

УДК 541.182.024

О. Н. ВРУБЛЕВСКАЯ<sup>1</sup>, Т. Н. ВОРОБЬЕВА<sup>1, 2</sup>,  
А. М. МАЛЫТАНОВА<sup>2</sup>, В. А. ЛАЗАРЧИК<sup>2</sup>, Т. С. ЕРМАКОВА<sup>3</sup>

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОНО- И БИМЕТАЛЛИЧЕСКИХ ЗОЛЕЙ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА В ИММУНОАНАЛИЗЕ

<sup>1</sup>НИИ физико-химических проблем

Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

<sup>3</sup>ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии  
и микробиологии», Минск, Беларусь

Разработаны методики получения и конъюгирования наночастиц золота, серебра, биметаллических наночастиц Au–Ag(сплав) и Au(ядро)–Ag(оболочка), а также композитных наночастиц Au–SnO<sub>2</sub> биополимерами (кроличьи антитела (АТ) против иммуноглобулинов, шигеллезные и сальмонеллезные АТ). Установлено, что биоконъюгирование приводит к увеличению размеров частиц на 2–3 нм, к уширению и смещению положения пиков поглощения в спектрах золей в длинноволновую область на 3–5 нм в случае металлических и 20–25 нм в случае биметаллических и композитных золей. Разработаны методики качественного экспрессного выявления с использованием золей золота антигенов *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* с чувствительностью определения (2–8)·10<sup>2</sup> КОЕ, а также дифтерийного анатоксина с минимальной определяемой концентрацией 2 нг/см<sup>3</sup> (дот-блот анализ). Разработан дот-блот метод выявления антигенов *Salmonella enteritidis* с использованием золей серебра, чувствительность метода составляет 10<sup>3</sup> КОЕ. Разработан спектрофотометрический метод количественного определения специфических АТ с использованием биоконъюгированных наночастиц золота или серебра.

The methods of synthesis and conjugating of gold, silver, bimetal Au–Ag alloy or Au (core) – Ag (shell) nanoparticles and hybrid Au–SnO<sub>2</sub> nanoparticles with different proteins such as the rabbit's antibodies (AB) against immunoglobulines, Shigella's and Salmonella's AB have been developed. It was revealed that bioconjugation caused an increase in the particles size for 2–3 nm, the broadening and shift of the adsorption peaks in sols spectra to the long-wave side for 3–5 nm in case of metal sols and for 20–25 nm in case of bimetal and hybrid ones. The methods of qualitative express detection of *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* antigens with the sensitivity of (2–8)·10<sup>2</sup> CFU and also of diphtheria anatoxin with the minimal detectable concentration of 2 ng/cm<sup>3</sup> based on the usage of gold sols (dot-blot analysis) have been worked out. Spectrophotometric method of quantitative detection of specific AB with the usage of bioconjugated gold or silver nanoparticles has been suggested.

**Ключевые слова:** наночастицы, золото, серебро, диоксид олова, конъюгирование, антитела, антигены, спектрофотометрический и дот-блот анализ.

**Keywords:** nanoparticles, gold, silver, tin dioxide, conjugating, antibodies, antigens, spectrophotometric and dot-blot analysis.

Данная работа является продолжением многолетних исследований, проводимых в НИИ ФХП БГУ в области синтеза и поиска новых практических приложений нанодисперсных частиц золота и серебра. Ранее были опубликованы статьи, в том числе и обзорного характера [1, 2, 3], посвященные синтезу наночастиц золота, серебра, биметаллических частиц Au–Ag [4], наночастиц этих металлов в оксидных матрицах [5], выявлению способов стабилизации золей и исследованию их спектральных характеристик [6, 7]. Найден ряд оригинальных практических приложений наночастиц металлов в качестве люминофоров, регистрирующих сред, препаратов, обладающих бактерицидными и фунгицидными свойствами.

Накопленный опыт синтеза золей золота, серебра, а также биметаллов Au–Ag использован авторским коллективом данной статьи для модифицирования известных и разработки новых способов получения золей, стабилизированных полимерами. В статье рассмотрены итоги исследования методов синтеза, свойств золей золота и серебра, а также биметаллов Au–Ag, композитов Au–SnO<sub>2</sub>, обеспечивающих возможность их применения в качестве маркеров в иммунохимическом анализе, основанном на биоспецифических реакциях типа антиген (АГ) – антитело (АТ), и, кроме того, приведены разработанные методики тестирования.

### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ ПАТОГЕНОВ

Экспрессное выявление инфекционных агентов, вызывающих различные заболевания человека, – одна из важнейших задач современной медицинской диагностики. Быстрое обнаружение возбудителей заболеваний, локализованных в биологическом материале больного, – залог правильно подобранного лечения, а при возникновении эпидемических ситуаций – способ своевременного выявления зараженных и, следовательно, инструмент, позволяющий своевременно предпринять меры, препятствующие распространению заболеваний.

Различают прямые и непрямые методы диагностики патогенов. Прямые методы основаны на выявлении патогена путем выделения фрагмента возбудителя (наследственный материал, АГ) или путем культурального посева для обнаружения патогенов на искусственных питательных средах. К прямым методам относят *бактериологический анализ, микроскопию и иммунофлуоресценцию, методы ДНК-диагностики* (амплификационные и гибридизационные технологии).

Принцип диагностики с использованием непрямых методов заключается в анализе гуморального иммунного ответа организма на присутствие патогена. Этот ответ – результат функционирования В-лимфоцитов, которые, «распознав» микроорганизм, активно синтезируют АТ по принципу один тип АГ – один тип АТ. Практически все методы исследования гуморального иммунного ответа основаны на реализации специфической реакции АГ – АТ [8–10].

Реакции АГ – АТ проводят как в жидкой среде, так и на твердых подложках, поэтому различают жидкофазные и твердофазные методы иммуноанализа. На ранних этапах развития иммуноанализа основное внимание уделялось разработке жидкофазных методик. Препятствием для развития таких методик является то, что далеко не все АГ растворимы в воде. Ряд АГ переводят в растворимое состояние, используя специальные добавки, например мочевины, додецилсульфат натрия, гуанидий хлорид, которые препятствуют образованию иммунных комплексов и, следовательно, затрудняют проведение анализа [11]. Использование твердофазных методов иммуноанализа, реализуемых на полимерных подложках, таких как нитроцеллюлоза, ацетатцеллюлоза, полистирол и др., позволяет решить возникающие при жидкофазном анализе проблемы.

В качестве маркеров (меток) в твердофазных методах исследования используют радиоактивные изотопы ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ), флуоресцирующие и люминесцирующие вещества, ферменты (пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и др.). Факторами, ограничивающими проведение иммуноанализа с использованием радиоактивных изотопов, являются сложность и высокая стоимость оборудования, необходимость централизованной системы распределения иммунохимических наборов, меченных радиоактивными изотопами, определенная опасность изотопов для окружающей среды. Для проведения иммунофлуоресцентного и иммунолюминесцентного анализа требуется высококвалифицированный персонал и специальное оборудование. В последнее время кроме вышечисленных маркеров используют мечение АТ коллоидным золотом, серебром [12–14] и частицами углерода [15]. Использование в твердофазном анализе наночастиц металлов основано на возможности визуально наблюдать изменение цвета маркера при взаимодействии АТ, меченых наночастицами золота или серебра, с соответствующим АГ (прямое мечение) или с биокомплексом АГ – АТ (непрямое мечение).

Основополагающей работой для создания иммунохимических маркеров на основе коллоидных растворов золота послужила работа [16], в которой была проведена адсорбция кроличьих АТ против иммуноглобулинов на золотых наночастицах для выявления АГ *Salmonella*.

Водные коллоидные растворы (золи) благородных металлов, используемые для создания иммунохимических маркеров, являются типичными гидрофобными системами, частицы которых имеют отрицательный заряд, обусловленный потенциал-определяющими ионами. В гидрофобных системах дисперсная фаза и дисперсионная среда сильно различаются по составу и строению, что проявляется в нескомпенсированности поверхностных сил на межфазной границе, т. е. такие системы термодинамически неустойчивы. Для стабилизации гидрофобных систем используют ди-, трикарбоновые кислоты, аминокислоты, трифенилфосфин и его производные, тиолы, ПАВ или высокомолекулярные соединения (белки, полисахариды и др.). Вещества-стабилизаторы обеспечивают снижение межфазного натяжения на границе частица – раствор, способствуя гидрофиллизации частиц [3, 7, 12–14, 16, 17].

С целью приготовления золотых (серебряных) маркеров для иммуноанализа применяют высокомолекулярные вещества-стабилизаторы. Эффективность стабилизации биополимерами зависит от их растворимости в дисперсионной среде и способности гидрофобных частиц адсорбировать биополимер на своей поверхности, а также от степени заполнения поверхности частиц коллоидной системы биополимером. Биополимеры на поверхности частиц адсорбируются в результате электростатического взаимодействия (ион-ионного или ион-дипольного) между ионами, расположенными в адсорбционном слое частицы, и полимерными молекулами, вводимыми в раствор для стабилизации. Возможно также вандерваальсово взаимодействие, образование водородных или донорно-акцепторных связей (донорами электронов являются amino- и серосодержащие группы биополимеров). Биомолекулы, адсорбированные на поверхности наночастиц, не теряют своей способности вступать в биоспецифические реакции. Так при взаимодействии белковых молекул, конъюгированных на наночастицах, со своими биоспецифическими парами (АГ – АТ, авидин–биотин, фермент–субстрат и т. д.) формируется вторичная биополимерная оболочка. Ее образование приводит к изменению цвета золя [12–14, 16–20].

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ БИОМАРКЕРОВ

Золотые или серебряные маркеры для иммуноанализа получают на основе коллоидных растворов золота и серебра с размерами частиц от 4 до 80 нм, стабилизированных биополимерами [17]. Золи золота, предназначенные для последующего биоконъюгирования, синтезируют по известным методикам [16–20] путем восстановления Au(III) из золотохлористоводородной кислоты (или соответствующей натриевой или калиевой соли) борогидридом или цитратом натрия. Маркеры для иммуноанализа готовят путем прямого или непрямого мечения АТ частицами коллоидной системы. В варианте прямого мечения золи стабилизируют путем введения в коллоидный раствор сывороточных АТ против определенных АГ. В варианте непрямого мечения в коллоидные растворы металлов вносят сыворотку антивидовых АТ, например кроличьих поликлональных АТ против иммуноглобулинов человека, и лишь затем проводят вторичную стабилизацию наночастиц введением в золь сывороточных АТ против конкретных АГ (рис. 1).

Оценку минимального количества биополимера, необходимого для полной стабилизации золя, проводят, анализируя спектры его поглощения до и после введения в раствор биополимера, поскольку форма и положение полосы поглощения золя в видимой области зависят от размера частиц, их поли- или монодисперсности [21]. Минимальную концентрацию конъюгата, необходимую для стабилизации золя золота, традиционно оценивают по изменению оптической плотности либо при 580 нм, либо в максимуме пика поглощения в результате добавления раствора NaCl до конечной концентрации 1 % (рис. 2).

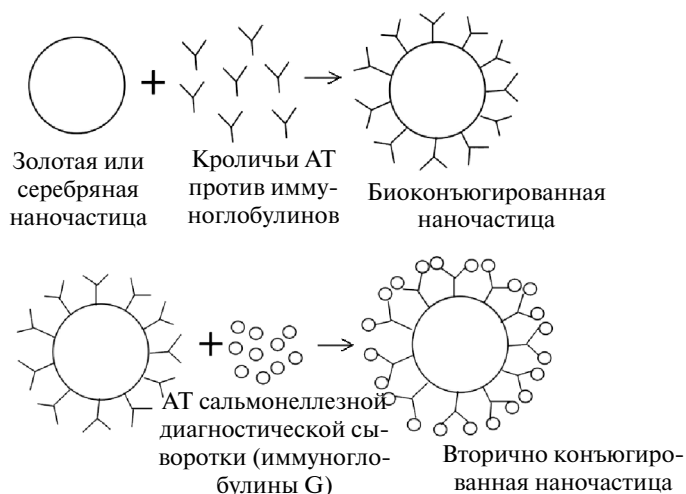


Рис. 1. Схема непрямого мечения металлических наночастиц биополимерами

Интенсивность поглощения перестает изменяться при достижении полной стабилизации золя [12, 22].

Авторами данной статьи предложена другая оценка стабилизации золя биополимером по изменению площади полосы поглощения в области 600–700 нм

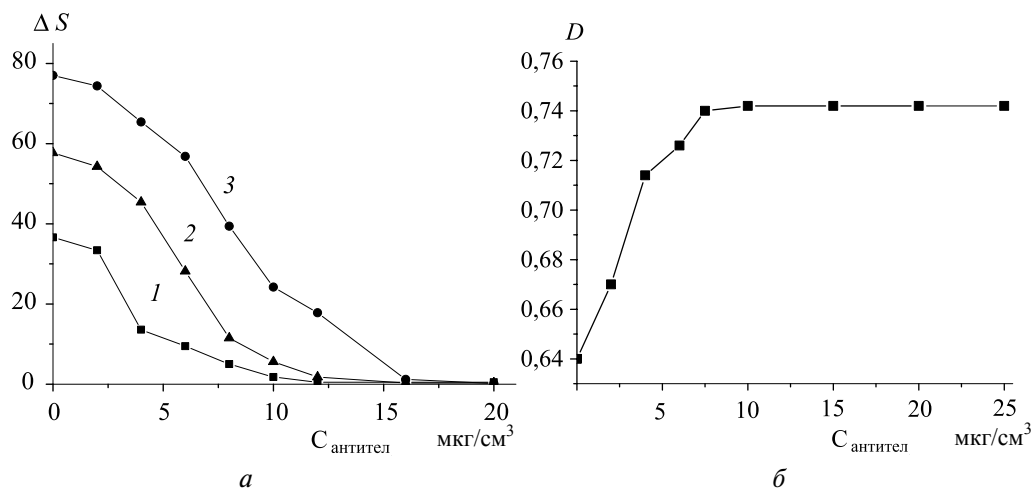


Рис. 2. Влияние концентрации кроличьих поликлональных АТ против иммуноглобулинов человека на стабильность золя золота:  
а – оценка по изменению площади полосы поглощения золя в области спектра 600–700 нм после добавления NaCl, кривые 1, 2, 3 соответствуют золям со средним размером частиц 4, 10 и 20 нм соответственно;  
б – оценка по изменению оптической плотности в максимуме поглощения после добавления NaCl к золю золота со средним размером частиц 4 нм

в случае золей золота [23] или 500–600 нм в случае золей серебра [24]. Если концентрация биополимера в золе достаточна для его стабилизации, спектр золя в этой области в результате добавления NaCl не меняется. Например, из данных рис. 2, а, следует, что для стабилизации золей золота с размерами частиц 4, 10 и 20 нм достаточным является добавление кроличьих поликлональных АТ против иммуноглобулинов человека до концентрации 12, 16 и 20 мкг/см<sup>3</sup> соответственно [23]. Традиционный метод оценки стабильности золя по интенсивности пика поглощения в случае этого же золя дает сходный результат (см. рис. 2, б) [25], однако он менее точен в случае размытых пиков.

### СИНТЕЗ И СВОЙСТВА КОНЬЮГИРОВАННЫХ БИОПОЛИМЕРАМИ НАНОЧАСТИЦ

Золи золота получали восстановлением тетрахлороаурат-ионов борогидрид-, цитрат-, тартрат-ионами в присутствии избытка цитрат-ионов для стабилизации коллоидных частиц при разных концентрациях и соотношениях компонентов и различных рН растворов, что позволило варьировать средние размеры частиц и степень их монодисперсности [24–27]. Биметаллические наночастицы, представляющие собой сплав Au–Ag, синтезировали путем совместного восстановления Au(III) и Ag(I) борогидридом натрия в присутствии цитрата натрия [28]. Наночастицы состава Au(ядро)–Ag(оболочка) получали восстановлением Ag(I) цитратом натрия на предварительно синтезированных наночастицах золота со средним диаметром 4 нм [28].

Физико-химические свойства золей серебра и золота с наночастицами разных размеров, с наночастицами первично конъюгированными кроличьими поликлональными АТ против иммуноглобулинов человека и вторично конъюгированными – антителами сальмонеллезной сыворотки приведены в табл. 1. Данные свидетельствуют, что с увеличением размеров наночастиц золота максимум поглощения сдвигается в длинноволновую область. Так, при увеличении диаметра частиц от 4 до 20 нм максимум поглощения смещается от 512 до 524 нм. При этом наблюдается уменьшение  $\xi$ - потенциала по абсолютной величине (от –69 до –46 мВ) и возрастает концентрация АТ, необходимая для стабилизации золя золота (от 12 до 20 мкг/см<sup>3</sup>).

Первичная адсорбция на поверхности наночастиц золота и серебра кроличьих АТ против иммуноглобулинов, а также вторичная адсорбция биополимеров – специфических АТ против определенных АГ – независимо от исходных размеров частиц приводят к увеличению среднего диаметра частиц на 2–9 нм (см. табл. 1, рис. 3), смещению максимума поглощения в спектрах в длинноволновую область на 3–12 нм, увеличению оптической плотности в максимуме поглощения на 17–19 % (см. рис. 2, б), а также к уменьшению абсолютного значения  $\xi$ - потенциала на 16–29 мВ. Смещение максимума поглощения в длинноволновую область и его уширение – свидетельство адсорбции биополимеров на поверхности наночастиц, приводящей к увеличению их размеров.

Сдвиг значений  $\xi$ -потенциала в менее отрицательную область происходит в результате образования не только водородных связей, но также ион-ионного и диполь-ионного взаимодействия молекул белка (кроличьих поликлональных АТ) с коллоидными частицами в процессе биоконъюгирования.

Таблица 1

**Характеристики золей золота, серебра, биметаллических золей Au–Ag, конъюгированных кроличьими АТ против иммуноглобулинов\*, вторично конъюгированных иммуноглобулинами сальмонеллезной диагностической сыворотки (концентрация 90 мкг/см<sup>3</sup> золя)\*\* [23, 24, 26, 27]**

Золь	Средний диаметр частиц, нм	Положение максимума поглощения, нм	$\xi$ -потенциал, мВ	Концентрация кроличьих поликлональных АТ, достаточная для полной стабилизации золя, мкг/см <sup>3</sup>
Au	4 ± 2	512	-69 ± 3	12
Au*	6 ± 2	515	-44 ± 2	
Au**	9 ± 3	517		
Au	10 ± 2	520	-61 ± 3	16
Au*	15 ± 5	522	-33 ± 3	
Au**	19 ± 5	524		
Au	20 ± 5	524	-46 ± 3	20
Au*	24 ± 6	525	-30 ± 3	
Au**	29 ± 6	527		
Ag	11 ± 3	390	-46 ± 3	16
Ag*	14 ± 4	397	-17 ± 3	
Ag**	18 ± 3	402		
Au–Ag	6,0 ± 2	506	-57 ± 2	14
Au–Ag*	9 ± 3	516	-46 ± 2	
Au–Ag**	11 ± 3	526		
Au (ядро) – Ag(оболочка)	5,5 ± 2	493	-54 ± 3	18
Au (ядро) – Ag(оболочка)*	8 ± 2	505	-34 ± 2	
Au (ядро) – Ag(оболочка)**	11 ± 3	518		

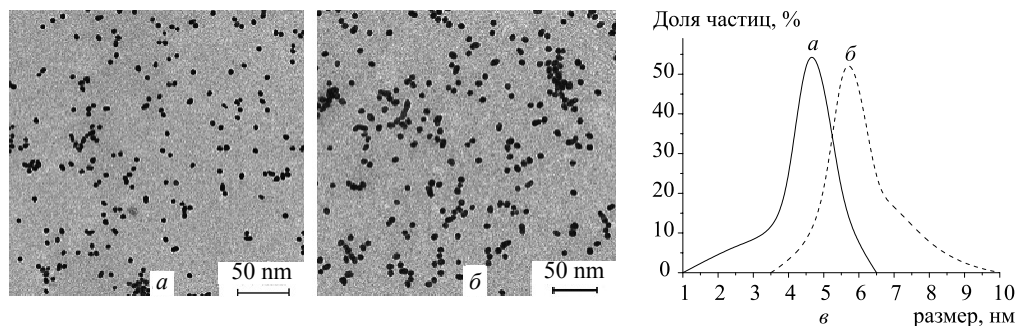


Рис. 3. ПЭМ-фотографии наночастиц золота:

*a* – неконъюгированные ( $d_{\text{ср}} = 4$  нм); *б* – конъюгированные кроличьими поликлональными АТ против иммуноглобулинов человека ( $d_{\text{ср}} = 6$  нм); *в* – кривые распределения частиц по размерам, соответствующие *a* и *б*

Установлено (см. табл. 1), что вне зависимости от структуры биметаллических наночастиц их первичное и вторичное конъюгирование АТ в совокупности приводит, как и в случае монометаллических золей золота и серебра, к увеличению размеров частиц на 5–6 нм (по 2–3 нм за каждый этап).

Методом фотокаталитического восстановления Au(III) на наночастицах SnO<sub>2</sub> получали стабильные золи с композитными наночастицами Au–SnO<sub>2</sub> [29]. Синтез частиц металл – оксид включал две стадии. На первой стадии проводили контролируемый щелочной гидролиз SnCl<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O в растворе аммиака для получения гидратированного золя SnO<sub>2</sub> · nH<sub>2</sub>O. Полученный осадок отделяли от раствора центрифугированием, после чего проводили диализ. Средний диаметр частиц SnO<sub>2</sub> в золе составлял 2 нм. На второй стадии для восстановления золота(III) на наночастицах SnO<sub>2</sub> растворы, содержащие одновременно золотохлористоводородную кислоту (в концентрации от  $2 \cdot 10^{-4}$  до  $8 \cdot 10^{-4}$  моль/дм<sup>3</sup>) и наночастицы оксида олова(IV) ( $2 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup>), облучали ультрафиолетовым излучением ртутно-кварцевой лампы в течение 20 мин при постоянном перемешивании и при использовании в качестве вещества-стабилизатора триполифосфата натрия.

Средние диаметры частиц в металл-оксидном золе в зависимости от исходной концентрации HAuCl<sub>4</sub> уменьшаются с ростом концентрации HAuCl<sub>4</sub> в пределах от 6 до 3 нм (табл. 2). Соответственно, максимум в спектре поглощения сдвигается в область меньших длин волн от 530 до 514 нм. С ростом концентрации HAuCl<sub>4</sub> частицы золя золота становятся более монодисперсными. Важно подчеркнуть, что спектр поглощения облученного раствора соли золота в отсутствие SnO<sub>2</sub> принципиально отличается от спектра поглощения золей Au–SnO<sub>2</sub>: он смещен в длинноволновую область и размыт. Методами рентгенографии и электронографии установлено, что оксид олова(IV), составляющий ядро металл-оксидной частицы, рентгеноаморфен, но оболочка частицы представляет собой нанокристаллическое золото (рис. 4) [29].



Таблица 2

**Характеристики композиционных золей Au–SnO<sub>2</sub>**

№ образца золя Au–SnO <sub>2</sub>	[Au <sup>3+</sup> ], моль/дм <sup>3</sup>	Пределы размеров частиц, нм	Средние диаметры частиц, нм	Положение максимума поглощения, нм	ξ-потенциал, мВ	Концентрация кроличьих антител, достаточная для стабилизации, мкг/см <sup>3</sup>
I	2 · 10 <sup>-4</sup>	2–35	6	530	–49	24
II	4 · 10 <sup>-4</sup>	2–10	3	522	–57	38
III	6 · 10 <sup>-4</sup>	2–10	3	518	–61	54
IV	8 · 10 <sup>-4</sup>	3–4	3	514	–69	64

Таблица 3

**Межплоскостные расстояния в кристаллической решетке золота**

Экспериментальные данные, Å	Справочные данные, Å
2,40	2,35
2,09	2,04
1,47	1,44
1,19	1,23
0,93	0,94
0,84	0,83

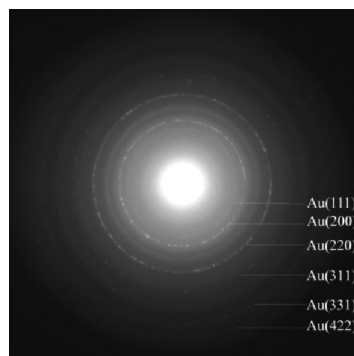


Рис. 4. Электронограмма частиц Au–SnO<sub>2</sub>

Первичное конъюгирование частиц проводили кроличьими АТ шигеллезной диагностической сыворотки (производство «Бипрепарат»). В зависимости от размеров частиц в золе концентрация АТ, необходимая для стабилизации, составляла 24–64 мкг/см<sup>3</sup>. По сравнению с золями индивидуального золота (см. табл. 1) золи Au–SnO<sub>2</sub> значительно более концентрированы по золоту (в 2, 4, 6, 8 раз в случае золей I, II, III, IV). Этот факт, а также использование триполифосфата в качестве стабилизатора могут быть причиной наблюдаемых завышенных значений концентрации поликлональных АТ против иммуноглобулинов, необходимой для полной стабилизации. Отметим, что если золь Au–SnO<sub>2</sub> разбавить до концентрации золей индивидуального золота, необходимая для стабилизации концентрация раствора АТ снижается до 8–9 мкг/дм<sup>3</sup>.

Конъюгирование АТ наночастиц Au–SnO<sub>2</sub> приводит к смещению максимумов поглощения в длинноволновую область на 1–5 нм, увеличению оптической плотности в максимуме поглощения на 5–20 % в зависимости от исходной концентрации HАuCl<sub>4</sub>. Изменения более заметны в случае золя IV с наименьшими частицами.

## ИММУНОАНАЛИЗ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ И ДИФТЕРИЙНОГО ТОКСИНА

Разработку тест-систем, пригодных для иммуноанализа и основанных на использовании коллоидных растворов золота и серебра, проводили по нескольким направлениям – приготовление золотых, серебряных, биметаллических маркеров, а также маркеров на основе системы металл–оксид ( $\text{SnO}_2\text{–Au}$ ) методами прямого и непрямого мечения для выявления возбудителей кишечных инфекций, таких как О-антигены сальмонелл, антигены *Shigella flexneri* и *Shigella sonnei*. Кроме того, разрабатывали тест-систему для твердофазного иммуноанализа для выявления возбудителя дифтерии – дифтерийного токсина. В качестве подложек для твердофазного анализа использовали нитроцеллюлозные мембраны фирмы Миллипор США с диаметром пор 0,22 мкм.

Перечисленные исследования по разработке тест-систем были проведены совместно с сотрудниками ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» МЗ Республики Беларусь (см. совместные публикации [23, 26, 27, 30]).

Для определения возможности и конкретных условий тестирования возбудителей кишечных инфекций (антигенов *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*) с помощью коллоидного золота методами прямого и непрямого твердофазного иммуноанализа были проведены следующие исследования.

Для прямого иммуноанализа готовили золи золота или  $\text{Au–SnO}_2$  со средними размерами частиц от 4 до 20 нм [29, 30]. Для биоконъюгирования использовали шигеллезные АТ (коммерческие кроличьи агглютинирующие поливалентные шигеллезной диагностической сыворотки); тестировали микробную суспензию, содержащую штаммы *Shigella flexneri* или *Shigella sonnei* в объеме  $2 \cdot 10^{-3}$  см<sup>3</sup> (с концентрацией микробных клеток от  $10^2$  до  $10^9$  КОЕ). Микробную суспензию наносили на нитроцеллюлозную мембрану – подложку для проведения твердофазного анализа, выдерживали в течение 20–30 мин при комнатной температуре. Затем мембрану отмывали в фосфатном буфере и обрабатывали в 1 % растворе бычьего сывороточного альбумина для блокирования сайтов неспецифической адсорбции в соответствии с рекомендациями [12–15]. После промывки мембраны в дистиллированной воде и ее обработки золем золота, биконъюгированного шигеллезными АТ, на мембране появлялось пятно интенсивного красного цвета, являвшееся результатом взаимодействия АГ с АТ непосредственно на подложке, в результате которого происходило укрупнение наночастиц.

Для непрямого иммуноанализа готовили коллоидные растворы золота с размерами частиц от 4 до 20 нм, конъюгированные кроличьими поликлональными АТ против иммуноглобулинов человека. Для проведения твердофазного тестирования на нитроцеллюлозную мембрану наносили суспензию, содержащую АГ *Shigella flexneri* или *Shigella sonnei*. Затем мембрану выдерживали в течение часа в растворе сыворотки АТ коммерческих кроличьих агглютиниру-

ющих поливалентных к *Shigella flexneri* или *Shigella sonnei* для осуществления реакции АТ – АГ, обусловленной пространственной комплементарностью соответствующих АТ и АГ. Полученный на нитроцеллюлозной мембране иммунный комплекс АТ – АГ обрабатывали золом золота, конъюгированным кроличьими поликлональными антителами, что приводило к появлению красного пятна. Изменение окраски мембраны в данном случае обусловлено неспецифическим связыванием комплекса АТ – АГ с поликлональными антителами, приводящим к укрупнению частиц золя [23, 25, 30].

Экспериментально показано, что чувствительность твердофазного тестирования АГ *Shigella flexneri* и *Shigella sonnei* не зависит от исходных размеров частиц золота в золе в пределах 4–20 нм. Из сравнения результатов прямого и непрямого иммуноанализа установлено, что метод непрямого мечения комплекса АТ – АГ характеризуется несколько большей чувствительностью и скоростью проведения анализа. Так, в случае непрямого и прямого методов анализа с использованием наночастиц золота предел обнаружения микробных клеток составляет  $2 \cdot 10^2$  и  $8 \cdot 10^2$  КОЕ соответственно. Для прямого дот-блот анализа с использованием композиционных частиц Au–SnO<sub>2</sub> предел обнаружения составляет  $6 \cdot 10^2$  КОЕ. Известно, что чувствительность иммуноферментного метода анализа (ELISA) в выявлении антигенов *Shigella sonnei* и *Shigella flexneri* составляет  $10^4$ – $10^5$  КОЕ, т. е. значительно хуже, чем в случае применения разработанного авторами метода.

Для оценки возможности и условий использования наночастиц золота в иммуноанализе методом агглютинации (метод основан на образовании хлопьевидного осадка, формирующегося при взаимодействии специфических АТ с АГ) изучали устойчивость золотых золь, конъюгированных иммуноглобулинами шигеллезной диагностической сыворотки, по отношению к агрегации в присутствии АГ *Shigella sonnei*. К определенному количеству золя золота (со средним диаметром частиц от 4 до 20 нм) добавляли раствор культуры микробной суспензии с различным разбавлением ( $9 \cdot 10^8$  КОЕ – до разбавления). По результатам анализа установлено, что наибольшей чувствительностью при проведении иммуноанализа методом агглютинации характеризуется золь золота с размерами частиц 20 нм. Минимальная определяемая концентрация микробных клеток составляет  $2 \cdot 10^8$  КОЕ. В тестовом эксперименте было установлено, что реакция агглютинации между АГ и АТ в отсутствие наночастиц золота осуществляется при концентрации микробных клеток, равной  $1,8 \cdot 10^9$  КОЕ [30].

Маркеры для иммунохимического выявления О-антигенов сальмонелл готовили методами прямого и непрямого мечения, конъюгируя золь серебра (средний диаметр частиц 11 нм). В первом случае использовали хроматографически чистые АТ к О-антигену штамма *Salmonella Enteritidis*, во втором случае – кроличьи поликлональные АТ против иммуноглобулинов человека. При проведении иммуноанализа прямым методом суспензию инактивированных

кипячением клеток сальмонелл (концентрация клеток  $1 \cdot 10^2 - 3 \cdot 10^9$  КОЕ), наносили на нитроцеллюлозную мембрану и после проведения ряда стандартных операций, описанных выше, обрабатывали золем серебра, конъюгированным АТ к О-антигену штамма *Salmonella Enteritidis*. В случае непрямого мечения сальмонеллезную суспензию, нанесенную на нитроцеллюлозную мембрану, обрабатывали раствором АТ к О-антигену штамма *Salmonella Enteritidis* и лишь затем на мембрану наносили золь серебра, конъюгированный кроличьими поликлональными АТ. Как в первом, так и втором способе анализа на нитроцеллюлозной мембране проявлялось желтое пятно – результат протекания биоспецифической реакции. Выявлено, что порог чувствительности определения О-антигенов сальмонелл с использованием серебряных маркеров составляет  $10^3$  КОЕ, а традиционного метода *ELISA* –  $10^4 - 10^5$  КОЕ.

Для определения дифтерийного токсина методом дот-блот иммуноанализа использовали золь золота с размерами частиц 15 нм. Маркер готовили путем прямого мечения, стабилизируя золь золота мышинными моноклональными АТ, специфичными к фрагменту А дифтерийного токсина (*Abcam*) в количестве 10 мкг на  $1 \text{ см}^3$  золя золота. Твердофазный иммуноанализ дифтерийного токсина осуществляли на нитроцеллюлозной мембране с диаметром пор 0,2 мкм. На рис. 5 приведены результаты выявления дифтерийного анатоксина в концентрациях от 2 до 525 нг/см<sup>3</sup>.

Установлено, что минимальная определяемая концентрация анатоксина составляет 2 нг/см<sup>3</sup>. Показано, что разработанный маркер специфичен, так как не реагирует со средами, не содержащими токсин (бычий сывороточный альбумин, питательная среда Игла МЕМ, используемая для культивирования штаммов *C.diphtheriae* [27]).

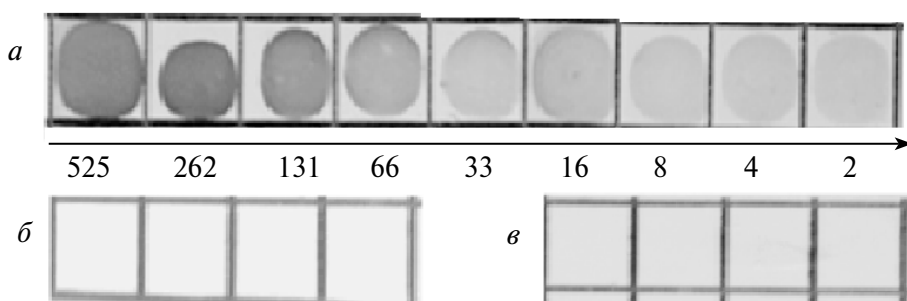


Рис. 5. Окрашивание нитроцеллюлозной мембраны:  
а – дот-анализ штаммов *C.diphtheriae* с использованием золя золота, конъюгированного мышинными моноклональными АТ, специфичными к фрагменту А; б – и в – тесты для подтверждения специфичности иммуноанализа с бычьим сывороточным альбумином и питательной средой Игла МЕМ соответственно

### КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЗОЛЕЙ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА

Известно, что АТ класса *G* (*IgG*) составляют до 75 % от общего количества антител других классов и, как правило, являются основным фактором гуморального звена иммунной защиты, противодействующим развитию инфекционного процесса в организме [31]. Инфекционные заболевания обычно вызывают повышение уровня сывороточных *IgG*, обусловленное инициацией биосинтеза АТ к антигенам возбудителя инфекции. Количественное определение сывороточных *IgG* параллельно с другими классами иммуноглобулинов является одним из обязательных анализов при исследовании иммунного статуса человека.

В лаборатории химии тонких пленок НИИ ФХП БГУ предложен способ количественного определения специфических АТ (иммуноглобулинов) с использованием кроличьих поликлональных АТ против иммуноглобулинов человека, меченных наночастицами золота или серебра [23, 32]. Метод основан на измерении оптической плотности при длине волны, соответствующей максимуму поглощения золя золота (или серебра), первично стабилизированного вышеуказанными поликлональными АТ в количестве, указанном в табл. 1, и вторично конъюгированного специфическими АТ (антитела сальмонеллезной диагностической сыворотки).

Оптическую плотность определяли с помощью фотоэлектроколориметра АР-101. В случае золей золота с исходными размерами частиц 4, 10 и 20 нм измерения проводили при длине волны 540 нм, а в случае золя серебра с размерами частиц 11 нм – при 400 нм. Калибровочные зависимости, полученные для золей золота и серебра, вторично конъюгированных АТ сальмонеллезной диагностической сыворотки в концентрациях от 10 до 600 мкг/см<sup>3</sup>, приведены

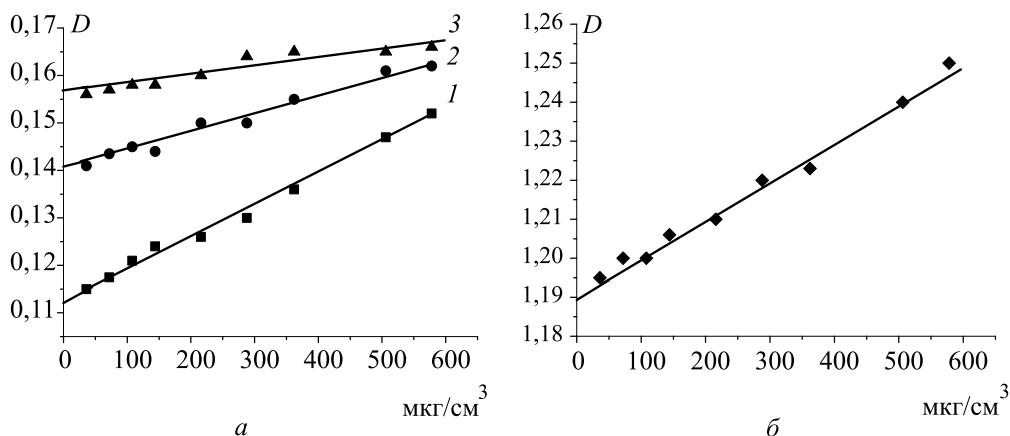


Рис. 6. Зависимость оптической плотности золей золота (а) при  $\lambda=540$  нм и золя серебра (б) при  $\lambda=400$  нм от концентрации АТ сальмонеллезной диагностической сыворотки. Средний диаметр наночастиц в золях золота: 1 – 4 нм, 2 – 10 нм, 3 – 20 нм

на рис. 6. Зависимость изменения оптической плотности от концентрации АТ сальмонеллезной диагностической сыворотки является прямолинейной, и представленные данные могут быть использованы в качестве калибровочного графика, пригодного для определения концентрации АТ. Воспроизводимость результатов составляет  $\pm 10\text{--}15\%$  от измеряемой величины, что вполне достаточно для проведения иммунологических исследований.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Авторами разработаны методы синтеза золей Au, Ag и биметаллов Au–Ag, а также композитных частиц Au–SnO<sub>2</sub>, обеспечивающих получение монодисперсных наночастиц с регулируемым размером в пределах 3–20 нм, пригодных для использования в качестве маркеров в иммуноанализе. Выявлены закономерности и конкретные характеристики изменения спектра поглощения (положения и интенсивности пиков),  $\zeta$ -потенциала при стабилизации золей биополимерами – моно- и поликлональными видовыми и антивидовыми АТ в процессе первичной и вторичной конъюгации. Предложен метод количественного спектрофотометрического определения иммуноглобулинов (на примере сальмонеллезной диагностической сыворотки) и даны аналогичные рекомендации по количественному анализу шигелл.

Разработаны конкретные методики выявления антигенов *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis* и фрагмента А дифтерийного токсина *Abcam* методом дот-блот анализа, прошедшие апробацию в ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» МЗ Республики Беларусь. Установлено, что применение в качестве маркеров золей золота и серебра в твердофазном иммуноанализе (в особенности в варианте непрямого анализа) обеспечивает существенное повышение чувствительности тестирования возбудителей кишечных заболеваний (до  $10^4\text{--}10^5$  КОЕ против  $2 \cdot 10^2\text{--}8 \cdot 10^2$  в отсутствие наночастиц Au и Ag).

Предложена экспрессная методика определения количества биополимера (антител), достаточного для эффективной стабилизации наночастиц золота, серебра, биметаллов и композитов Au–SnO<sub>2</sub>. Установлено, что чувствительность твердофазного иммуноанализа мало зависит от размеров золота, серебра и биметаллов. Изменения в спектрах поглощения золей этих металлов и композита Au–SnO<sub>2</sub> (длина волны и интенсивность пика поглощения) наиболее существенны в случае малых наночастиц размером 3–5 нм и особенно ярко выражены в случае биметаллов Au–Ag и композитов Au–SnO<sub>2</sub> со структурой ядро – оболочка.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Шевченко Г. П., Свиридов В. В. Сб. ст. «Химические проблемы создания новых материалов и технологий» / под ред. О. А. Ивашкевича. Минск : БГУ, 2003. Вып. 2. С. 56–74.

2. Свиридов В. В., Браницкий Г. А., Рахманов С. К. // Химические проблемы создания новых материалов и технологий : сб. ст. Минск : БГУ, 2003. Вып. 2. С. 12–37.
3. Lesnikovich A. I., Vorobyova S. A. Collection of papers «Chemical problems of the development of new materials and technologies». Minsk : BSU, 2003. Iss. 1. P. 234–247.
4. Шевченко Г. П., Потапенко Л. Т., Бокшиц Ю. В., Свиридов В. В. // Известия НАН Беларуси. Минск, БГУ. Сер. хим. наук. 2003. № 1. С. 33–36.
5. Шевченко Г. П., Малашкевич Г. Е., Ващенко С. В. [и др.] // Химические проблемы создания новых материалов и технологий : сб. ст. Минск : БГУ, 2008. Вып. 3. С. 10–23.
6. Kukhta A. V., Kolesnik E. E., Lesnikovich A. I. [et al.] // Mat. Sci. and Eng. 2006. Vol. 26, № 5–7. P. 1012–1016.
7. Nichick M. N., Voitekhovich S. A., Shavel A. [et al.] // Polyhedron. 2009. Vol. 28, № 14. P. 3138–3142.
8. Кисленко В. Н. Иммунологические методы диагностики. Электронный учебный ресурс. nsau.edu.ru/file/1189. Новосибирск, 2010.
9. Комкова О. П., Образцова А. М., Сидорова Н. А. Механизмы серологических реакций : методические указания для студентов медицинского факультета. Петрозаводск : ПетрГУ, 2006.
10. Черношей Д. А., Канашкова Т. А. Методы иммуноанализа, основанные на приращении меченых компонентов : учеб.-метод. пособие. Минск : БГМУ, 2007.
11. Михайлов А. Т., Смирский В. Н. Методы иммунохимического анализа в биологии развития. М. : Наука, 1991.
12. Дыкман Л. А., Богатырев В. А. // Успехи химии. 2007. Т. 76, № 2. С. 199–213.
13. Загоскина Т. Ю., Калиновский А. И., Марков Е. Ю. [и др.] // Клинич. лаб. диагностика. 1999. № 3. С. 38–39.
14. Xie F., Drosdowicz-Tomisa, Shtoyko T., Goldys E. M // J. Nanopart Res. 2011. Vol. 13. P. 613–624.
15. Загоскина Т. Ю., Полтавченко А. Г., Докорина А. А. [и др.] // Сибирь–Восток. 2002. № 8. С. 7–9.
16. Faulk W., Taylor G. // Immunochemistry. 1979. Vol. 8. P. 1081–1083.
17. Dykman L. A., Khlebitsov N. // Chem. Soc. Rev. 2012. Vol. 41. P. 2256–2282.
18. Turkevich J., Stevenson P. C., Hillier J. // Discuss. Faraday Soc. 1951. Vol. 11. P. 55–75.
19. Frens G. // Colloid & Polymer Science. 1972. Vol. 250. P. 736–741.
20. Frens G. // Nature, Phys. Sci. 1973. Vol. 241. P. 20–22.
21. Хлебцов Б. Н., Богатырев В. А., Дыкман Л. А., Хлебцов Н. Г. // Оптика и спектроскопия. 2007. Т. 102, № 2. С. 273–281.
22. Богатырев В. А., Дыкман Л. А., Краснов Я. М. [и др.] // Коллоидный журн. 2002. Т. 64, № 6. С. 745–755.
23. Лазарчик В. А., Титов Л. П., Воробьева Т. Н. [и др.] // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. 2005. № 3. С. 44–48.
24. Лазарчик В. А., Врублевская О. Н., Воробьева Т. Н. // Вестн. БГУ. Сер. 2. 2006. № 2. С. 3–7.
25. Лазарчик В. А., Врублевская О. Н., Воробьева Т. Н. // Тез. докл. XVIII Междунар. науч.-техн. конф. «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии». Минск, Беларусь. 2005. С. 31.

26. Лазарчик В. А., Ермакова Т. С., Титов Л. П. [и др.] // Вес. НАН Беларусі. Сер. мед. наук. 2007. № 1. С. 10–15.

27. Колодкина В. Л., Денисевич Т. Н., Дыкман Л. А., Врублевская О. Н. // Медицинский журн. 2009. № 2. С. 66–69.

29. Мальтанова А. М., Воробьева Т. Н., Позняк С. К. // Свиридовские чтения : сб. ст. Минск : БГУ. 2013. Вып. 9. С. 104–112.

30. Мальтанова А. М., Пыж А. Э., Ермакова Т. С. [и др.]. // Вестн. БГУ. Сер. 2. 2012. № 3. С. 30–34.

31. Офицеров В. И. Подклассы иммуноглобулина G: возможности использования в диагностической практике : информ.-метод. пособие. Кольцово : ЗАО «Вектор-Бест». 2004.

32. Врублевская О. Н., Воробьева Т. Н. // Сб. тез. докл. Респ. науч. конф. по аналитической химии «Аналитика РБ-2010». Минск : БГУ, 2010. С. 156.

Поступила в редакцию 12.11.2013.