ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «УНИВЕРСИТЕТ «ДУБНА»
(ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ «ДУБНА»)

На правах рукописи

Новикова Сагила Аладдиновна

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА НА ОСНОВЕ МНОГОСЛОЙНЫХ ХАЛЬКОГЕНИДНЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК, ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ В БЛИЖНЕЙ ИНФРАКРАСНОЙ ОБЛАСТИ

1.4.2. – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Дубна, 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Университет «Дубна»

Научный руководитель: **Грибова Елена Дмитриевна**
кандидат химических наук
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Университет «Дубна» (государственный университет «Дубна»),
доцент кафедры химии, новых технологий и материалов

Официальные оппоненты: **Еремин Сергей Александрович**
доктор химических наук
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (МГУ им. М.В. Ломоносова), профессор, ведущий научный сотрудник кафедры химической энзимологии МГУ им. М.В. Ломоносова

Ермоленко Юлия Валерьевна
кандидат химических наук
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» (РХТУ им. Д.И. Менделеева), доцент кафедры аналитической химии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» (СГУ им. Н.Г. Чернышевского)

Защита диссертации состоится «16» сентября 2025 г. в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 01.4.002.92 при ФГБУН Институте общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова Российской академии наук: 119991, Москва, Ленинский проспект, 31

С диссертацией можно ознакомиться на сайте ФГБУН ИОНХ РАН: http://www.igic.ras.ru/union/diss/01_4_002_92_ads.php

Автореферат разослан «23» июля 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат технических наук М.С. Доронина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Для повышения эффективности обнаружения и определения аналитов в современных методах анализа применяются различные наноматериалы. Среди наноматериалов быстро развивающимися и имеющими широкие сферы применения являются квантовые точки (КТ). Оптические и электронные характеристики КТ определяются их составом, кристаллической структурой, шириной запрещенной зоны, размером, природой поверхностных лигандов и механизмом переноса заряда [1-3]. За счет своих уникальных физико-химических свойств, таких как широкий спектр поглощения, узкий и симметричный пик люминесценции, высокая фотостабильность, а также высокий квантовый выход (КВ), КТ являются одним из наиболее эффективных источников флуоресценции. Для применения КТ в биоанализе, их флуоресценция должна лежать в ближнем ИК (БлИК) диапазоне спектра, где имеется окно прозрачности биологических матриц [3]. КТ на основе халькогенидов кадмия являются наиболее популярной и хорошо изученной группой материалов, которые люминесцируют в области видимого и БлИК диапазона, являются наиболее доступным материалом и находят свое применение в биоанализе в качестве флуоресцирующих маркеров. Разработка данных КТ является одним из перспективных направлений коллоидного синтеза наноматериалов с уникальными оптическими свойствами. Одним из существующих методов синтеза является высокотемпературный синтез в неполярных средах, позволяющий получить качественные КТ с высоким КВ, при котором длинные алкильные группы лигандов направлены от поверхности, в результате чего КТ имеют высокую гидрофобность. Для медико-биологического использования таких КТ требуется дополнительная стадия гидрофилизации, позволяющая получить на поверхности наночастицы необходимые функциональные группы. После гидрофилизации КТ могут использоваться в качестве флуоресцентных меток в биоанализе и медицинской диагностике в составе конъюгатов с биомолекулами. Особенно широко конъюгаты КТ нашли применение в иммунологических методах анализа, в частности иммунохроматографическом анализе (ИХА), хорошо известном как анализ в латеральном потоке.

Теория и практика иммунологических методов анализа подробно описаны в монографии [4] и обзорах [5, 6]. В основе иммунной диагностики лежит взаимодействие патогенных биологических агентов (ПБА), в качестве которых могут выступать антигены или белки — маркеры заболеваний, с антителами к этим ПБА. Иммунохроматографические методы позволяют селективно определять специфические белки всего за несколько минут. Независимо от используемых подходов, во всех вариантах ИХА основным подходом является применение тест-полосок. При всей кажущейся простоте конструкции тест-полосок, ИХА с использованием КТ в качестве меток является инновационным направлением наномедицины, включающим получение моноклональных и поликлональных антител к специфическим ПБА и использование уникальных пористых мембран.

Ведутся постоянные поиски способов повышения чувствительности и надежности ИХА. Перечень антител, используемых для изготовления конъюгатов с метками аналитического процесса и определяемых белков, постоянно расширяется. Поэтому важной задачей является

создание новых аналитических платформ и техники для ИХА, на основе которых может быть реализована диагностика многих ПБА. Последние исследования показывают, что применение КТ в качестве меток в ИХА позволяет снизить предел обнаружения аналита на порядок по сравнению с тест-системами на основе коллоидного золота (КЗ) [7]. Например, предел обнаружения хлорамфеникола ниже в 24 раза [8], а антибиотиков — в 200 раз [9]. Помимо этого, использование биометок на основе КТ позволяет производить мультиплексный анализ и многокомпонентное детектирование различных компонентов в клетках и на тест-полосках с использованием многоцветных меток при одновременном возбуждении, и тем самым получать более полную картину поражения клеток и определять несколько аналитов одновременно.

Исследование в работе проведено на примере определения антигена вируса болезни Ауески (ВБА). Болезнь Ауески или псевдобешенство — это инфекция, поражающая центральную нервную систему практически у всех млекопитающих, кроме человека [10]. Главным образом он связан со свиньями, его естественным хозяином, которые после выздоровления от клинической формы болезни остаются латентно инфицированными. Однако для остальных животных практически во всех случаях болезнь смертельна. Поэтому разработка чувствительных систем для быстрого определения болезни на ранней стадии развития является актуальной задачей ветеринарии и животноводства.

Целью диссертационной работы является разработка иммунохроматографической тест-системы с использованием многослойных халькогенидных квантовых точек, флуоресцирующих в БлИК области спектра, в качестве аналитических меток для определения вируса болезни Ауески.

Достижение поставленной цели включает решение следующих задач:

1. Синтез и разработка способа гидрофилизации гидрофобных многослойных КТ, полученных методом металлорганического коллоидного синтеза (МКС) и исследование влияния покрывающего агента на физико-химические свойства после гидрофилизации; выбор наиболее эффективных CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS КТ, отвечающих необходимым требованиям для применения в ИХА.
2. Конструирование конъюгатов КТ состава CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS с антителами; разработка способа ориентированного связывания антител на поверхности синтезированных КТ и исследование его влияния на результат анализа.
3. Разработка способов определения CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-КТ и их конъюгатов с белками методами капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).
4. Создание иммунохроматографической тест-системы на основе гидрофилизированных халькогенидных КТ для определения gB вируса болезни Ауески; изучение возможности определения белковых аналитов с использованием иммунохроматографических тестов и определение условий проведения ИХА для увеличения чувствительности анализа.

Методы исследования. Для решения поставленных в работе задач применяли комплекс методов исследования: абсорбционная молекулярная спектроскопия в видимой и УФ-области, флуориметрия, метод динамического рассеяния света (ДРС), ВЭЖХ, КЗЭ, горизонтальный

электрофорез в агарозном геле, ИК-спектроскопия с Фурье-преобразованием.

Научная новизна состоит в следующем:

- Разработан способ гидрофилизации гидрофобных КТ со структурой ядро/оболочка/оболочка/оболочка и изучено его влияние на свойства КТ;

- Разработаны способы получения конъюгатов антител к gB ВБА с многослойными КТ состава CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS, флуоресцирующими в БлИК-области спектра;

- Впервые проведено ориентированное связывание антител с CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-КТ, состоящее из 2 стадий: конъюгирования антител с поверхностью КТ за счет физической адсорбции с последующим ковалентным связыванием с поверхностью;

- Разработаны способы определения CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-КТ и их конъюгатов с белками методами КЗЭ и ВЭЖХ;

- Разработан иммунохроматографический способ диагностики болезни Ауески.

Практическая значимость.

Установленные зависимости и подходы, способствующие повышению интенсивности флуоресценции конъюгатов КТ на тест-полосках, могут быть применены для понижения предела обнаружения различных заболеваний в биологических средах.

В результате проведенных исследований были разработаны способы получения стабильных в буферных растворах конъюгатов CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-КТ с антителами. Выявлены и обоснованы основные факторы, определяющие поведение гидрофильных КТ и их конъюгатов в иммунохроматографии, в том числе определена изоэлектрическая точка, оптимальный диапазон pH-стабильности и условия конъюгирования. Разработаны способы определения КТ и их конъюгатов с белками методами КЗЭ и ВЭЖХ и исследования их физико-химических свойств. Показана возможность количественного ИХА с использованием многослойных КТ в качестве меток с применением разработанного портативного флуоресцентного ридера.

Разработан макет сканера и программное обеспечение для обработки получаемых во время сканирования спектров флуоресценции КТ и их конъюгатов с белками.

На основании проведенных исследований разработан ридер и программное обеспечение для считывания сигнала тестовой зоны полоски и вывода результата анализа в полностью автоматическом режиме, используемый для определения флуоресцентных меток на тест-полосках после проведения ИХА.

Основные положения и результаты, выносимые на защиту:

1. Способ синтеза тиол-содержащего сополимера винилпирролидона, малеинового ангидрида и этиленгликольдиметакрилата (ПТВП) и покрытия им КТ состава CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS для получения стабильных, водорастворимых КТ с высоким КВ флуоресценции.
2. Новый подход к получению конъюгатов CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-КТ с оптимальной ориентацией антител на поверхности КТ, заключающийся в конъюгировании антител с

поверхностью КТ за счет физической адсорбции с последующим ковалентным связыванием с поверхностью КТ.

3. Способ определения CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-КТ и их конъюгатов с белками методами КЗЭ и ВЭЖХ.

4. Разработанный иммунохроматографический тест на основе CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-КТ в качестве меток белков для определения gB ВБА, обоснование возможности определения белковых аналитов с использованием иммунохроматографических тестов и определение оптимальных условий для увеличения чувствительности ИХА.

Личный вклад автора.

Автор принимал активное участие в постановке цели и задач исследования, анализе литературных данных по теме диссертации. Все включенные в диссертацию данные получены лично автором или при его непосредственном участии. Автором осуществлено обоснование выборов методов исследования, проведены экспериментальные исследования, анализ и интерпретация полученных результатов. Сформулированы основные выводы и научные положения, выносимые на защиту.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 22 печатных работ, в том числе 8 статей в рецензируемых научных изданиях, соответствующих требованиям Положения о присуждении ученых степеней в ФГБУН Институте общей и неорганической химии им. Н. С. Курнакова РАН. Опубликованы 39 тезисов докладов на российских и международных конференциях, разработано 6 патентов.

Степень достоверности результатов исследований подтверждается анализом литературных источников по теме диссертации, использованием современных физико-химических методов исследования и соответствия между ними, апробацией результатов на конференциях и публикацией основных положений диссертации в профильных изданиях.

Апробация работы. Результаты работы доложены на конференциях: Всероссийская конференция с международным участием «Химический анализ и медицина» (Россия, Москва, 2015), II Международный конгресс и выставка «Физиотерапия. Лечебная физкультура. Реабилитация. Спортивная медицина», Симпозиум: «Физико-химический анализ в клинической и спортивной медицине» (Россия, Москва, 2016), X Всероссийская конференция по анализу объектов окружающей среды «ЭКОАНАЛИТИКА-2016» (Россия, Углич, 2016), The 16th International Meeting on Chemical Sensors (Ю. Корея, Чеджу, 2016), Третий съезд аналитиков России (Россия, Москва, 2017), III Междисциплинарный Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике 2017 (Россия, Севастополь, 2017), Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (Россия, Москва, 2017), 7th Euro Biosensors and Bioelectronics Conference (Германия, Берлин, 2017), III Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Россия, Краснодар, 2017), The 2nd International Symposium on «Physics, Engineering and Technologies for Bio-Medicine» (Россия, Москва, 2017), XXV научно-

практическая конференция студентов, аспирантов и молодых специалистов секции «естественных и инженерных наук» (Россия, Дубна, 2018), Международный симпозиум АСТАНА БИОТЕХ 2018 (Казахстан, Астана, 2018), Всероссийская научно-практическая конференция «Природа. Общество. Человек.» (Россия, Дубна, 2018), The First International Conference on Molecular Modeling and Spectroscopy (Египет, Каир, 2019), Пятая Междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» — 2019 (Россия, Судак, 2019), XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Россия, С.-Петербург, 2019), The Second International Conference on Molecular Modeling and Spectroscopy (Египет, Каир, 2020), IV Всероссийская конференция с международным участием «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Россия, Краснодар, 2020), VI Всероссийский симпозиум с международным участием «Разделение и концентрирование в аналитической химии» (Россия, Краснодар, 2021), Седьмая Междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Россия, Москва, 2021), IV Съезд аналитиков России (Россия, Москва, 2022), 9th International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures (Россия, С.-Петербург, 2022), X Международная молодежная научная конференция, посвященная 120-летию со дня рождения академиков И.В. Курчатова и А.П. Александрова (Россия, Екатеринбург, 2023), 10-я Школа-конференция с международным участием по Оптоэлектронике, Фотонике и Нанобиоструктурам SPbOPEN 2023 (Россия, С.-Петербург, 2023).

Финансовая поддержка работы осуществлялась в рамках следующих грантов: Грант РНФ №15-19-00229/15-331у от 15.06. 2015 г., Грант Губернатора Московской области 2017 (договор №966 от 28.07.2017), Грант Губернатора Московской области 2018 (договор №324 от 17.07.2018), Грант Губернатора Московской области 2019 (договор №13 от 16.07.2019), Грант Губернатора Московской области 2020 (договор №34 от 24.07.2020), Грант «УМНИК-фотоника» (договор №631ГУЦЭС8-D3/63688 от 24.11.2020), Грант РНФ №24-23-00432 от 29.11.2023 г.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 147 страницах и включает 59 рисунков и 13 таблиц. Работа состоит из введения, шести глав, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 256 наименования, и двух приложений.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю к.х.н., доценту Грибовой Е.Д. за неоценимую помощь в формулировании целей и задач исследования. Д.х.н., профессору Гладышеву П.П., за помощь в выполнении диссертационной работы. Автор благодарит научных сотрудников НИИ ПА С.В. Дежурова и Д.В. Крыльского, Р.В. Новичкова за помощь в проведении экспериментов. Автор благодарит д.б.н., профессора, директора ИБК РАН, г. Пущино О.С. Моренкова за предоставления биологических объектов для проведения исследовательской работы и методическую помощь. Автор благодарит сотрудника ОИЯИ г. Дубна, старшего инженера Ширикова И.В. за помощь в разработке флуоресцентного ридера для проведения количественного иммунохроматографического анализа.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Во **Введении** обоснована актуальность проведенных исследований, сформулированы основная цель и задачи, описаны научная новизна и практическая значимость полученных результатов. **Введение** содержит основные положения и результаты, выносимые на защиту, сведения о достоверности и апробации результатов.

В первой главе представлен анализ литературных данных о принципах современного иммунохимического анализа. Рассмотрены несколько видов ИХА с использованием различных меток. Описаны различные методы синтеза КТ и способы их гидрофилизации для использования в биоанализе. Описана целесообразность использования КТ, флуоресцирующих в ближней ИК области спектра. Подробно охарактеризована структура антител и методы их конъюгаций с различными метками.

Во второй главе приведен список материалов, реактивов и оборудования, используемых в работе. Изложен способ гидрофилизации многослойных КТ, конъюгатов КТ с антителами, методики изготовления иммунохроматографических тест-систем. Описан алгоритм исследования КТ и их конъюгатов физико-химическими методами и проведения ИХА для определения gB вируса болезни Ауески.

В **третьей главе** был рассмотрен синтез коллоидных КТ методом металлорганического коллоидного синтеза (МКС), гидрофилизация КТ состава CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS, проведено исследование двух видов КТ состава CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS, покрытых ПТВП, люминесцирующих в БлИК области спектра, с максимумом эмиссии при 700 нм и 800 нм в области прозрачности биологических матриц и оптимальных для ИХА белковых маркеров заболеваний.

Для работы были выбраны многослойные CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS–КТ с максимумами эмиссии при 600, 640, 680, 700 нм, которые далее модифицировали полимером для получения гидрофильной поверхности. В качестве полимерной основы использовали сополимер N-винилпирролидона (ВП) с малеиновым ангидридом (МАН). На первом этапе образовывался олигомер ВП, затем, без выделения и очистки продуктов, вводили сомономеры МАН и в качестве разветвителя (сшивающего агента) этиленгликольдиметакрилат (ЭГМ), далее, инициатор 4,4'-азобис(4-цианвалериановую кислоту) (АБЦВК)). Добавление избытка 1,6-гександитиола (ГДТ) в систему после олигомеризации привело к присоединению –SH групп по оставшимся двойным связям, что способствовало образованию тиолсодержащего полимера с остатками малеинового ангидрида. При последующей модификации КТ и гидролизе в водной среде в присутствии гидроксида тетраметиламмония происходит формирование

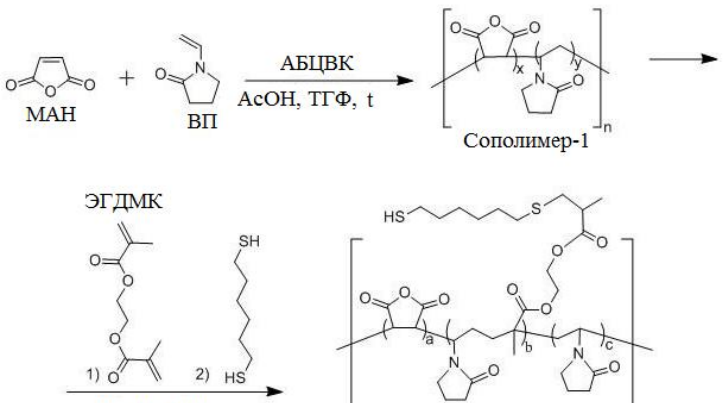


Рисунок 1 — Схема синтеза ПТВП

карбоксильных групп, обеспечивающих отрицательный заряд поверхности КТ. Наличие карбоксильных групп на поверхности КТ необходимо для их дальнейшей конъюгации с белками. Схема синтеза тиол-содержащего сополимера винилпирролидона, малеинового ангидрида и этиленгликольдиметакрилата (ПТВП) представлена на рисунке 1.

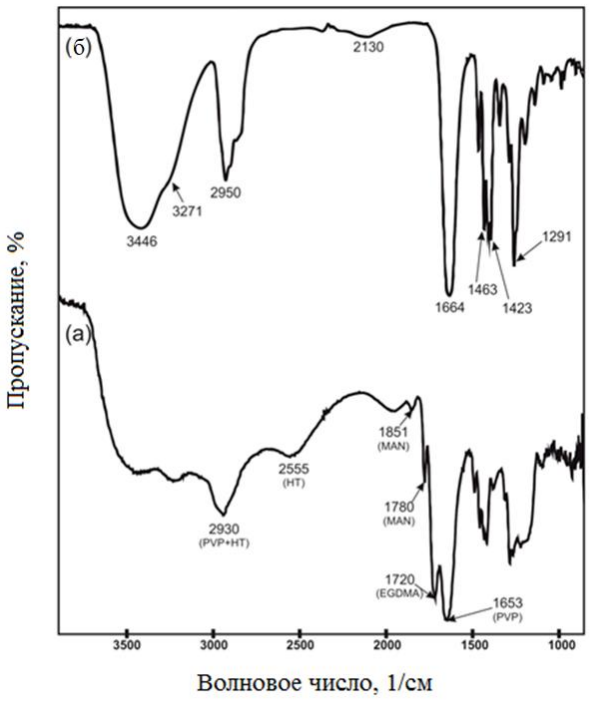


Рисунок 2 — ИК-спектр ПТВП (а) и ПВП (б). Измерения проводились на ИК-спектрометре с Фурье-преобразованием Nicolet 6700

В ИК-спектрах ПТВП (Рисунок 2а) присутствует пик при частоте 1653 $см^{-1}$, соответствующий валентным колебаниям группы –C=O в лактаме ПВП. Характеристическим пиком валентных колебаний –C(O)–O–C(O)– групп малеинового ангидрида является пик при 1780 и 1851 $см^{-1}$. Валентное колебание сложноэфирной группы ЭГМ наблюдается при частоте 1720 $см^{-1}$, в области 2555–2930 $см^{-1}$ наблюдаются валентные колебания связи –SH ГДТ. Сравнение ИК-спектров полученного сополимера со спектром ПВП (Рисунок 2) подтверждает образованием более сложной полимерной системы.

Оптические свойства CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS–ПТВП–КТ после гидрофилизации полностью сохранялись, за исключением небольшого снижения КВ (Рисунок 3). Однако, для КТ с максимумом флуоресценции при 600 нм наблюдалось сильное снижение КВ с 84 до 55 %, что может быть связано со структурой КТ. Чем меньше размер КТ и меньше дополнительных полупроводниковых слоев на поверхности КТ, тем сильнее влияние полимерной оболочки на оптические свойства КТ.

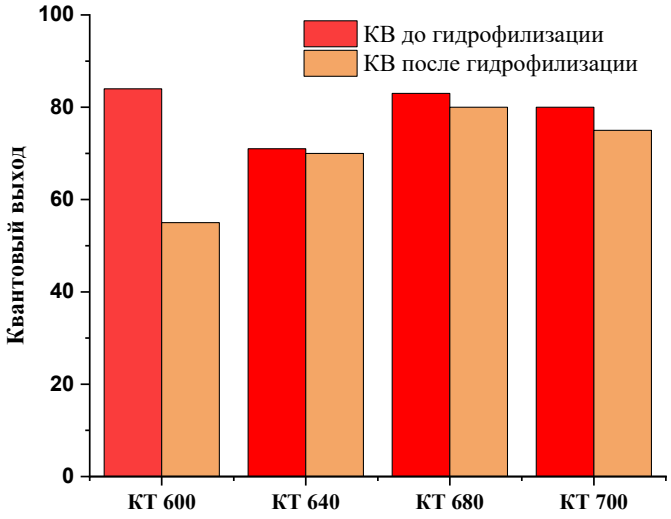


Рисунок 3 — Квантовый выход КТ с максимумами флуоресценции при 600 (КТ600), 640 (КТ640), 680 (КТ680) и 700 (КТ700) нм; до и после гидрофилизации; длина волны возбуждения 450 нм

Полученные данные о ζ-потенциале на поверхности гидрофильных КТ и размере наночастиц приведены в таблице 1. При pH 8,0 на частицах наблюдается существенный отрицательный заряд, что указывает на стабильность коллоидной дисперсии.

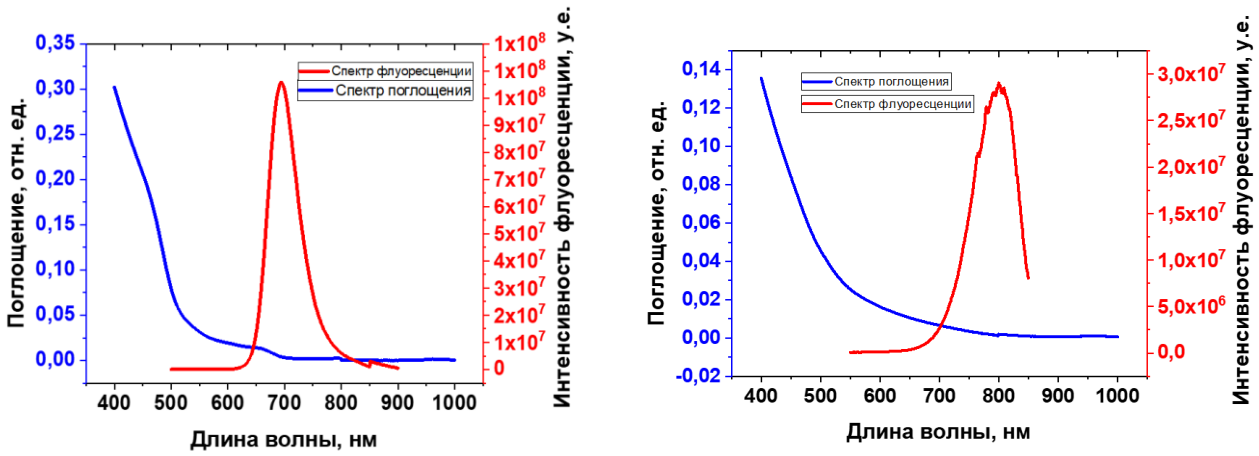
Таблица 1 — Физико-химические характеристики КТ

Квантовая точка	**$\lambda_{макс}$, нм**	**$d_{ПЭМ}$, нм**	**$d_{ДРС}$, нм**	**ζ-потенциал (мВ)**
CdSe/CdS/ZnS	600	7,5	16	-40
CdTeSe/CdS/ZnS	640	11,5	24	-39
CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS	680	9,5	18	-35
CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS	700	–	15-20	-39

Примечание: $\lambda_{макс}$ — длина волны максимального значения интенсивности флуоресценции; $d_{ПЭМ}$ — диаметр КТ, измеренный ПЭМ; $d_{ДРС}$ — диаметр КТ, измеренный методом ДРС

Спектральные характеристики квантовых точек в растворе и на ИХ-тестах

В рамках работы исследовались два вида КТ состава CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS, покрытых ПТВП, люминесцирующие в ближней ИК-области спектра, с максимумом эмиссии при 700 нм (КТ700, Рисунок 4а) и 800 нм (КТ800, Рисунок 4б). В спектре поглощения для КТ700 наблюдается экситонный пик при 650–660 нм, а полоса флуоресценции для КТ800 несколько шире, чем для КТ700, что может быть связано с поверхностными дефектами в нанокристалле или с более широким разбросом по размерам [11]. Помимо этого, в спектрах поглощения КТ800 не проявляется экситонный пик, что может свидетельствовать о содержании примесных ионов и дефектов кристаллической решетки в КТ.



а **б**

Рисунок 4 — Спектр поглощения и флуоресценции синтезированных методом МКС КТ700 с концентрацией 4 мг/мл (а) и КТ800 с концентрацией 7 мг/мл (б)

CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВП-КТ имеют высокий КВ, равный 80%, и обладают необходимой стабильностью и биосовместимостью для проведения процессов биоконъюгации. Одной из задач данной работы было создание иммунохроматографической системы для определения модельного ВБА. Для подбора оптимальных концентраций КТ и конъюгатов, выбора условий проведения ИХА и регистрации сигнала с тест-полоски, было необходимо исследовать взаимодействие КТ с компонентами тест-системы и провести анализ мешающего влияния этих компонентов на результат анализа.

Мембрана для иммунохроматографических тест-полосок изготавливается из нитроцеллюлозы и имеет собственную флуоресценцию. Для определения влияния флуоресценции НЦМ на результаты анализа снимали спектры флуоресценции НЦМ, блокированной альбумином при длинах волн возбуждения в диапазоне от 450 нм до 590 нм. При более низких длинах волн возбуждения, автофлуоресценция НЦМ резко увеличивается, поэтому данную область не рассматривали. Было показано, что наименьшая флуоресценция НЦМ наблюдается при возбуждении длиной волны 590 нм.

На основании изучения зависимостей спектров флуоресценции НЦМ и синтезированных CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВП-КТ от длины волны возбуждения, была построена зависимость соотношения интенсивности сигнала к фону (фон—НЦМ) от длины волны для КТ700 и КТ800 (Рисунок 5). Зависимость показывает, что оптимальной длиной волной возбуждения для КТ700 нм является область 460–500 нм, для КТ800 — 570 нм.

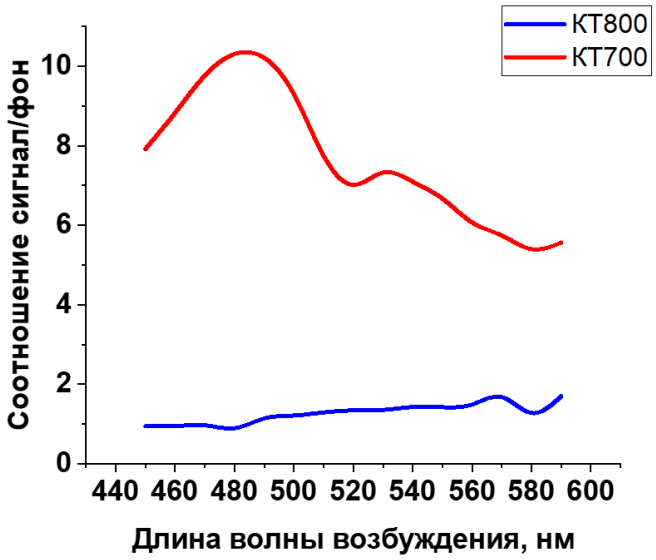


Рисунок 5 — Зависимость соотношения сигнал/фон от длины волны для синтезированных методом МКС КТ800 и КТ700

Для дальнейшего исследования и использования в качестве меток антител в ИХА были выбраны КТ700, имеющие максимальное соотношение сигнал/фон (Рисунок 5).

Четвертая глава посвящена разработке способа конъюгации многослойных КТ состава CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS с антителами против gB вируса болезни Ауески. В работе для получения конъюгатов КТ с антителами был использован метод карбодиимидного связывания с использованием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (EDC) в качестве активатора карбоксильных групп на поверхности КТ.

Для определения оптимальных соотношений EDC:КТ и антитело:КТ проводили несколько синтезов конъюгатов с КТ. Эффективность конъюгации оценивали с помощью горизонтального гель-электрофореза в агарозном геле (Рисунок 6). Образование конъюгатов КТ с антителами сопровождалось изменением электрофоретической подвижности. В образце без антител этот сдвиг не наблюдали (Рисунок 6а). Хорошая электрофоретическая однородность продуктов и отсутствие неконъюгированных КТ были получены при соотношении антитело:КТ 10:1 и соотношении КТ:EDC 1:2000 (Рисунок 6ж).

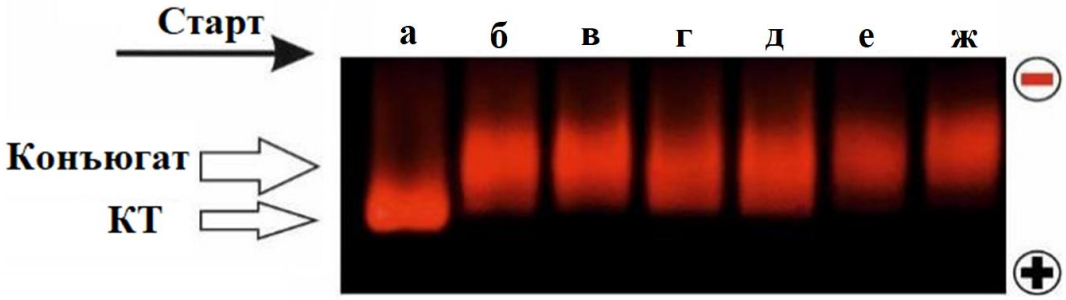
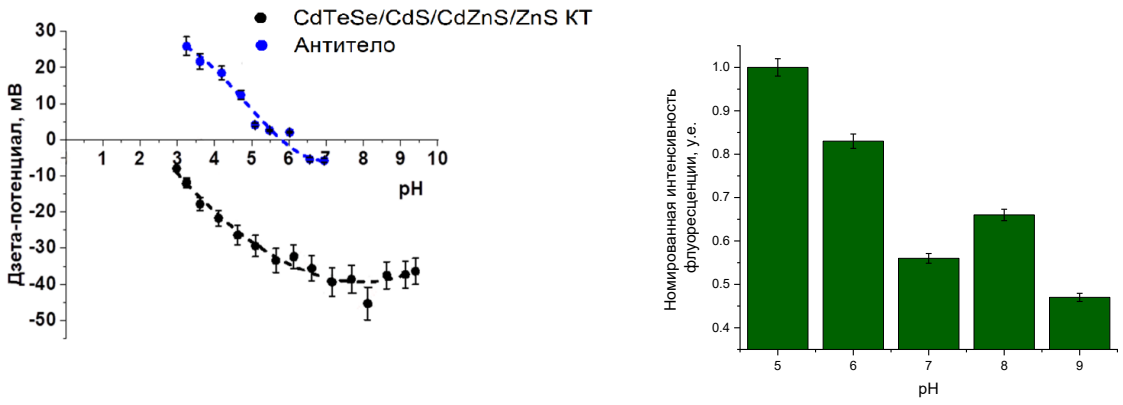


Рисунок 6 — Агарозный гель-электрофорез продуктов конъюгации между КТ700 с антителами при различных соотношениях КТ:антитело:EDC. а – неконъюгированный КТ (контроль); б – 1:5:1000; в – 1:5:2000; г – 1:10:100; д – 1:10:500; е – 1:10:1000; ж – 1:10:2000

Следует учитывать, что оптимальная ориентация антител в конъюгатах КТ-антитело возникает, когда Fc-область антитела прикреплена к поверхности КТ, что позволяет антигенсвязывающим сайтам внутри Fab-областей взаимодействовать с антигеном

соответствующим образом. Если имеет место случайная ориентация, следует учитывать снижение связывающей способности и чувствительности анализа. При проведении ориентированной иммобилизации антител на КТ, необходимо учитывать распределение заряда и гидрофильность антител. Суть метода, используемого в данной работе, состоит в том, что антитела связываются с поверхностью наночастиц за счет физической адсорбции с последующим ковалентным связыванием с поверхностью КТ. Из-за наличия различных аминокислот в составе антитела, а также карбоксильных и аминогрупп на концах как тяжелой, так и легкой цепи, положительные и отрицательные заряды неравномерно распределены по антителу, что вызывает возникновение дипольного момента белковой молекулы и определенную ориентацию ее в электрическом поле поверхности КТ. Изменяя значение pH раствора, возможно регулировать число различных заряженных групп на поверхности белковых молекул. Ионная адсорбция является многоточечным взаимодействием и связывание белка с карбоксильными группами на поверхности КТ будет происходить между участком антитела с наибольшей плотностью положительно заряженных аминокислотных остатков. Для выбора оптимального pH для ориентированной конъюгации исследовалась зависимость ζ-потенциала антител к gB вируса болезни Ауески и КТ состава CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВП от pH растворов (Рисунок 7а). Изоэлектрическая точка данных антител равна 6, а максимальное значение разноименных зарядов взаимодействующих КТ и антител имеет место при pH около 4. В этом случае можно ожидать наибольшие энергию взаимодействия и константы связывания при адсорбционной конъюгации.



а **б**

Рисунок 7 — **а:** зависимость ζ-потенциала моноклональных антител ADV 34/2 к гликопротеину gB вируса болезни Ауески и КТ состава CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВП от pH раствора; **б**: зависимость интенсивности флуоресценции тестовой зоны от pH буферного раствора для проведения конъюгации КТ с антителами; $[c]_{gB}$ = 0,2 мкг/мл

Для определения влияния pH раствора на конъюгацию и ориентацию антитела на поверхности КТ, антитела предварительно ионизировали при pH 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 и связывали с КТ (Рисунок 7б). Из зависимости можно предположить, что поверхность КТ, обусловленная отрицательно заряженными карбоксильными группами, будет связывать больше антител при низких pH, поскольку на антителах при pH ниже 5,0 и 6,0 присутствуют протонированные

положительно заряженные аминогруппы. Помимо этого, увеличение интенсивности сигнала может косвенно доказывать связывание большего количества антигенов с доступными паратопами антител на поверхности КТ. Увеличение количества паратопов связано с правильной ориентацией антитела на поверхности наночастицы, при котором Fc область IgG связывается с КТ, оставляя все антигенсвязывающие фрагменты доступными для связывания.

Исследования Gao S. и соавторов, посвященные молекулярному моделированию распределения заряженных групп на поверхности антител при различных значениях pH, показали, что при pH < pI антител, наибольшая плотность реакционноспособных положительно заряженных участков находится на Fc-фрагменте между C_{H2} и C_{H3} доменами. Для осуществления электростатических взаимодействий необходимо, чтобы раствор антител имел pH на 0,5-1 ниже изоэлектрической точки. КТ состава CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВП при pH = 5 имеют значение ζ-потенциала равное -30 мВ, обусловленное наличием отрицательно заряженных COO^- групп, и сохраняют коллоидную стабильность. При этом буферный раствор, в котором проводится конъюгация, не должен содержать электролитов, препятствующих электростатическому взаимодействию антитела с лигандами на поверхности КТ. Ввиду этого в качестве реакционной среды был выбран органический буферный раствор 2-(N-морофлино)этансульфоновая кислота (MES) с pH = 5. После проведения иммобилизации антител на КТ, полученные конъюгаты были очищены методом гель-хроматографии. Полная схема ориентированной конъюгации КТ с антителами с дальнейшей очисткой представлена на рисунке 8.

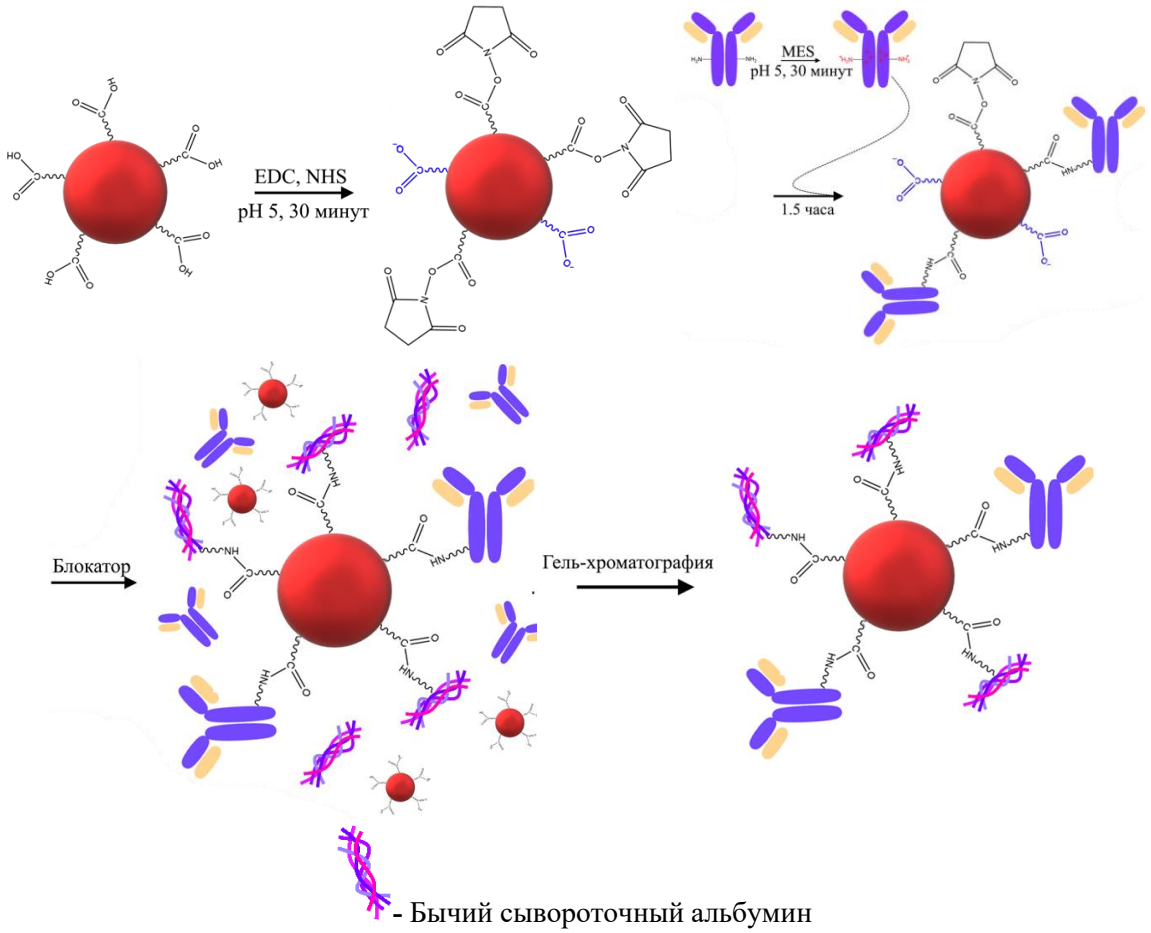


Рисунок 8 — Схема ориентированной конъюгации КТ с антителами с дальнейшей очисткой

Размер многослойных КТ и их конъюгатов измеряли методом ДРС. Средний гидродинамический размер многослойных КТ составил 12–15 нм. После конъюгации средний размер увеличивался до 30–40 нм за счет образования конъюгатов. Квантовый выход КТ после конъюгации снижался с 80% до 45%.

Разработан способ анализа КТ, антител и конъюгатов методам КЗЭ, ВЭЖХ и эксклюзионной хроматографией.

В работе было проведено исследование влияния значения pH и природы фонового электролита на параметры электрофоретического разделения смеси, содержащей КТ, антитела и их конъюгаты. В качестве буферных растворов были выбраны биологически совместимые фосфатный и боратный буферные растворы с различными pH. Эффективность системы оценивали по значениям высоты эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ) и числа теоретических тарелок (N).

В таблице 2 приведены электрофоретические параметры для ведущих электролитов различных состава и pH.

Таблица 2 — Электрофоретические параметры КТ, антител и конъюгатов в фоновых электролитах с различным pH

Аналит	**Фоновый электролит, pH**	**t_m, мин**	**μ, $см^2В^{-1}с^{-1}$**	**N, шт**	**H, см**
Конъюгаты	25 мМ боратный буфер, pH = 9,2	4,57	$4{,}4\cdot10^{-1}$	$1{,}34\cdot10^{6}$	$2{,}54\cdot10^{-5}$
Антитела		6,59	$3{,}0\cdot10^{-1}$	$6{,}95\cdot10^{5}$	$8{,}05\cdot10^{-4}$
КТ		14,84	$1{,}4\cdot10^{-1}$	$2{,}20\cdot10^{7}$	$2{,}54\cdot10^{-5}$
Конъюгаты	25 мМ фосфатный буфер, pH = 8	7,24	$2{,}8\cdot10^{-1}$	$5{,}25\cdot10^{6}$	$1{,}07\cdot10^{-4}$
Антитела		8,12	$2{,}5\cdot10^{-1}$	$1{,}17\cdot10^{5}$	$4{,}78\cdot10^{-3}$
КТ		8,17	$2{,}5\cdot10^{-1}$	$4{,}27\cdot10^{6}$	$1{,}31\cdot10^{-4}$
Конъюгаты	25 мМ фосфатный буфер, pH = 7	8,61	$2{,}3\cdot10^{-1}$	$1{,}18\cdot10^{6}$	$4{,}73\cdot10^{-4}$
Антитела		9,41	$2{,}1\cdot10^{-1}$	$2{,}46\cdot10^{5}$	$2{,}2810^{-3}$
КТ		8,67	$2{,}3\cdot10^{-1}$	$1{,}20\cdot10^{6}$	$4{,}66\cdot10^{-4}$
Конъюгаты	25 мМ фосфатный буфер, pH = 6	17,19	$1{,}2\cdot10^{-1}$	$5{,}25\cdot10^{5}$	$1{,}07\cdot10^{-3}$
Антитела		10,92	$1{,}8\cdot10^{-1}$	$3{,}05\cdot10^{5}$	$1{,}83\cdot10^{-3}$
КТ		11,11	$1{,}8\cdot10^{-1}$	$4{,}93\cdot10^{5}$	$1{,}13\cdot10^{-3}$
Конъюгаты	25 мМ фосфатный буфер, pH = 5	—	—	—	—
Антитела		—	—	—	—
КТ		21,81	$0{,}9\cdot10^{-1}$	$2{,}11\cdot10^{6}$	$2{,}66\cdot10^{-4}$

Примечание: $t_м$ — время миграции; μ — электрофоретическая подвижность; N — число теоретических тарелок, характеризующее эффективность электрофоретической системы; H — высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ)

Из приведенных в таблице 2 данных видно, что для конъюгатов и антител с возрастанием pH раствора наблюдается уменьшение времени миграции частиц. При увеличении pH фонового электролита наблюдается значительное улучшение разрешения пиков для конъюгатов (pH = 7 и 8) и КТ (pH = 9). Однако, для анализа трехкомпонентной системы, состоящей из КТ, антител и конъюгатов, наиболее эффективной является электрофоретическая система с использованием в качестве ведущего электролита 25 мМ боратного буферного раствора с pH = 9,2, капилляра диаметром 50 мкм L/Lэф = 64,5/56 см, с расширением и длиной оптического пути 150 мкм. Таким

образом, как видно из электрофореграммы (Рисунок 9), условия использования 25 мМ боратного буферного раствора с pH = 9,2 при напряжении +30 кВ являются оптимальными для разделения КТ, антител и их конъюгатов

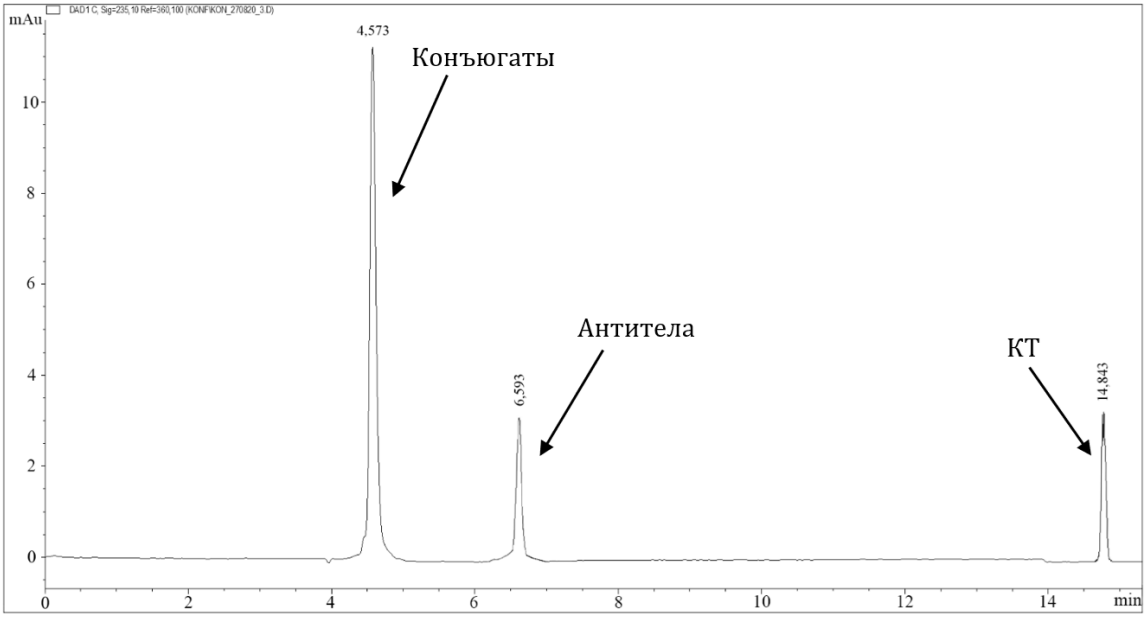


Рисунок 9 — Электрофореграмма смеси КТ, антител и их конъюгатов. Условия проведения анализа: длина волны детектирования 210 нм, напряжение + 30 кВ, фоновый электролит: 25 мМ боратный буфер, pH = 9,2

Время миграции КТ составляло 14,84 минуты, неориентированных и ориентированных конъюгатов составило 4,57 минуты, что свидетельствовало об увеличении гидродинамического размера и заряда поверхностных групп КТ после проведения конъюгации, вследствие иммобилизации белковых молекул на их поверхности. Узкая электрофоретическая зона свидетельствует о гомогенности и чистоте полученных конъюгатов.

Для исследования образования конъюгатов дополнительно применяли метод эксклюзионной хроматографии. Анализ проводили на жидкостном хроматографе LC-20, фирмы «Shimadzu», с аналитической колонкой для эксклюзионной хроматографии ZORBAX GF-250. Метод эксклюзионной хроматографии основан на разделении по размерам: крупные молекулы должны выходить из колонки раньше, чем более мелкие.

Изократический режим элюирования при объеме инжекции 1 мкл и скорости потока 3 мл/мин позволил разделить КТ, моноклональные антитела и конъюгаты с хорошим разрешением пиков. Однако, при использовании в качестве подвижной фазы фосфатного буфера с [c] = 33,5 мМ, время удерживания частиц не соответствовало закономерности эксклюзионной хроматографии. В частности, время удерживания конъюгатов, которые представляют собой сшитые антитела и КТ, больше времени удерживания моноклональных антител, в отличие от предполагаемого в эксклюзионной (ситовой) хроматографии. Это указывает на то, что в условиях хроматографирования имеет место взаимодействие конъюгата с матрицей эксклюзионного сорбента. Порядок выхода из колонки КТ и антител также не соответствовал эксклюзионному механизму и указывал на то, что КТ взаимодействуют с матрицей используемого

эксклюзионного сорбента. Одной из причин «неправильной» последовательности выхода аналитов могло являться образование ионных и водородных связей между материалом сорбента (диольные группы) и аналитом. Для снижения такого взаимодействия в подвижную фазу обычно добавляют анионные и неионногенные ПАВ.

Изменение условий проведения анализа привело к «правильному» порядку выхода КТ, антител и конъюгатов (Рисунок 10). Анализ антител и их конъюгатов проводили в условиях изократического режима элюирования с использованием ПФ, содержащей фосфатный буфер с добавлением ДДСН в качестве ПАВ, скорость потока 3 мл/мин, объем инжекции 1 мкл.

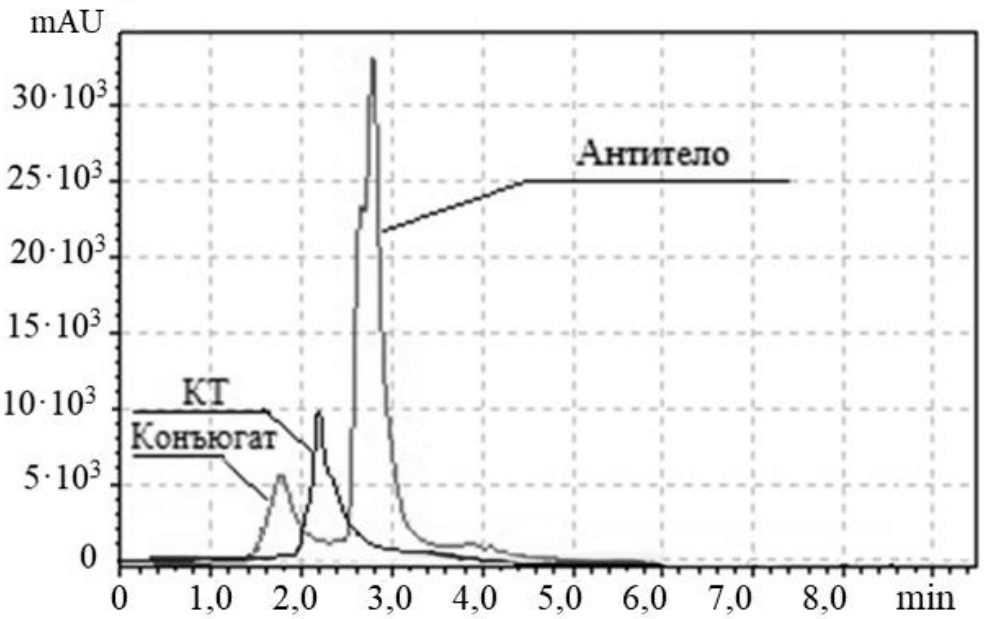


Рисунок 10 — Хроматограммы растворов конъюгатов, КТ и моноклональных антител к gB ВБА; ПФ: 33,5 мМ фосфатный буфер + 0,1% ДДСН, НФ: сферические частицы кремнезема, модифицированные цирконием с гидрофильной диольной привитой фазой, изократический режим элюирования, скорость потока – 3 мл/мин, объем инжекции 1 мкл

Как видно из таблицы 3 при использовании ПАВ в качестве добавки к ПФ, порядок элюирования аналитов соответствует ожидаемому в эксклюзионной хроматографии: конъюгаты, КТ, антитела.

Таблица 3 — Условия хроматографического эксклюзионного разделения и хроматографические параметры в выбранных условиях анализа

Аналит	**Размер частиц по ДРС, нм**	**t'$_R$, мин**	**k′**	**N**	**H, мм**
Антитело	10	1,58	8,27	252	0,99
КТ	12–15	0,98	6,26	76	3,28
Конъюгат	30–40	0,53	4,77	75	3,33

Примечание: t'$_R$ — время удерживания; k' — коэффициент емкости; N — эффективность колонки; H — высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ)

Однако для улучшения разделения необходимо использовать более эффективную колонку с молекулярным ситом с диапазоном размеров пор, соответствующих размеру разделяемых компонентов.

В **пятой главе** продемонстрирована возможность количественного ИХА с использованием портативного флуоресцентного ридера. Определены условия проведения ИХА и характеристики разрабатываемого ридера с целью повышения чувствительности анализа.

Достоверный анализ и характеризация многообразия планарных систем требует использования различных специализированных измерительных устройств. В связи с этим был разработан UV-VIS сканер планарных систем для исследования распределения КТ-меток вдоль стрипа после завершения иммунохроматографического процесса. Из приведенного скана тест-полоски (Рисунок 11) видно, что конъюгаты не сорбируются на аналитической мембране тест-полоски в области окна иммунохроматографической кассеты кроме тестовой и контрольной зон. При этом избыток конъюгатов преимущественно локализуется на впитывающей мембране, а также в области склеек аналитической мембраны с мембраной для образца и впитывающей мембраной.

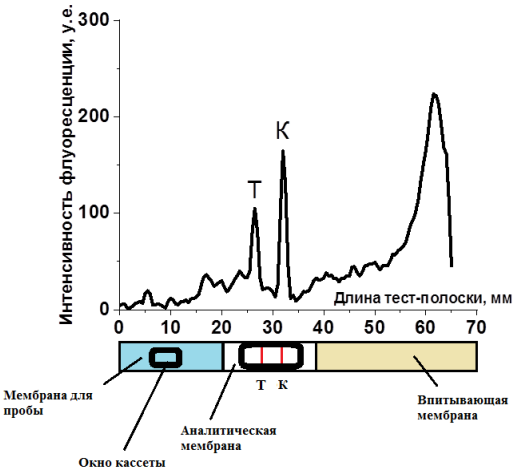


Рисунок 11 — Исследование распределения конъюгата CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВП–КТ700 с моноклональными антителами ADV 34/2 вдоль стрипа после завершения ИХА, снятое на сканере, сконструированном на базе спектрофлуориметра USB-650 Red Tide фирмы OceanOptics (350–1000 нм). Концентрация наносимого конъюгата, [c] = 10 мкМ, V=10 мкл

Было определено оптимальное количество наносимого конъюгата на тест-систему, при котором интенсивность сигнала максимальная (Рисунок 12). Исследование распределения конъюгатов вдоль полоски в зависимости от наносимого количества показывала, что наилучший результат, характеризующийся максимальным сигналом и оптимальным распределением, наблюдался при концентрации наносимого конъюгата 2,7 мкМ (Рисунок 12е). При концентрации ниже оптимальной сигнал от тестовой и контрольной зон снижался. В остальных случаях, кроме концентрации наносимого конъюгата 16 мкМ (Рисунок 12а), сигнал тестовой линии был таким же, как на рисунке 12е, но с большим количеством конъюгатов во впитывающей зоне. Концентрация лизата ВБА во всех случаях составляла 200 нг/мл. Из зависимостей распределения конъюгата вдоль тест-полоски видно, что оптимальной концентрацией наносимого конъюгата на тест-полоску является 2,7 мкМ.

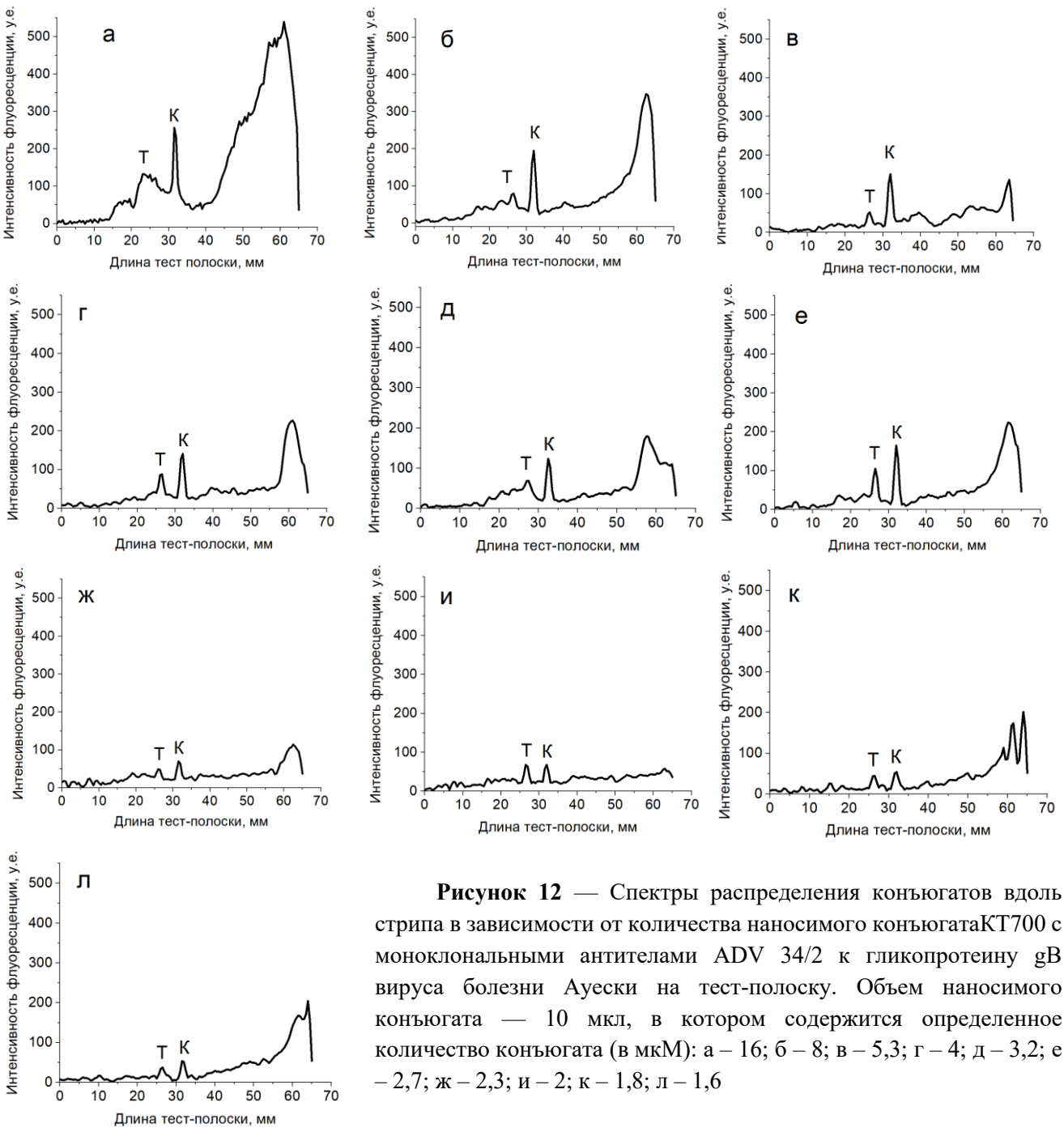


Рисунок 12 — Спектры распределения конъюгатов вдоль стрипа в зависимости от количества наносимого конъюгатаКТ700 с моноклональными антителами ADV 34/2 к гликопротеину gB вируса болезни Ауески на тест-полоску. Объем наносимого конъюгата — 10 мкл, в котором содержится определенное количество конъюгата (в мкМ): а – 16; б – 8; в – 5,3; г – 4; д – 3,2; е – 2,7; ж – 2,3; и – 2; к – 1,8; л – 1,6

С учетом результатов данного исследования был сконструирован и изготовлен макет флуоресцентного ридера. Сигналы с фотоматрицы обрабатывались с помощью специальной программы на персональном компьютере. Пример получаемых при этом результатов приведен на рисунке 13.

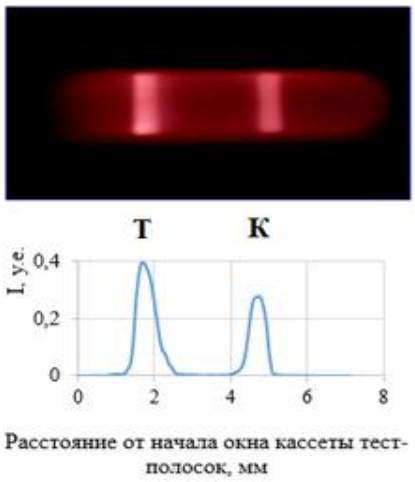


Рисунок 13 — Флуоресцентный скан тест-полоски с содержанием лизата вируса болезни Ауески 1:100 с использованием конъюгата КТ700 с моноклональными антителами ADV 34/2 к гликопротеину gB вируса болезни Ауески. I – интенсивность флуоресценции в условных единицах. Т – тестовая и К – контрольная зоны

В результате сравнения спектров флуоресценции CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВП–КТ700 в растворе и на аналитической мембране иммунохроматографической тест-полоски было установлено, что зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации в растворе и на твердом носителе (тест-полоске) отличаются. При проведении ИХА с использованием тест-полосок нужно использовать концентрации конъюгатов CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВП–КТ700–антитело в диапазоне 0,03–0,5 мкМ, лежащих в линейной области зависимости (Рисунок 14а).

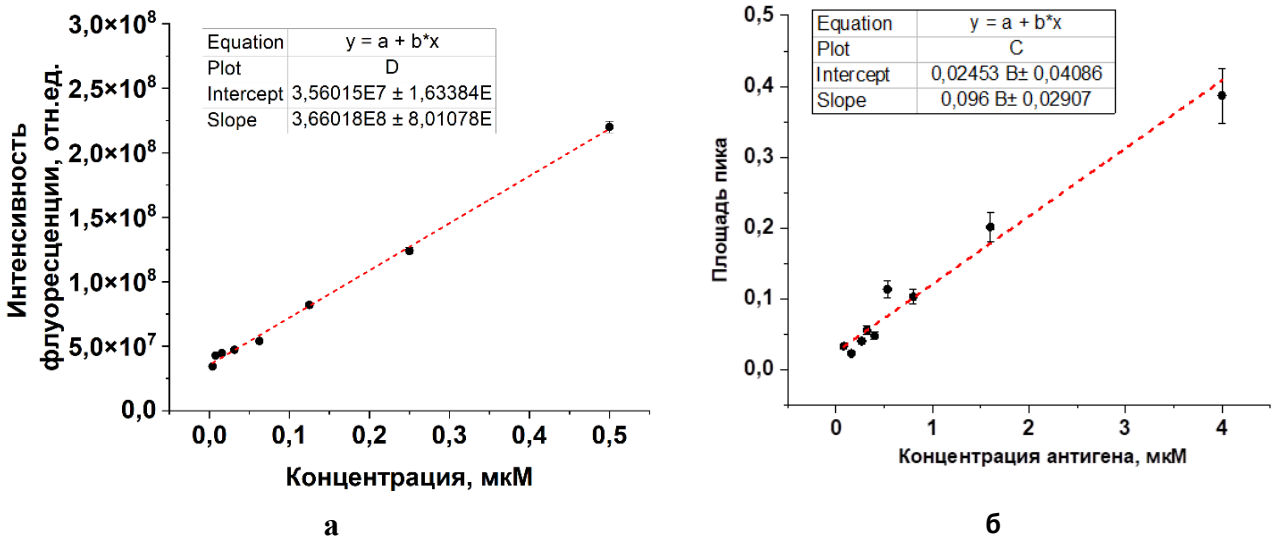


Рисунок 14 — **а**: зависимость интенсивности флуоресценции конъюгата на тест-полоске от концентрации наносимого раствора в максимуме флуоресценции пятна, объем наносимого образца 1 мкл. Измерения проводились спектрофлуориметре FluoroLog 3 модели FL3–21; **б**: зависимость интенсивности флуоресценции тестовой зоны от концентрации антигена gB вируса болезни Ауески. Измерения проводились на портативном флуоресцентном ридере

С использованием флуоресцентного ридера была построена калибровочная кривая (Рисунок 14б). Как видно из графика, имеет место линейная зависимость между площадью пика аналитического сигнала и концентрацией антигена вплоть до концентрации 4мкМ (0,8 мкг/мл). Это позволяет осуществлять определение антигенов в анализируемых пробах.

Предел обнаружения (C_{min}) gB с использованием конъюгатов с коллоидным золотом находится в диапазоне 0,05–3,2 мкг/мл [12]. При этом минимальная концентрация (C_{lim}) gB ВБА в пробе, определяемая с использованием конъюгата с КТ с применением флуоресцентного ридера

лежит в диапазоне 0,5–1,0 нг/мл (0,025–0,004 мкМ), а предел обнаружения gB ВБА, равен 0,15 нг/мл (0,0075 мкМ).

Для оценки аналитических характеристик иммунохроматографического определения gB вируса болезни Ауески анализ повторялся многократно (n=30) (Таблица 4).

Таблица 4 — Аналитические характеристики тест-системы для определения gB вируса болезни Ауески с использованием CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВП-КТ в качестве меток

Характеристика	**Результат ИХА, %**
Процент ложноположительных результатов	3,3
Процент ложноотрицательных результатов	2,5
Специфичность*	96,7
Чувствительность**	97,5

Примечание: следует подчеркнуть, что в данном контексте диагностическая чувствительность и специфичность, часто применяемая в иммунохроматографических тест-системах; ***специфичность (Sp)** — показатель, выражающий долю истинно отрицательных результатов; ****чувствительность (Se)** — показатель, выражающий долю истинно положительных результатов

Рассчитанные параметры удовлетворяют предъявляемым к тест-методам требованиям комиссии ЕС (Commission Decision 2002/657/EC): доля ложных результатов не должна превышать 5%. Определение аналитических характеристик разработанной иммунохроматографической тест-системы основано на результатах внутри-лабораторной проверки, выполненной с сыворотками крови мыши, искусственно загрязненными антигенами gB вируса болезни Ауески.

Литературный анализ показал, что иммунохроматографических тест-систем для определения ВБА и статей по исследованию таких систем очень мало. Сравнение аналитических характеристик с существующими литературными данными (Таблица 5) показывает, что ИХА с использованием КТ в качестве меток снижает предел обнаружения, при этом не уступает в чувствительности и специфичности ИФА и ИХА с использованием в качестве меток коллоидного золота.

Таблица 5 — Сравнение аналитических характеристик определения ВБА с использованием различных меток

Метка	**Метод анализа**	**Определяемый антиген ВБА**	**C_{min} (мкг/мл)**	**Se, %**	**Sp, %**	**Лит.**
Полигистининовая метка	ИФА	gE	—	97,6	96,4	[13]
КЗ	ИХА	gE	—	97,5	92,3	[14]
КЗ	ИХА	gB	—	97,5	96,7	[14]
КЗ	ИХА	gB	—	95,0	98,0	[15]
КЗ	Прямой ИХА	gB	0,05–3,2	98,6	98,0	[12]
КЗ	Конкурентный ИХА	gB	—	94,9	97,6	[16]
КТ700	Прямой ИХА	gB	$5{,}2\cdot10^{-3}$	97,5	96,7	Данная работа

Примечание: C_{min} — предел обнаружения; Se — чувствительность; Sp — специфичность

Выводы

1. Получены стабильные многослойные КТ состава CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS, флуоресцирующие в БлИК-области спектра с высоким квантовым выходом (80%), покрытые биосовместимым гидрофильным полимером с карбоксильными функциональными группами, разработан метод количественного иммунохроматографического анализа с использованием модельного вируса болезни Ауески с использованием в качестве меток CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-КТ.

2. Проведена модификация гидрофобных КТ состава CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS для получения гидрофильных, биосовместимых наночастиц и исследованы их свойства. Показано влияние гидрофилизации на размерные и оптические свойства КТ. Установлено, что гидрофилизация приводит к образованию наночастиц размером 12–15 нм и не изменяет спектральные свойства этих КТ, за исключением небольшого снижения квантового выхода КТ на 10–15%. Изучено мешающее влияние компонентов тест-полоски на сигнал при использовании КТ, флуоресцирующий в БлИК-области спектра (КТ700 и КТ800) в качестве меток. Показано, что в условиях иммунохроматографического анализа КТ700 имеют более высокое соотношение сигнал/фон, чем КТ800. Определена оптимальная длина волны возбуждения флуоресценции КТ700 для получения высокого сигнала, которая лежит в диапазоне 460–500 нм.

3. Разработан способ синтеза конъюгатов КТ700 с моноклональными антителами ADV 34/2 к гликопротеину gB ВБА. Осуществлен подбор оптимальных условий для проведения конъюгации. Показано, что оптимальными соотношениями антитела:КТ и КТ:EDC являются 10:1 и 1:2000, соответственно. Показано, что ковалентная иммобилизация антител на КТ приводит к уменьшению КВ КТ почти в 2 раза. Изучена взаимосвязь интенсивности сигнала тестовой зоны от pH при проведении конъюгации и выбраны оптимальные условия для проведения ориентированной иммобилизации антител на поверхности КТ. Показано, что использование буферного раствора MES с pH = 5 увеличивает сигнал тестовой линии почти в 2 раза. На основании экспериментальных и литературных данных предложено объяснение влияния различных факторов на иммунную активность антител, связанных с поверхностью КТ.

4. Разработан способ определения КТ и их конъюгатов с белками методами КЗЭ, ВЭЖХ и эксклюзионной хроматографии. Осуществлен выбор оптимальных условий для проведения разделения компонентов системы. Показано, что хорошее разделение компонентов достигается при следующих условиях и параметрах проведения анализа: а) для КЗЭ — рабочий электролит – 50 мМ боратный буферный раствор, pH 9,2, напряжение: +30 кВ; детектирование при длине волны 210 нм; б) для ВЭЖХ — изократический режим элюирования, ПФ: 33,5 мМ фосфатный буфер с добавление 0,1% ДДСН, НФ: сферические частицы кремнезема, модифицированные цирконием с гидрофильной диольной привитой фазой, скорость потока 3 мл/мин, объем инжекции 1 мкл, детектирование при длине волны 210 нм. Полученные данные указывают на перспективность применения КЗЭ, ВЭЖХ и эксклюзионной хроматографии для характеризации и разделения КТ и их конъюгатов. При этом метод КЗЭ является наиболее простым, быстрым и эффективным методом анализа КТ и конъюгатов.

5. Разработана иммунохроматографическая тест-система с использованием в качестве меток КТ, флуоресцирующих в БлИК области спектра. Показано, что максимальное отношение аналитический сигнал/фон наблюдается при длинах волн 700–750 нм. Подобраны оптимальные условия для регистрации сигнала конъюгатов КТ с антителами с тест-полоски и разработан портативный флуоресцентный ридер для проведения количественного ИХА с использованием в качестве меток КТ. Установлено, что оптимальная концентрация конъюгатов КТ700–Антитело на тестовой линии должна лежать в области 0,003 до 0,5 мкМ, при этом оптимальной концентрацией наносимого конъюгата на тест-полоску является 2,7 мкМ. Показана возможность проведения количественного ИХА с использованием флуоресцентного ридера и установлены предел обнаружения и минимальная определяемая концентрация модельного ВБА, равные 0,15 нг/мл и 0,5–1,0 нг/мл, соответственно. Определены аналитические характеристики тест-системы и проведено сравнение полученных характеристик с другими тест-системами на определение ВБА. Показано, что использование КТ в качестве меток уменьшает предел обнаружения и не уступает в специфичности и чувствительности другим методам ИХА и ИФА.

Публикации

1. Gribova E.D., **Novikova S.A.**, Mukhina I.V. A highly efficient capillary electrophoresis-based method for determination of water-soluble CdTe, CdTe/ZnS, and multilayer CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS quantum dots // Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics. – 2025. — V.4. — № 16.
2. Troshkina N.N., **Novikova S.A.,** Nasirov P.D., Volobueva M.U., Mukhina I.V., Popova A.A., Gribova E.D. Investigation of the optical properties of quantum dots depending on the nature and number of additional semiconductor layers // St. Petersburg Polytechnic University Journal: Physics and Mathematics. – 2022. – V. 15. – № 3.3. – P. 106–110.
3. Sidorov E. A., Kriger V. V., Nasirov P. D., **Novikova S. A.,** Gribova E. D., Gladyshev P. P. Study of quantum dots conjugation with antibodies to be used in a lateral flow immunochromatographic assay // St. Petersburg Polytechnic University Journal: Physics and Mathematics. – 2022. – V. 15. –№ 3.2. – P. 331–335.
4. Gladyshev P.P., Tumanov Yu.V., **Ibragimova (Novikova) S.A.,** Kouznetsov V.V., Gribova E.D. Quantum dots in proteomic studies and medical diagnostics // Russian Chemical Bulletin. – 2018. – V. 67. – № 4. – P. 600–613.
5. Dezhurov S.V., Krylsky D.V., Rybakova A.V., **Ibragimova (Novikova) S.A.,** Gladyshev P.P., Vasiliev A.A., Morenkov O.S. One-pot synthesis of polythiol ligand for highly bright and stable hydrophilic quantum dots toward bioconjugate formation //Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology. – 2017. – V. 9. – № 1. – P. 015002.
6. Vrublevskaya V.V., Afanasyev V.N., Grinevich A.A., Skarga Y.Y., Gladyshev P.P., **Ibragimova (Novikova) S.A.,** Krylsky D.V., Dezhurov S.V., Morenkov O.S. A sensitive and specific lateral flow assay for rapid detection of antibodies against glycoprotein B of Aujeszky's disease virus //Journal of virological methods. – 2017. – V. 249. – P. 175–180.
7. Vrublevskaya V.V., Afanasyev V. N., Grinevich A. A., Skarga Yu. Y., Gladyshev P. P., **Ibragimova (Novikova) S. A.,** Morenkov O. S. Development of a competitive double antibody lateral

flow assay for the detection of antibodies specific to glycoprotein B of Aujeszky's disease virus in swine sera //Journal of virological methods. – 2017. – V. 240. – P. 54–62.

8. **Novikova S. A.,** Gribova E. D., Andreev E. V., Gladyshev P. P., Kalganova N. V., Ibrahim M. A. Colloidal Synthesis and Characterization of Hydrophilic CdTe Quantum Dots for Medical Diagnostics //Egyptian Journal of Chemistry. – 2019. – V. 62(1). – P. 77–88.

Патенты

1. Способ создания аналитической метки на основе многослойных халькогенидных квантовых точек, покрытых полимером, с полноразмерными антителами. Гладышев П.П., Грибова Е.Д., **Новикова С.А**., Мухина И.В., Сидоров Е.А. Патент на изобретение RU 2826502 C1, 11.09.2024. Заявка № 2023111733 от 05.05.2023.

2. Способ получения коллоидных квантовых точек для применения в медицинской диагностике. Попова А.А., Андреев Е.В., Рудных С.К., **Новикова С.А.,** Грибова Е.Д., Гладышев П.П., Сергеев С.Н., Сидоров Е.А. Патент на изобретение RU 2809097 C1, 06.12.2023. Заявка № 2022129956 от 17.11.2022.

3. Способ изготовления калибровочных образцов для поверки флуоресцентного ридера. Гладышев П.П., **Новикова С.А.**, Грибова Е.Д., Мухина И.В., Насиров П.Д. Патент на изобретение №2829076. Дата регистрации: 23.10.2024 г.

4. Программное обеспечение прибора флуоресцентного ридера для считывания сигнала тестовой зоны полоски и вывода результата анализа в полностью автоматическом режиме. **Новикова С.А**., Шириков И.В., Насиров П.Д., Егоров Д.С., Кузьмин В.С., Гладышев П.П. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ RU 2022611585, 27.01.2022. Заявка № 2022610698 от 24.01.2022.

5. Одноразовая кассета-ротор для микроцентрифугирования. Гладышев П.П., Крайнова Е.А., **Ибрагимова (Новикова) С.А**., Ковригин И.М., Моржухин А.М., Мороз В.В. Патент на полезную модель RU 168470 U1, 06.02.2017. Заявка № 2015153078 от 10.12.2015.

6. Устройство микродозирования опасных биологических жидкостей, исключающее контаминацию опасных инфекций. Гладышев П.П., Крайнова Е.А., **Ибрагимова (Новикова) С.А.,** Ковригин И.М., Моржухин А.М., Мороз В.В. Патент на изобретение RU 2640120 C, 26.12.2017. Заявка № 2015153077 от 10.12.2015.

Список цитируемой литературы

1. Олейников В.А., Суханова А.В., Набиев И.Р. Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы в биологии и медицине // Российские нанотехнологии. — 2007. — Т. 2. — №1. — С. 160—173.
2. Smith A.M., Nie S. Semiconductor nanocrystals: structure, properties, and band gap engineering // Accounts of chemical research. — 2009. — V. 43. — №2. — P. 190-200.
3. Petryayeva E., Algar W. R., Medintz I. L. Quantum dots in bioanalysis: a review of applications across various platforms for fluorescence spectroscopy and imaging // Applied spectroscopy — 2013. — V. 67. — P. 215—252.
4. Egorov A.M., Osipov A.P., Dzantiev B.B., Gavrilov E.M. Theory and practice of immunoassay // M.: High School. – 1991. – 288 p.
5. Piven N.V., Burakovski A.I. Modern trends in immunochemical analysis: express methods // Immunopathology, allergology, infectology. — 2012. – V.3. — P.6-12.
6. Koivunen M.E., Krogsrud R.L. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories // Lab Medicine. — 2006. – V. 37. — №8. — P. 490-497.
7. Bai Y., Tian C., Wei X., Wang Y., Wanga D., Shi X. A sensitive lateral flow test strip based on silica nanoparticle/CdTe quantum dot composite reporter probes // RSC Adv. — 2012. — V. 2. – P. 1778–1781.
8. Taranova N. A. et al. Comparative characteristics of nanodisperse labels for immunochromatographic test systems //Nano Hybrids and Composites. – 2017. – V. 13. – P. 32-38.
9. Taranova N. A. et al. ‘Traffic light’immunochromatographic test based on multicolor quantum dots for the simultaneous detection of several antibiotics in milk // Biosensors and Bioelectronics. – 2015. – V. 63. – P. 255-261.
10. Mettenleiter T.C. Aujeszky’s disease and the development of the marker/DIVA vaccination concept // Pathogens. — 2020. — V. 9. — №7. — P. 563.
11. Сагдеев Д. О., Шамилов Р. Р., Воронкова В. К., Суханов А. А., Галяметдинов Ю. Г. Коллоидный синтез и характеризация парамагнитных квантовых точек Mn:CdSe в водной среде // Вестник технологического университета. — 2016. — Т.19. — №14. — С. 36-38.
12. Vrublevskaya V.V. at al. A sensitive and specific lateral flow assay for rapid detection of antibodies against glycoprotein B of Aujeszky's disease virus //Journal of virological methods. — 2017. — V. 249. — P. 175-180.
13. Silva-Junior L. C. et al. Development of a DIVA ELISA for diagnosis of Aujeszky's disease using recombinant gE fused to thioredoxin as antigen // The Veterinary Journal. — 2020. — V. 257. — P. 105448.
14. [Электронный ресурс]. URL: https://www.rapidlabs.co.uk/product/porcine-pseudorabies-gb-antibody-rapid-test/ (дата обращения: 25.02.2024).