диплом_асп	16 Мая 2025	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[94]	0,11%	0%	не указано	21 Мар 2026	Цитирование	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[95]	0,11%	0%	Способ получения субъединично... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[96]	0,11%	0%	ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ ФЛУОРЕ... http://elibrary.ru	01 Янв 2025	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[97]	0,11%	0%	СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СУБЪЕДИН... http://elibrary.ru	01 Янв 2015	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[98]	0,06%	0%	Femtosecond-Pulsed Laser Written... https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov	28 Авг 2018	PubMed	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[99]	0,06%	0%	Femtosecond-Pulsed Laser Written... https://platform.inventorus.ru	28 Авг 2018	Коллекция INVENTORUS	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ им. Д. Г. Кнорре СИБИРСКОГО
ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчёт о проверке текста научно-квалификационной работы на
объём заимствования

Баева Екатерина Андреевна

«Мультиплексные тест-системы на основе наночастиц золота и нуклеиновых
кислот для детекции биологически значимых агентов»

Оригинальность работы составляет 94.66%, что соответствует требованиям
порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на
заседании Итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь АК – к.б.н. С.К. Мирошниченко