

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

ДИССЕРТАЦИЯ  
на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
кандидат химических наук,  
Грибова Е.Д.

Дубна, 2025

# Содержание

Список сокращений.....	4
Введение.....	6
Глава 1. Литературный обзор.....	14
1.1 Иммунохимический анализ.....	14
1.1.1 Иммунохроматографический анализ.....	14
1.1.2 Метчики для иммунохроматографического анализа.....	16
1.2 Квантовые точки.....	23
1.2.1 Классификация квантовых точек.....	25
1.2.2 Методы химического синтеза квантовых точек.....	29
1.2.3. Квантовые точки с флуоресценцией в ближней ИК-области спектра.....	35
1.2.4 Методы гидрофилизации и модификации квантовых точек.....	36
1.3 Взаимодействие «антитело-антиген».....	40
1.3.1 Вирус болезни Ауески.....	42
1.4 Биоконъюгация с квантовыми точками.....	43
1.4.1 Конъюгация карбодиимидным методом.....	45
1.4.2 Ориентированная конъюгация антител.....	45
1.5 Методы исследования квантовых точек и их конъюгатов.....	49
1.6 Математическое описание иммунохроматографического анализа.....	55
1.7 «Хук-эффект».....	57
1.8 Выбор направления исследования.....	61
Глава 2. Экспериментальная часть.....	64
2.1 Реактивы, материалы и оборудование.....	64
2.2 Металлорганический синтез квантовых точек CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS и их гидрофилизация.....	66
2.3 Получение конъюгатов квантовых точек с моноклональными антителами.....	67
2.4 Получение иммунохроматографических тест-полосок.....	68
2.5 Проведение иммунохроматографического анализа.....	69
2.6 Исследование квантовых точек и конъюгатов методом эксклюзионной хроматографии.....	70
2.7 Исследование квантовых точек и конъюгатов методом капиллярного зонного электрофореза.....	71
2.8 Определение аналитических характеристик иммунохроматографического анализа.....	72

Глава 3. Исследование свойств многослойных квантовых точек в растворе и на иммунохроматографических тестах .....	74
3.1    Гидрофобные квантовые точки, их свойства и модификация .....	74
3.1.1    Гидрофилизация квантовых точек CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS.....	75
3.1.2    Спектральные характеристика квантовых точек в растворе и на иммунохроматографических тестах .....	80
Глава 4. Конъюгация квантовых точек с антителами к gB вируса болезни Ауески.....	85
Глава 5. Исследование свойств квантовых точек и их конъюгатов методами капиллярного электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии .....	95
Глава 6. Разработка и оптимизация иммунохроматографической системы для диагностики gB вируса болезни Ауески.....	103
Выводы .....	115
Работы, опубликованные по теме диссертации.....	117
Опубликованные РИД.....	118
Список литературы.....	119
Приложение А.....	141
Приложение Б .....	143

## Список сокращений

- БЛИК — ближняя инфракрасная область
- БСА — бычий сывороточный альбумин (bovine serum albumin)
- ВАСМ — высокоскоростной атомно-силовой микроскоп
- ВБА — вирус болезни Ауески
- ВКС — водный коллоидный синтез
- ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГКТ — графеновые квантовые точки
- ДМФА — диметилформамид
- ДРС — динамическое рассеяние света
- ДДСН — додецилсульфат натрия
- ИДОРИ - двухуровневая иммунохроматографическая диагностика опасных и резистентных инфекций (аналитическая платформа ИДОРИ)
- ИФА — иммуноферментный анализ
- ИХА — иммунохроматографический анализ
- КВ — квантовый выход
- КЗ — коллоидное золото
- КЗЭ — капиллярный зонный электрофорез
- КТ (QD) — квантовые точки (quantum dots)
- ЛИФ — лазерно-индуцируемая флуоресценция
- МПК — меркаптопропионовая кислота
- МУК — меркаптоуксусная кислота
- МЭКХ — мицеллярная электрокинетическая хроматография
- НА — наноалмаз
- НЦМ — нитроцеллюлозная мембрана
- ПАВ — поверхностно-активные вещества
- ПБА — патогенные биологические агенты

ПСА – Простат-специфический антиген

ПТВП — тиол-содержащий сополимер винилпирролидона, малеинового ангидрида и этиленгликольдиметакрилата

ПЭМ — просвечивающая электронная микроскопия

СЭМ — сканирующая электронная микроскопия

ТГК — тиогликолевая кислота

ТГФ — тетрагидрофуран

ТОРО (trioctylphosphine oxide) — три-н-октилфосфиноксид

ТОР (trioctylphosphine) — триоктилфосфин

МКС — металлоорганический коллоидный синтез

УКТ — углеродные квантовые точки

ЭМ — электронная микроскопия

ЭОП — электроосматический поток

EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide) — 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид

DRI — рефрактометрический детектор

HAD (hexadecylamine) — гексадециламин

ICP-MS — масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

ID — внутренний диаметр капилляра

Ig (immunoglobuline) — иммуноглобулин

FL — флуоресцентный детектор

L-cys — L-цистеин

NHS (N-Hydroxysuccinimide) — N-гидроксисукцинимид

SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering) — поверхностно-усиленная спектроскопия комбинационного рассеяния

PBS (Phosphate-buffered saline) — Фосфатно-солевой буфер

PDA — матричный фотодиодный детектор

# Введение

## 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 ассоциирован 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 гВ вируса болезни Ауески; изучение возможности определения белковых аналитов с использованием иммунохроматографических тестов и определение условий проведения ИХА для увеличения чувствительности анализа.

**Актуальность** работы определяется получением новых данных для создания флуоресцентных нанодисперсных меток (квантовых точек) белков для высокочувствительного иммунохроматографического экспресс анализа и разработкой иммунохроматографических тест-систем на примере диагностики вирусного заболевания болезни Ауески. Актуальность данного научного направления подтверждается неуклонным ростом публикаций по тематике «QDs in immunoassay and immunochromatography» по данным базы ScienceDirect (Рисунок 1).

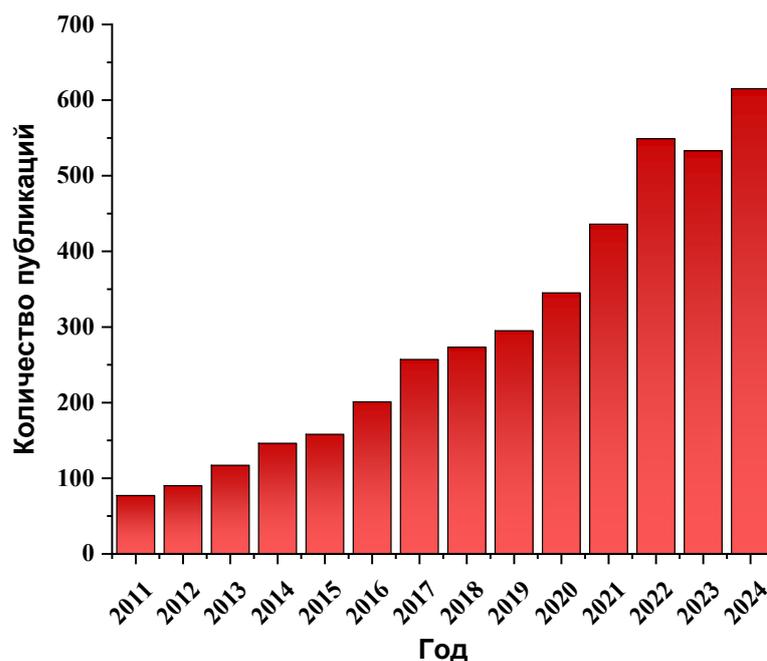


Рисунок 1 — Публикационная активность работ по использованию КТ в иммуноанализе и иммунохроматографическом анализе согласно данным ScienceDirect

**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 гидрофиллизации гидрофобных КТ со структурой ядро/оболочка/оболочка/оболочка и изучено его влияние на свойства КТ;
- Разработаны способы получения конъюгатов антител к гВ 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 рН-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 гВ 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 работы, 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. Опубликовано 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: Всероссийской конференции 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 Всероссийской конференции «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 факультета 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), International conference devoted to the 90th anniversary of academician Rafiga Aliyeva (Азербайджан, Баку, 2022), 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 РФФИ №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 РФФИ №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 НИИ ПА прикладной акустики г. Дубна, а именно 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 Института биофизики клетки Российской академии наук (ИБК РАН, г. Пущино) О.С. Моренкова и сотрудников лаборатории проблем клеточного стресса за возможность проведения экспериментов по иммунохроматографическому анализу, 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 ИХА.

# Глава 1. Литературный обзор

## 1.1 Иммунохимический анализ

Термин «иммуноанализ» охватывает широкий спектр биоаналитических методов, основанных на специфическом взаимодействии антигена с антителом. Благодаря своей относительной простоте, специфичности, высокой чувствительности иммуноанализ становится востребованным методом для определения различных биомолекул. Процесс определения целевого анализита обычно включает две основные стадии: иммунную реакцию и обнаружение, которое может быть осуществлено с использованием химических, физических, биологических или иммунологических подходов. На стадии иммунной реакции иммуноаналитические реагенты смешиваются, происходит связывание антигена с антителом и образование иммунного комплекса.

Иммунохимический метод анализа представляет собой эффективный, быстрый и надежный подход, основанный на высокоспецифичном взаимодействии между антигеном и антителом. Антиген распознается антителом через сайт связывания, известный как паратоп, который соответствует области иммунодетерминанты. Чувствительность и специфичность анализа зависят от типа антитела, его аффинности и авидности к антигену. Иммуноанализы могут быть как качественными, так и количественными. Эти методы применяются для обнаружения антител или антигенов, специфичных для бактериальных, вирусных и паразитарных инфекций, аутоиммунных заболеваний. Иммуноанализ дает возможность выявлять низкие уровни различных антигенов, терапевтических или запрещенных препаратов в образцах крови, сыворотки, плазмы, мочи или слюны пациента [6].

Наиболее популярным и перспективным методом иммуноанализа является ИХА за счет простоты использования, анализа по месту требования, портативной аналитической системы и низкой стоимости [11]. Метод иммунохроматографии основан на свойстве антител селективно связываться с определенным антигеном [12]. Причем определяемым «антигеном» в данном методе анализа может служить и определяемое в биоматериале антитело к инфекционному агенту или аутоантитела, в этом случае остальные используемые в тесте антитела будут являться анти-антителами. В виду того, что ИХА является основным предметом данного исследования, остановимся на этом методе подробнее.

### 1.1.1 Иммунохроматографический анализ

Архитектура иммунохроматографической тест-системы представлена на рисунке 2. Тест-полоска представляет собой несколько примыкающих друг к другу слоев мембран на

пластиковой подложке, по которым за счёт капиллярных сил движется поток жидкости, содержащий анализ. Анализ наносится на специальную мембрану для пробы. На мембране, показанной розовым цветом, содержится конъюгат специфических первичных моноклональных антител к определяемому антигену с какой-либо аналитической меткой. На аналитической нитроцеллюлозной мембране в виде узкой линии в тестовой зоне нанесены моноклональные антитела к определяемому антигену, и в контрольной зоне — вторичные (антивидовые) антитела против первых специфических моноклональных антител [13].



Рисунок 2 — Схематическое изображение иммунохроматографической тест-полоски

При нанесении образца на мембрану для пробы, под действием капиллярных сил инициируется движение раствора вдоль тест-полоски, которое сопровождается иммунохимическими взаимодействиями с находящимися в них компонентами. В тестовой зоне происходит связывание иммунокомплекса иммобилизованными специфическими другими моноклональными антителами и наблюдается появление окрашенной линии. Интенсивность окраски тестовой зоны прямо пропорциональна содержанию анализируемого вещества в образце. Избыток несвязанного конъюгата перемещается по мембране к контрольной зоне, где формируется вторая окрашенная линия (Рисунок 3). Если в образце отсутствует целевой антиген, меченые антитела фиксируются только вторичными антителами в контрольной области. Таким образом, наличие видимой окраски в контрольной зоне в обоих случаях указывает на работоспособность теста. Установка дополнительной впитывающей мембраны на конце тест-полоски способствует более равномерному движению образца вдоль полоски [13].

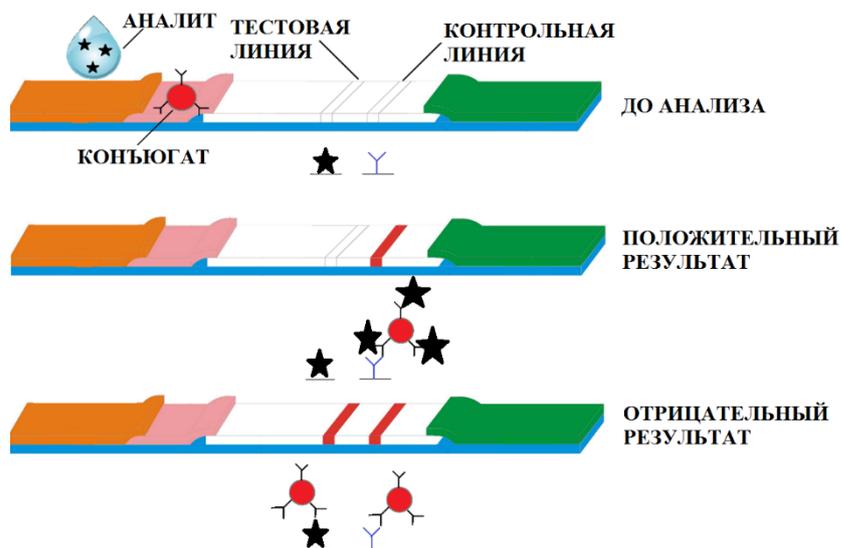


Рисунок 3 — Схема конкурентного ИХА

Пределы обнаружения иммунохроматографических тест-систем варьируются в пределах концентраций  $10^{-9}$  —  $10^{-6}$  М, которые зависят от характеристик аналитической метки, методов детекции, иммунореагентов и т.д. В некоторых случаях применение портативных детекторов позволяет снизить эти пределы до пикомолярных уровней. Время, необходимое для проведения иммунохроматографического тестирования, обычно составляет от 5 до 20 минут [14].

ИХА в основном является качественным или полуколичественным методом диагностики. Для разработки количественного анализа более перспективным в качестве метчиков могут служить КТ в виду их уникальных свойств. Варьируя состав, структуру и размер КТ, можно получить аналитические метки с различными оптическими характеристиками. КТ, в отличие от органических и большинства других флуорофоров, имеют широкий спектр поглощения с более высоким коэффициентом экстинкции, узкий симметричный пик эмиссии, высокий КВ и высокую фотостабильность [15]. Это обеспечивает высокую яркость и увеличение аналитического сигнала. Для КТ разработаны методы модификации их поверхности и ковалентной конъюгации с биополимерами [16]. Важной характеристикой КТ также является время жизни флуоресценции, составляющая 10-40 нс, что значительно больше, чем у обычных органических красителей [5, 17, 18].

### 1.1.2 Метчики для иммунохроматографического анализа

Метки, используемые в ИХА весьма разнообразные и включают такие материалы, как наночастицы золота, цветные латексные шарики, магнитные частицы, углеродные наночастицы, наночастицы селена, наночастицы серебра, органические флуорофоры, текстильные красители, ферменты, липосомы и другие [19]. Используемый в качестве

метки материал должен обладать определенными характеристиками: сохранять свои свойства при конъюгации с биомолекулами, легко детектироваться и оставаться стабильным в течение длительного времени, обладать высокой чувствительностью при обнаружении, при конъюгации не должна изменять функциональность биореагентов. После проведения ИХА метки могут генерировать как прямой сигнал, так и требовать дополнительных манипуляций для получения аналитического сигнала (например, ферменты производят обнаруживаемый продукт в реакции с соответствующим субстратом) [20]. Таким образом, метки, которые обеспечивают прямой сигнал, более предпочтительны в ИХА благодаря меньшему времени отклика и упрощенной процедуре анализа. Далее кратко рассмотрим некоторые из меток, используемых в ИХА.

**Магнитные наночастицы или магнитные наносферы, или «нанобусины» (Nanobeads).** В работе [21] используются магнитные наносферы для мультиплексного определения различных маркеров сердечных заболеваний. Использование магнитных наносфер в качестве зондов в ИХА позволяет детектировать магнитный сигнал во всем объеме мембраны толщиной 100 мкм, что повышает чувствительность в 10 – 1000 раз. Аналитическая метка может детектироваться либо по отклику на внешнее магнитное поле [21, 22], либо по окраске [23, 24]. Магнитные метки представляют собой, в основном, ядро из  $Fe_2O_3$  и  $Fe_3O_4$ , заключенное в полимерную оболочку [25]. Интенсивность магнитного сигнала измеряется с помощью магнитного иммунохроматографического считывателя.

**Наночастицы золота.** Наночастицы КЗ получили наиболее широкое применение в качестве меток благодаря доступности, простоте получения и детектирования. Размер таких частиц варьируется в пределах 10-50 нм. Интенсивная окраска частиц КЗ обусловлена поверхностным плазмонным резонансом, возникающим при взаимодействии видимого светового излучения с наноразмерными частицами золота [25]. ИХА с использованием наночастиц золота нашел широкое применение в медицинской диагностике [26], пищевой промышленности [27, 28], для мониторинга качества воды [29, 30] и окружающей среды [31]. При этом КЗ имеет пурпурный цвет, что позволяет создать тест-системы для быстрого визуального обнаружения без дополнительных приборов.

**Наночастицы серебра.** Наночастицы серебра привлекли большое внимание в медицинской диагностике благодаря своей простоте синтеза, химической стабильности, хорошей проводимости и антимикробным свойствам [32]. При использовании в тест-системах наночастицы серебра могут детектироваться колориметрическими [33] и вольтамперометрическими способами, а также по изменению оптических свойств в процессе агрегации.

**Флуоресцентные красители.** Красители являются наиболее распространёнными и доступными биологическими метками. Однако они имеют ряд недостатков: низкая флотабильность, поглощение в узком диапазоне спектра, широкий спектр флуоресценции и т.д. В работе [34] используют органический флуорофор - дендримеры на основе флуоресцентного красителя кумарин для определения инфекционных заболеваний с помощью тест-полосок. Такие флуорофоры имеют высокую интенсивность излучения, высокую яркость сигнала и высокую флотабильность. Предел обнаружения антигена при использовании такого флуорофора составил 0,1 нг. В ИХА часто встречается использование красителя родамин С [35], гетеробифункциональных красителей на основе цианина [36] и других флуоресцентных и ксантовых красителей [37]. В последнее время в ИХА используют красители в сочетании с наночастицами кремнезема [38], что позволяет увеличить чувствительность иммунохимических методов анализа.

**Флуоресцентные микросферы.** Они представляют собой полистирольные шарики, размером 100–500 нм, в которые включены различные флуоресцентные наночастицы или красители. Их очень часто называют «окрашенные латексные частицы». Так в работе [39] используются полистирольные микросферы диаметром 200 нм для количественного иммунохроматографического определения сульфаметазина в молоке. Для определения биомаркера инфаркта миокарда тропонина I использовали двуслойные флуоресцентные микросферы, синтезированные из стирола и акриловой кислоты, содержащие внутри краситель «Нил красный» [40]. Существуют работы, где флуоресцентные микросферы используются для иммунохимического определения токсина микроцистина в воде [41], антибиотиков в молочных продуктах [42], у человека парвовируса В19, цитомегаловируса и токсоплазмы [43], цитокина в различных тканях свиньи [44] и т.д.

**SERS наноструктуры.** В последнее время наблюдается интерес к разработке тест-систем с детекцией методом поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии (SERS - Surface-Enhanced Raman Scattering). После открытия явления SERS появилась возможность детектирования следового количества биологических молекул. SERS наноструктуры обычно состоят из наночастиц золота или серебра [45, 46], покрытых слоем SiO<sub>2</sub>, на которые впоследствии конъюгируют антитела. Резонансное поглощение возбуждающего лазерного излучения металлическими наночастицами приводит к значительному увеличению электрического поля вблизи их поверхности и, соответственно, к усилению рамановского сигнала от молекул, находящихся в непосредственной близости. В последнее время встречаются SERS наноструктуры на основе графена и оксида графена в комбинации с серебром, золотом [47, 48].

**Углеродные нанотрубки и углеродные наночастицы.** Из-за экономичности и простоты синтеза углеродные наночастицы находят все большее применение в качестве меток в ИХА. Авторы работы [49] разработали иммунохроматографический сэндвич-анализ для определения ДНК с использованием флуоресцентных углеродных наночастиц размером 15 нм с помощью портативного флуориметра. На основе углеродных нанотрубок разработан ИХА для быстрого определения последовательности ДНК [50]. Для углеродных наночастиц характерен низкий предел обнаружения из-за высокого коэффициента экстинкции и достигает 0,4 фМ [49]. Новейшим достижением является использование флуоресцирующего фуллерена в качестве меток в ИХА. В работе [51] использовали фуллерен, покрытый тетраэтиленгликолем для определения С-реактивного белка. Предел обнаружения составил 0,1–10 нг/мл. Помимо этого, наночастицы на основе аморфного углерода применяют в работе [52] для мультиплексного анализа разного вида грибковых инфекций.

**Липосомы.** Представляют собой везикулы, образованные в результате ассоциации в водной среде молекул фосфолипидов с формированием липидного бислоя, в котором гидрофильные головные группы направлены как к ядру, так и к внешней среде. Для использования липосом в ИХА в них обычно инкапсулируют краситель, например, сульфородамин В, или любой другой краситель, имеющий высокий коэффициент экстинкции, хорошую фотостабильность и растворимость [53]. Липосомы способны инкапсулировать миллионы молекул красителя, которые могут создавать очень интенсивный сигнал. Затем липосомы иммобилизируют с антителами обычно с использованием биотина и стрептавидина. Такие метки использовались для иммунохроматографического определения микотоксина афлатоксином В1 [54], бактерии *Salmonella Typhimurium* [55], аллергенных белков в арахисе [56]. Однако основными недостатками липосом являются структурная неустойчивость по отношению к детергентам и изменениям рН, влияющим на заряд фосфолипидов в бислое.

**Ферменты.** Ферменты, которые чаще всего используются в качестве меток в хроматографических иммуноанализах, представляют собой β-галактозидазу, щелочную фосфатазу, пероксидазу хрена, каталазу, глюкозооксидазу и аденозиндеаминазу [57]. В хроматографических иммуноанализах, в которых используются ферментные метки, катализирующие превращение субстрата в продукт, который затем исследуется. Фермент обеспечивает эффективное усиление аналитического сигнала, трансформируя большое число молекул субстрата. Содержание продуктов этих ферментов измеряется с помощью поглощения света, флуоресценции, хемилюминесценции, электрохимического обнаружения и термометрического анализа. Ферменты используются не как

непосредственные метки антител или антигенов, а как дополнительные средства усиления сигнала, например, в комбинации с наночастицами [58].

**Квантовые точки.** КТ являются идеальными флуоресцентными метками и широко используются для увеличения чувствительности обнаружения аналита в ИХА благодаря их узким спектрам излучения, широкому диапазону возбуждения и высокому КВ флуоресценции. КТ имеют высокую яркость флуоресценции, легко настраиваемый диапазон излучения путем изменения размера наночастиц, большие коэффициенты поглощения, высокие стабильность и отношение сигнал/шум, что позволяет их детектировать и определять. Водорастворимые КТ, покрытые лигандами или полимерами с карбоксильными или аминогруппами, позволяют проводить их конъюгацию с белками. Способность КТ изменять свои оптические свойства в зависимости от размера и узкий спектр излучения позволяют разработать ИХА с одновременной количественной оценкой нескольких аналитов (мультиплексный ИХА).

Вышеперечисленные метки являются основными используемыми в ИХА. Однако существуют и другие метки для ИХА, более подробно описанные в [59]: наночастицы  $Fe_3O_4$ , покрытые силикагелем, кремниевые наночастицы, латексные шарики, наночастицы платины, хелаты лантаноидов, преобразующий люминофор, радиоактивные частицы. Зачастую в ИХА применяют комбинацию нескольких меток для увеличения чувствительности анализа. Так в работе [60] для определения белковых биомаркеров методом ИХА применяются в качестве меток биолюминесцентные нанолипосомы, конъюгированные с магнитными частицами с использованием портативного АТФ-люминометра. Из всех перечисленных меток КТ представляют наибольший интерес из-за их уникальных свойств. Флуоресцентные свойства КТ позволяют проводить не только качественный, но и количественный ИХА.

Как было написано выше, наиболее широкое применение получили метки из наночастиц золота. Литературный анализ работ по определению одного и то же аналита методом ИХА с использованием КЗ и КТ показал уменьшение предела обнаружения при использовании последних в качестве меток (Таблица 1). В связи с этим далее рассмотрим более подробно структуру и свойства этих наночастиц.

Таблица 1 — Характеристики ИХА с использованием в качестве меток КТ и наночастиц золота

Метки в ИХА	Максимум флуоресценции, нм	Квантовый выход	Аналит, метод	Предел обнаружения	Скорость	Диапазон линейности	Литература
CdSe/ZnS/CdZnS/ZnS	625	>80%	С-реактивного белка, ИФА*	~0,41 нг/мл	—	0 – 1000 нг/мл	[61]
Наночастицы золота	652	—	С-реактивного белка, ИФА	8 пг/мл	—	0,1 – 200 нг/мл	[62]
CdSe/CdS/Cd <sub>x</sub> Zn <sub>1-x</sub> S/ZnS	610	50-70%	ПСА*	0,33 нг/мл	15 мин	0 – 100 нг/мл	[63]
Наночастицы золота	—	—	ПСА	0,009 нг/мл	—	0,01 – 20 нг/мл	[64]
Наночастицы золота	—	—	ПСА	4 нг/мл	12 мин	4,01 – 169,1 нг/мл	[65]
CdSe/CdS/ZnS	—	—	олаквиндокс	0,12 мкг/кг	8 мин	—	[66]
Наночастицы золота	—	—	олаквиндокс	0,27 мкг/кг	5-8 мин	0,27 – 29,30 нг/мл	[67]
CdSe/CdS/ZnS	629,2	77.64%	вирус гриппа А	2,5 HAU* 0,63 HAU	20 мин	0 – 20 HAU 0 – 5 HAU	[68]
CdSe/ZnS	620	—	вирус гриппа А	0,016 HAU 0,25 HAU	15 мин	—	[69]
Наночастицы золота	—	—	вирус гриппа А	7.8 HAU	15-20 мин	—	[70]
CdSe/ZnS	610	—	токсин Т-2	10 фг/мл	9 мин	20 –110 фг/мл	[71]
Наночастицы золота	—	—	токсин Т-2	150 фг/мл	—	—	[4]
CdSe/ZnS	605	—	афлатоксина М1	16 пг/мл	22 мин	10 – 52 пг/мл	[72]

Метки в ИХА	Максимум флуоресценции, нм	Квантовый выход	Аналит, метод	Предел обнаружения	Скорость	Диапазон линейности	Литература
Наночастицы золота	—	—	афлатоксина М1	1,0 нг/мл	10 мин	0 –10 нг/мл	[73]
CdSe/ZnS	615	—	афлатоксин В1	0,005 нг/мл		0,001 – 10 нг/мл	[74]
Наночастицы золота	—	—	афлатоксин В1	1,5 мкг/кг	5 мин	0,0125 – 2 мкг/кг	[75]
CdSe/ZnS	—	—	рактопамин	0,1 нг/мл	—	—	[76]
Наночастицы золота	—	—	рактопамин	0,39 нг/мл	5 мин	—	[77]
CdSe/ZnS	620	—	—	$1 \times 10^{-6}$ МЕ/л для бета-ХГЧ	—	—	[78]
Наносферы золота	—	—	—	9 мМЕ/мл	—	—	[79]

\*Примечание: ИФА – иммуноферментный анализ; ПСА – Простат-специфический антиген; HAU – гемагглютинирующая единица, которая соответствует примерно  $4 \times 10^7$  вирусным частицам

## 1.2 Квантовые точки

Квантовые точки — нанобъекты с размером близким к длине волны электрона в этом материале (1-10 нм), внутри которого потенциальная энергия электрона ниже, чем за его пределами, и поэтому движение электрона ограничено во всех трех измерениях. КТ создаются на основе элементов II и VI групп (CdTe, CdS, CdSe, ZnSe, ZnS и др.), реже III и V групп (InP, InAs) или IV и VI групп (PbS, PbSe, PbTe) периодической системы Д.И. Менделеева [80, 81]. Для стабилизации КТ и обеспечения устойчивости в различных средах их покрывают монослоем из молекул органического стабилизатора (Рисунок 4) [82].

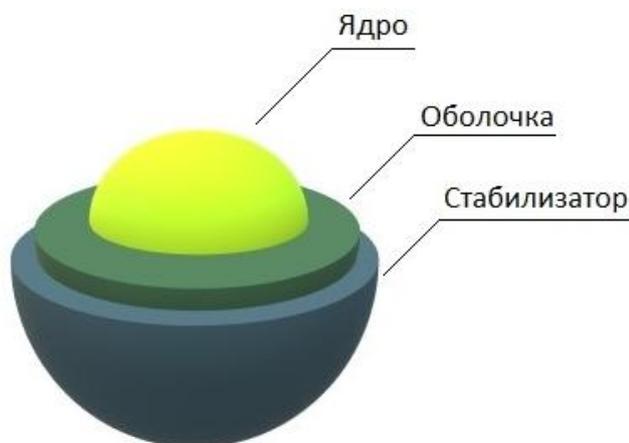


Рисунок 4 — Структура КТ

Наиболее важной характеристикой полупроводника является ширина запрещенной зоны  $E_g$ . Обычный полупроводник имеет отчетливую и зависящую от материала запрещенную зону. Если свет с энергией фотонов, превышающей ширину запрещенной зоны, попадает на полупроводник, происходит возбуждение электронов и переход из валентной зоны в зону проводимости, при этом образуются слабосвязанные кулоновскими взаимодействиями электронно-дырочные пары, которые называют экситонами [83].

Экситон представляет собой комбинацию электрона и дырки (пустого электронного состояния в валентной полосе), которая свободно перемещается через среду полупроводника. Электрон и положительная дырка имеют равные, но противоположные электрические заряды, поэтому экситон не имеет чистого электрического заряда, но он переносит энергию. Энергия экситона может быть преобразована в свет или она может быть передана электрону соседнего атома в нанокристалле. Если энергия передается на соседний электрон, создается новый экситон, поскольку этот электрон вытесняется из своего атома. Рекомбинация пары электрон-дырка приводит к возникновению люминесценции.

Полупроводниковые частицы называются КТ, когда размер частицы меньше Боровского радиуса экситона  $\alpha_B$ , определяемого как

$$\alpha_B = \frac{\epsilon_0 \epsilon h^2}{\pi \mu_{rm} e^2}, \quad (1)$$

где  $\epsilon_0$  и  $\epsilon$  — диэлектрическая проницаемость вакуума и диэлектрическая проницаемость полупроводника,  $\mu_{rm}$  — приведенная масса электрона и дырки ( $\frac{m_e m_h}{m_e + m_h}$ ),  $e$  — элементарный заряд [84].

Маленький размер частиц приводит к квантовому ограничению электронов и дырок во всех трех измерениях и рассмотрению КТ в качестве нульмерных материалов [85].

С увеличением числа атомов наблюдается сближение между ВЗМО и НСМО, что приводит к росту количества молекулярных орбиталей (Рисунок 5). Это, в свою очередь, вызывает увеличение плотности состояний и формирование энергетической структуры КТ. Дальнейшее увеличение размера КТ приводит к объединению молекулярных орбиталей и образованию валентной зоны и зоны проводимости, аналогичных тем, что наблюдаются в объемных полупроводниках [86].

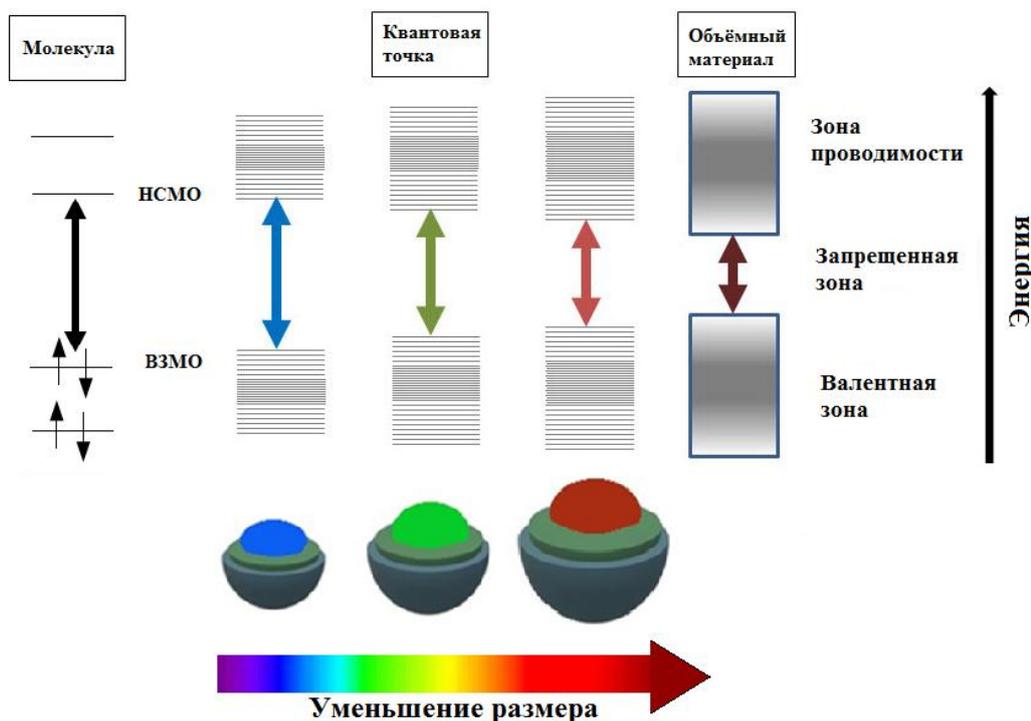


Рисунок 5 — Диаграмма энергетических зон для молекул, КТ и объемных материалов

Несмотря на то, что на многих изображениях КТ представлены в виде сфер, они являются кристаллическими материалами и имеют структуру, соответствующую параметрам кристаллической решётки объемного материала, но параметр решетки может

немного отличаться [87]. В случае халькогенидных наночастиц описываются два вида кристаллической структуры: вюрцит и сфалерит (цинковая обманка). Органические поверхностно-активные вещества оказывают большое влияние на структуру нанокристаллов и в зависимости от вида стабилизатора получается определенная кристаллическая структура [88].

Благодаря квантово-размерному эффекту КТ обладают уникальными физико-химическими свойствами, обуславливающими их широкое применение в различных областях, где требуются перестраиваемые оптические свойства (длины волн) — лазеры [89], солнечные батареи [90], фотоэлектрические преобразователи [91], светодиоды [92], осветительные панели и др. Ключевыми преимуществами КТ по сравнению с другими флуорофорами являются следующие аспекты [93, 94]:

- **высокая яркость флуоресценции:** КТ демонстрируют высокие значения квантового выхода и коэффициента экстинкции, что обеспечивает его интенсивное свечение;
- **симметричный и узкий пик флуоресценции:** ширина пика на полувысоте не превышает 30-35 нм, что значительно упрощает процесс создания меток в разных областях спектрального излучения для мультиплексного анализа, позволяя избежать перекрытия спектров;
- **широкий спектр поглощения:** КТ с различными диаметрами может быть одновременно возбужден одним источником света с определенной длиной волны, например, 400 нм. При этом длина волны эмиссии варьируется в диапазоне от 490 до 590 нм, что соответствует цветам флуоресценции от голубого до оранжево-красного;
- **высокая фотостабильность:** данная характеристика позволяет многократно увеличивать мощность возбуждаемого излучения, что, в свою очередь, обеспечивает возможность длительного наблюдения за поведением флуоресцентной метки в реальном времени без значительной потери яркости сигнала.

### 1.2.1 Классификация квантовых точек

Классификация КТ может быть выполнена на основании характеристик полупроводниковых материалов, их структурных особенностей, а также соотношения различных материалов в случае применения многокомпонентных полупроводниковых систем.

#### Состав квантовых точек (материал полупроводника)

КТ представляют значительный интерес в качестве люминесцентных материалов. К основным требованиям, предъявляемым к полупроводниковым материалам, на основе

которых синтезируются КТ, относятся: прямозонный характер зонного спектра, обеспечивающий эффективную люминесценцию, а также малая эффективная масса носителей заряда, что способствует проявлению квантово-размерных эффектов в широком диапазоне размеров [95]. Классификация КТ может быть осуществлена на основе различных полупроводниковых материалов [96]:

- широкозонные полупроводники, такие как ZnS и TiO<sub>2</sub>, обладающие способностью к люминесценции в ультрафиолетовом диапазоне.

- среднезонные полупроводники, например CdSe и CdTe, люминесцирующие в видимом спектральном диапазоне.

- узкозонные полупроводники, такие как PbSe и PbTe, демонстрирующие люминесценцию в области БЛИК диапазона.

На рисунке 6 иллюстрируется возможность изменения спектра флуоресценции для наиболее распространенных типов наночастиц. С практической точки зрения, ключевыми оптическими диапазонами являются: видимый спектр в диапазоне 400-750 нм, БЛИК от 800 до 900 нм, который соответствует окну прозрачности крови, а также диапазон 1300-1550 нм, используемый в телекоммуникационных системах [97].

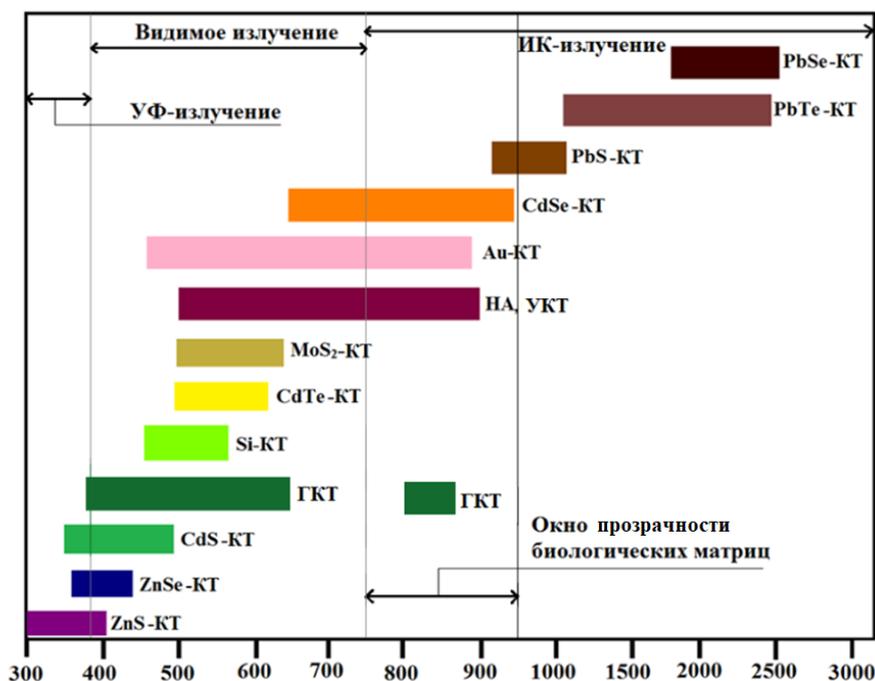


Рисунок 6 — Области флуоресценции КТ из различных полупроводниковых материалов:

НА — наноалмаз, УКТ — углеродные КТ, ГКТ — графеновые КТ [97]

### Квантовые точки на основе гетеропереходов

Такие КТ представляют собой интересный класс наноструктур, которые могут быть реализованы в виде систем типа ядро-оболочка (core-shell), где ядро состоит из одного полупроводника, а оболочка — из другого. Этот подход подразумевает формирование контакта между двумя компонентами, выполненными из различных полупроводниковых материалов. Несмотря на то, что энергетические характеристики КТ могут быть концептуально описаны с использованием модели поведения частиц, таких как электроны, дырки и экситоны, следует отметить, что нанокристалл ядра не создает бесконечного потенциального барьера для удержания экситонов, что является важным отличием данного подхода. В КТ структура решетки нанокристалла резко заканчивается на его поверхности и может привести к локализованным состояниям «ловушки» в пределах квантовой ограниченной запрещенной зоны. Состояния «ловушек» могут иногда наблюдаться как излучение в запрещенной зоне, проявляясь в виде широкого пика на батохромной стороне ожидаемого излучения на границе полосы.

В соответствии с классической теорией гетеропереходов можно выделить несколько типов КТ ядро-оболочка (Рисунок 7) [3].

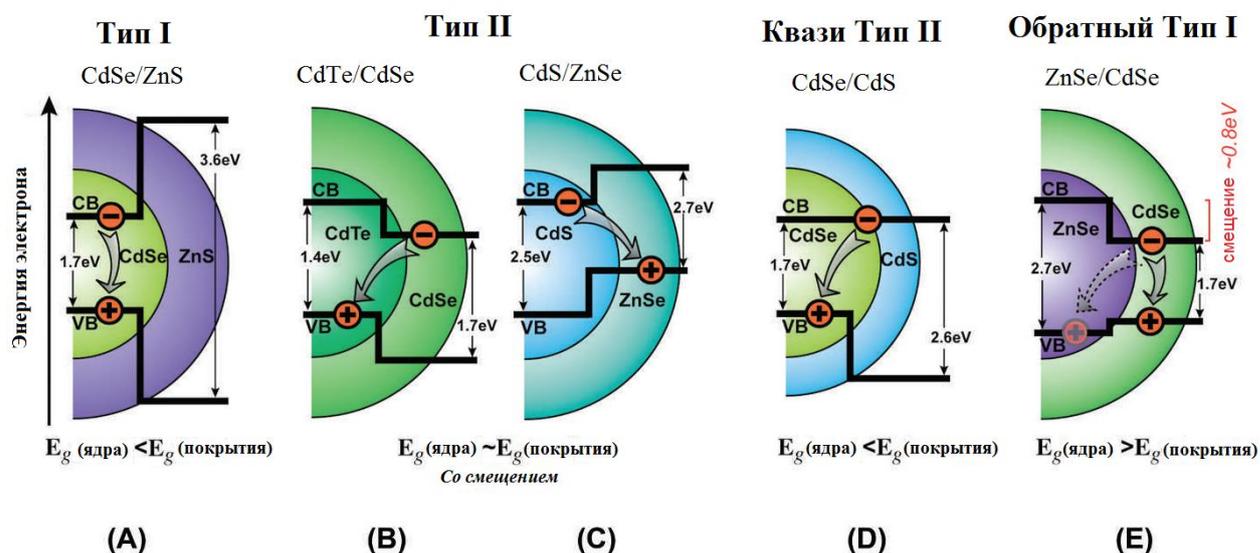


Рисунок 7 — Схематичное строение и зонная диаграмма для КТ ядро-оболочка с гетеропереходом: (A) Тип I с локализацией обоих зарядов в ядре. (B) Тип II с локализацией электрона в оболочке. (C) Тип II с локализацией дырки в оболочке. (D) Квази-тип II с локализацией электрона как в ядре, так и в оболочке. (E) Обратный тип I с локализацией обоих носителей в оболочке [3]

Тип I представляет собой конфигурацию, в которой оболочка состоит из широкозонного полупроводника, а ядро — из узкозонного (Рисунок 7А), например, КТ состава CdSe/ZnS или CdTe/CdS. В такой структуре более широкозонный полупроводник выполняет функцию пассиватора поверхностных состояний, что способствует локализации экситонной пары внутри ядра. Такой подход направлен на повышение эффективности люминесценции наночастиц. Данная конфигурация является наиболее распространенной для биоаналитических приложений, так как она обеспечивает оптимальное удержание экситонов и максимальные скорости излучательной рекомбинации, что, в свою очередь, приводит к более яркой флуоресценции. Структура на этом не завершается, а наращиваются дополнительные слои, что сопровождается bathochromic сдвигом на 5–10 нм в спектре флуоресценции КТ.

Тип II характеризуется тем, что ширины запрещенных зон полупроводников сопоставимы, однако их энергетические уровни смещены относительно друг друга. К данному типу можно отнести КТ состава CdTe/CdSe и CdSe/ZnTe (Рисунок 7В). В таких нанокристаллах фотовозбужденным носителям заряда становится энергетически выгодно находиться в различных частях структуры: например, электрону предпочтительнее располагаться в оболочке, в то время как дырке — в ядре (или наоборот). КТ типа II демонстрируют пространственное разделение носителей заряда, что делает их перспективными для разработки систем с увеличенным временем жизни фотовозбужденной экситонной пары, благодаря снижению перекрытия волновых функций электрона и дырки. Кроме того, одной из особенностей данной конфигурации является уменьшение эффективной ширины запрещенной зоны, которая определяется разностью энергий между краем зоны проводимости оболочки и краем валентной зоны ядра, а также смещение максимума люминесценции в область длинных волн. КТ типа II являются потенциальными излучателями в БЛИК области спектра, и рост второй оболочки типа I (например, CdSe/CdTe/ZnSe) может повысить КВ; однако также активно разрабатываются другие КТ типа I и легированные БЛИК-излучатели (например, InAs/ZnSe [98], InAs/CdSe [99], InAs/InP [100, 101], Cu:InP/ZnSe [102]).

Существуют еще два типа КТ. Один из них — квази тип II (Рисунок 7D), который характеризуется очень маленьким смещением между краями зон проводимости ядра и оболочки, так что электрон делокализован по всему нанокристаллу, а дырка ограничена ядром. Второй — обратный типу I (например, CdS/CdSe, ZnSe/CdSe), в котором локализация как электрона, так и дырки происходит в оболочке. Состояние края зоны для оболочки является промежуточным состоянием ядра (Рисунок 7E). На такие структуры

обычно наращивают второй слой оболочки типа I (например, ZnSe/InP/ZnS) для увеличения интенсивности флуоресценции.

В настоящее время множество исследований направлено на синтез структур КТ ядро/оболочка/оболочка. Наиболее распространенными и изученными из них являются: CdTe/CdS/ZnS, CdSe/CdS/ZnS. Интерес к синтезу таких структур был обусловлен тем, что некоторые КТ, например, CdSe/ZnS имеют дефекты, связанные с большим рассогласованием между параметрами кристаллической решетки. Для решения данной проблемы используется средний слой CdS — оболочка с промежуточными параметрами кристаллической решетки [103, 104].

Халькогениды кадмия [105] являются наиболее популярной и хорошо изученной группой материалов, которые люминесцируют в области видимого и БЛИК диапазона. КТ на основе халькогенидов кадмия находят свое применение в биоанализе в качестве флуоресцирующих меток.

### 1.2.2 Методы химического синтеза квантовых точек

На сегодняшний день существуют два основных метода коллоидного синтеза КТ (Рисунок 8), детально описанные в работах [106, 107].

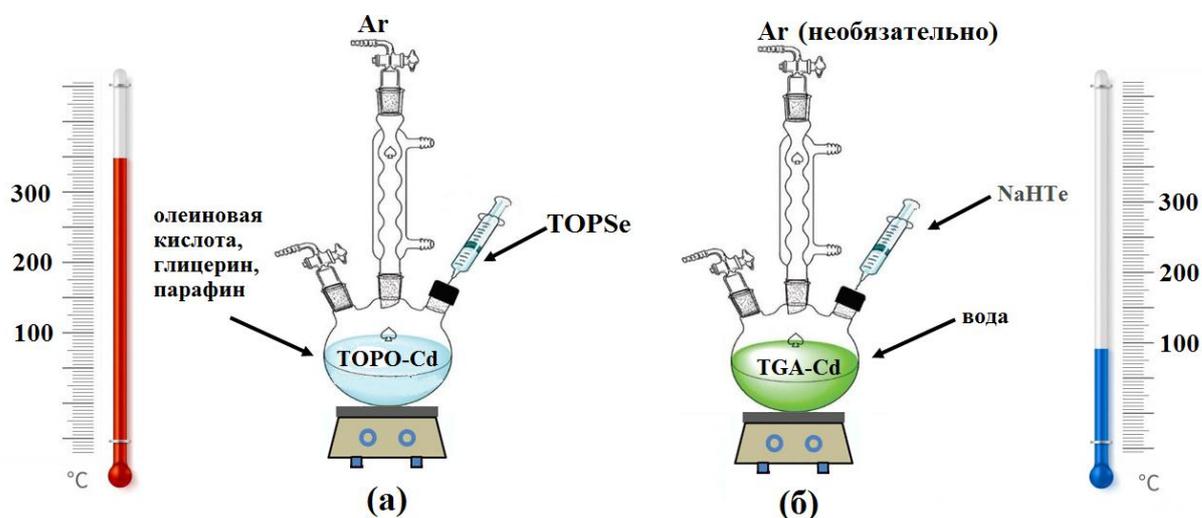


Рисунок 8 — Схематическое представление двух основных методов синтеза КТ: металлоорганический коллоидный синтез МКС (а) и водный коллоидный синтез ВКС (б) [108]

Один из них — это металлоорганический коллоидный синтез (МКС) (Рисунок 8а), который осуществляется при высоких температурах с использованием высококипящих органических растворителей, такие как три-*n*-октилфосфиноксид (ТОРО), триоктилфосфин (ТОР) или гексадециламин (НАД). Данные соединения выполняют двойную функцию: они

служат как растворителями, так и лигандами, образуя обычно смесь поверхностно-активных веществ. Для соединения координирующего растворителя (ТОРО или НАД) с прекурсорами металла (например, стеарат кадмия, ТОРО-Cd) и халькогенида (ТОР-Se) используются высокие температуры, достигающие примерно 300 °С. При таких условиях прекурсоры ТОРО-Cd и ТОР-Se становятся неустойчивыми, что требует создания инертной атмосферы для предотвращения нежелательных реакций. В процессе синтеза лиганды связываются с поверхностью КТ через свои концевые функциональные группы, такие как фосфины, фосфиноксиды и амины (Рисунок 9). Это приводит к образованию длинного алкильного монослоя, при этом алкильные цепи ориентированы от поверхности. В результате КТ приобретают высокую гидрофобность и становятся растворимыми исключительно в неполярных растворителях, таких как толуол, хлороформ и гексан, что создает определенные трудности при использовании КТ в качестве биомаркеров. Для понижения токсичности синтеза можно использовать в качестве растворителей и координирующих агентов олеиновую и стеариновую кислоты, оливковое масло [106]. Помимо этого, возможно проводить синтез и в не координирующей среде [107], такой как октадецен [109].

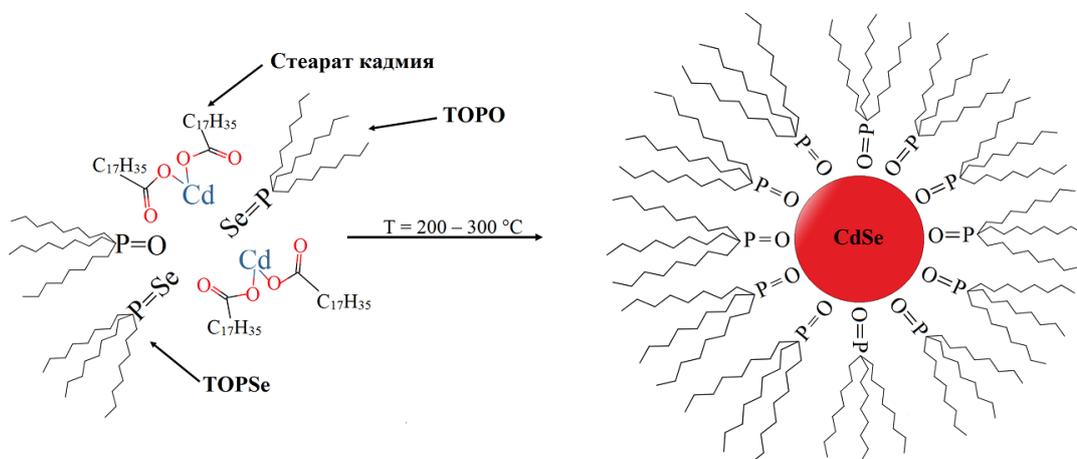


Рисунок 9 — Схема синтеза CdSe КТ методом МКС

Вторым способом является водный коллоидный синтез (ВКС) (Рисунок 86) [108]. Данный метод предполагает непосредственный водный синтез КТ с использованием нетоксичного и наиболее биосовместимого растворителя, воды. В рамках ВКС прекурсоры тяжелых металлов, такие как CdCl<sub>2</sub>, Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> и Cd(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, растворяются в воде и координируются с гидрофильными агентами, включая тиогликолевую кислоту (ТГК) [110, 111, 112], изоаскорбиновую кислоту [113], L-цистеин (L-cys) [114], глутатион [115], меркаптоэтиламин [116] и меркаптоянтарную кислоту [117]. Источником халькогена

служат свежеприготовленные в водной среде NaHE (где E = Se, Te), которые получают путем химического восстановления селена (Se) или теллура (Te) с использованием борогидрида натрия (NaBH<sub>4</sub>). Поскольку NaHE подвержен окислению кислородом из воздуха, синтез осуществляется в инертной атмосфере. После введения одного из прекурсоров в горячий раствор другого компонента, смесь кипятят с использованием обратного холодильника для ускорения роста КТ. В процессе синтеза координирующие агенты связываются с поверхностью квантовых точек через функциональную группу (-SH), оставляя гидрофильные группы доступными для последующих этапов биоконъюгации [97] (Рисунок 10).

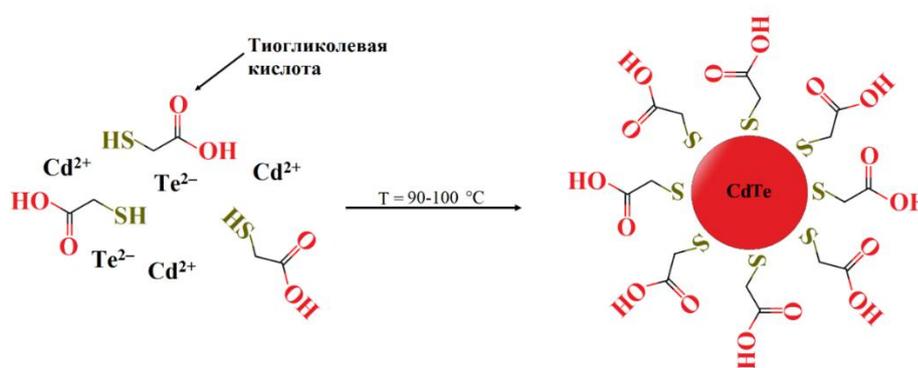


Рисунок 10 — Реакция образования CdTe КТ методом ВКС

КТ, синтезированные с использованием метода МКС, характеризуются узким пиком люминесценции и высоким квантовым выходом (КВ). Однако реализация данного метода осложняется необходимостью применения органических растворителей и высоких температур. Кроме того, КТ, полученные таким образом, обладают гидрофобными свойствами, что делает их непригодными для биоаналитических приложений и требует дополнительной стадии гидрофилизации, что, в свою очередь, приводит к значительному снижению КВ. В сравнении с этим, КТ, синтезированные методом ВКС, имеют более широкий пик люминесценции, меньший КВ и относительно низкую стабильность. Основными преимуществами метода ВКС по сравнению с МКС являются более низкие температуры синтеза, отсутствие токсичных и дорогостоящих органических растворителей, а также возможность получения гидрофильных КТ в одну стадию [118]. С учётом преимуществ и недостатков ВКС метода синтеза, его исследование заслуживает особое внимание.

Влияние различных факторов на скорость роста, а также физико-химические и оптические свойства КТ является предметом активных исследований. К числу этих

факторов относятся выбор стабилизаторов, соотношение реагентов, рН среды и продолжительность синтеза. Наиболее часто используемыми стабилизаторами являются тиол-содержащие лиганды, применяемые в мольном соотношении Cd:стабилизатор 1:2 [119-122]. Уменьшение количества стабилизатора может привести к недостаточному покрытию КТ, что вызывает снижение КВ и ухудшение стабильности получаемых наночастиц [123]. Наилучшие характеристики КТ были достигнуты при использовании L-cys в мольном соотношении Cd:стабилизатор 1:1,2 [124].

Помимо вышеуказанных параметров на характеристики синтезированных КТ значительное влияние оказывает природа стабилизатора. В частности, использование L-cys в качестве стабилизатора приводит к смещению максимума флуоресценции в более длинноволновую область [124]. Данное явление можно объяснить образованием водородных связей между адсорбированными тиолами на поверхности КТ, что, в свою очередь, приводит к смещению люминесценции в более длинноволновую область. Это смещение обусловлено передачей энергии экситонов между КТ, а не увеличением размеров самих наночастиц [125].

Длина алкильной цепи стабилизатора также оказывает значительное влияние на спектральные свойства КТ [126]. Использование в качестве стабилизаторов меркаптокарбоновых кислот с короткими цепями (например, ТГК, МПК) сдвигает максимумы поглощения и флуоресценции в более длинноволновую область, в то время как использование лигандов с длинными цепями, таких как меркаптогексановая кислота, меркаптоундекановая кислота и объемных лигандов меркаптоянтарной кислоты замедляют рост частиц, приводя к сдвигу максимумов поглощения и флуоресценции в коротковолновую область спектра.

На оптические свойства КТ большое влияние оказывает рН среды [116]. КТ, покрытые лигандами с карбоксильными функциональными группами, стабильны в диапазоне рН 5 – 10. Снижение рН среды приводит к резкому спаду интенсивности флуоресценции, которое обусловлено уменьшением отрицательного поверхностного заряда и образованием агрегированных микрочастиц [116, 127]. Показано, что стабильность и размер получаемых КТ зависят от времени синтеза [128, 124]. При синтезе CdSe КТ, также показано, что на интенсивность флуоресценции оказывает влияние температура синтеза. КТ, синтезированные при 150 °С проявляют большую интенсивность флуоресценции чем КТ, синтезированных при 100 °С. При анализе литературных данных по ВКС КТ было обнаружено, что в статьях уделено мало внимания стабильности КТ в водных средах, в связи с чем является перспективным синтезировать КТ при высоком соотношении Cd:стабилизатор.

## Синтез квантовых точек со смешанным ядром

В последнее время привлекают внимание КТ со смешанными ядрами на основе твердых растворов. Наиболее распространенным среди хальгенидных КТ являются CdTeSe КТ, т.к. с использованием такого материала можно получить наночастицы, флуоресцирующие в видимой и ИК-области спектра. Смешанное ядро CdTeSe представляет собой трехкомпонентный твердый раствор, т.е. нанокристалл, имеющий в узлах своей кристаллической решетки атомы кадмия, теллура и селена. Правильным обозначением такой структуры служит запись  $CdTe_xSe_{(1-x)}$  или  $(CdTe)_x(CdSe)_y$ , однако, в литературе распространено сокращение CdTeSe. Как говорилось ранее, КТ состава CdTe преимущественно соответствует кристаллическая структура сфалерита, а CdSe КТ – кристаллическая структура вюрцита. КТ CdTeSe, являющиеся твердым раствором  $(CdTe)_x(CdSe)_y$ , образуют кристаллическую решетку сфалерита путем замещения узлов исходной кристаллической решетки. Так как параметры решеток CdTe ( $a = 6,48 \text{ \AA}$ ) и CdSe ( $a = 4,309 \text{ \AA}$ ,  $c = 7,021 \text{ \AA}$ ) имеют близкие значения, нанокристаллы их твердых растворов имеют структуру с высокой степенью однородности [129, 130]. С добавлением в систему CdTe атомов селена, в ее электронной структуре появляются разрыхляющие орбитали с более низкой энергией, соответствующие CdSe, в то время как связывающие орбитали CdTe имеют большие энергии, что приводит к уменьшению эффективной ширины запрещенной зоны CdTeSe КТ и сдвигу спектра их люминесценции в ИК-область относительно CdTe и CdSe КТ. Благодаря комбинированному составу появляется возможность изменения молярных отношений Te и Se в КТ, и, таким образом, менять их оптические свойства при фиксированном размере. В таблице 2 представлены спектральные и размерные характеристики CdTeSe КТ в зависимости от соотношения Te и Se.

Таблица 2 — Спектральные и размерные свойства CdTeSe КТ в зависимости от соотношения Te:Se

Структура КТ	Максимум флуоресценции, нм	Размер КТ, нм	Литература
$CdTe_{0.2}Se_{0.8}$	730	5,4-5,1	[131]
$CdTe_{0.4}Se_{0.6}$	750	5,4-5,1	[131]
$CdTe_{0.5}Se_{0.5}$	775	5,4-5,1	[131]
	570-750	3,8	[132]
$CdTe_{0.6}Se_{0.4}$	740	5,4-5,1	[131]
$CdTe_{0.8}Se_{0.2}$	720	5,4-5,1	[131]
$CdTe_{0.75}Se_{0.25}$	570-700	4,1	[132]

Необходимо заметить, что КТ со смешанным ядром флуоресцируют в БЛИК области спектра, что отвечает требованиям использования в медицинской диагностике. Для улучшения их характеристик КТ со смешанным ядром также покрывают дополнительными слоями. Смешанные КТ покрывают различными полупроводниками: CdTeSe/ZnSe [131], CdTeSe/ZnS [133], CdTeSe/ZnSe/ZnS [134], CdTeSe/CdZnS [135].

#### **Влияние дополнительных полупроводниковых оболочек на свойства квантовых точек**

Несмотря на большее количество исследований в области изучения оптических свойств КТ, одним из препятствий на пути использования КТ в биомедицине является наличие дефектов различной природы, которые влияют на фотофизические процессы в КТ. Дефекты могут быть сосредоточены как в объеме, так и на поверхности КТ. При формировании КТ возрастает удельная доля поверхности атомов, которые обычно имеют оборванные связи. Наличие некомпенсированных связей приводит к формированию локализованных энергетических состояний в КТ. Эти локализованные состояния могут играть роль центров люминесценции, а также центров безызлучательной рекомбинации, наличие которых приводит к снижению КВ люминесценции и уменьшению жизни экситона [136].

Для уменьшения концентрации дефектов кристаллической структуры, находящихся в объеме КТ обычно используют высокотемпературные методы синтеза КТ, либо в случае методик водного синтеза применяется последующая термообработка полученных КТ.

Для уменьшения количества дефектов, локализованных на поверхности КТ, используют либо поверхностно-активные вещества для компенсации поверхностных связей, либо используют более широкозонные проводники. Получающиеся при этом структуры называют структурами ядро/оболочка. Помимо уменьшения дефектов, дополнительный слой защищает ядро от фотоокисления и уменьшает токсичность [137].

Исходными материалами для таких структур обычно выступают заранее подготовленные очищенные растворы наночастиц-ядер (например, CdSe, CdTe КТ), которые выступают в качестве зародышей для роста оболочки. Все процедуры синтеза в целом повторяют описанные выше за исключением этапа роста зародышей. При этом для роста оболочки обычно используются меньшие температуры. Также важно избегать дополнительной нуклеации полупроводника (например, ZnS), которым покрывается ядро, поэтому его прекурсоры (соединения цинка и серы) добавляются постепенно [138]. В работе [139] было показано, что наращивание каждого дополнительного слоя на ядра КТ увеличивает квантовый выход флуоресценции в 3,11 раза. Квантовый выход КТ состава CdSe/CdS/ZnS составил 84%.

### 1.2.3. Квантовые точки с флуоресценцией в ближней ИК-области спектра

Как упоминалось ранее, для использования КТ в биологической диагностике к КТ предъявляется еще одно требование — флуоресценция в БЛИК области спектра в окне прозрачности биологической матрицы (Рисунок 6). Такие КТ широко используются для визуализации тканей. Светопоглощающие и рассеивающие свойства тканей (таких как гемоглобин, белки) могут снижать флуоресцентный сигнал. Кроме того, спектр автофлуоресценции эндогенных флуорофоров (таких как коллаген) и испускание традиционных флуоресцентных меток для обнаружения в значительной степени перекрываются при длинах волн видимого света (400 – 700 нм) [140]. В этом окне рэлеевское рассеяние уменьшается с увеличением длины волны, и основные хромофоры (гемоглобин и вода) имеют локальные минимумы поглощения. Следовательно, длины волн БЛИК излучения могут глубоко проникать в ткани и обеспечивать огромный потенциал для применения в аналитических целях.

В качестве зондов в БЛИК области используются следующие КТ:

БЛИК-КТ III–V типа — это КТ на основе InAs и GaAs, для которых достигается флуоресценция КТ в диапазоне (700 – 1400 нм).

БЛИК-КТ IV–VI типа — это PbX КТ, где X = S, Se, Te (600 – 1600 нм).

БЛИК-КТ II–VI типа — CdX, ZnX, и HgX КТ, где X = S, Se, Te, для которых можно достичь 600–800 нм без покрытия и с дополнительным наращиванием слоев до 1100 нм.

В работе [141] были разработаны КТ, флуоресцирующие в БЛИК на основе наночастиц лантаноидов, состоящих из NaY<sub>4</sub>: 7% Yb, 60% Nd. Авторы утверждают, что с использованием таких меток не возникало мешающего влияния биологических объектов при проведении ИХА.

Необходимо заметить, что на определяемый сигнал в видимой области оказывает влияние автофлуоресценция нитроцеллюлозной мембраны (НЦМ), используемой в качестве аналитической мембраны в тест-полосках [142]. В данной работе было проведено определение автофлуоресценции нитроцеллюлозной мембраны и время жизни флуоресценции. На рисунке 11 представлена зависимость автофлуоресценции пористой нитроцеллюлозы от длины волны возбуждения. Видно, что с увеличением длины волны возбуждения флуоресценция снижается.

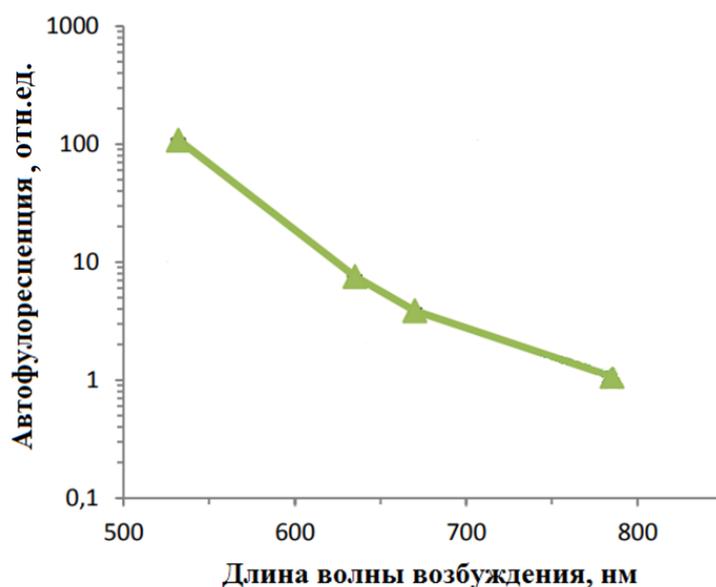


Рисунок 11 — Автофлуоресценция пористой нитроцеллюлозы при различной длине волны возбуждения на длине волны 785 нм [143]

Таким образом НЦМ флуоресцирует в диапазоне 500 – 600 нм [144]. Матрица образца после проведения ИХА также может влиять на сигнал — автофлуоресценция бычьего сывороточного альбумина (БСА), используемого для создания тест-систем, находится в области 600 – 700 нм [145].

Для конъюгации обычно используются КТ, люминесцирующие в БЛИК — 700 – 900 нм. Такие КТ подходят для получения конъюгатов и использования в биомедицине, т.к. в данной спектральной области минимальная поглотительная способность биологических тканей. Также они подходят для иммунохроматографического анализа, т.к. в БЛИК области минимальная автолюминисценция нитроцеллюлозы, из которой изготавливаются тест-полоски. Как правило, КТ с высоким КВ получают в органической фазе и требуют стадии гидрофилизации или модификации для получения устойчивых объектов.

#### 1.2.4 Методы гидрофилизации и модификации квантовых точек

Большинство КТ, синтезированных высокотемпературным металлоорганическим методом, покрыты неполярными органическими лигандами (например, триоктилфосфиноксидом (ТОРО) и октадециламином) и нерастворимы в водной среде. Для получения водорастворимых КТ и предотвращения агрегации или осаждения КТ в водном растворе, необходима модификация поверхности наночастиц. Наиболее широко известными являются два метода гидрофилизации (Рисунок 12): 1) метод замены лигандов [146], например, гидрофобный слой в ТОР-КТ заменяют гидрофильными молекулами,

такими, как амины, полигидроксиспирты, тиолы; 2) инкапсулирование амфифильным полимером [3].

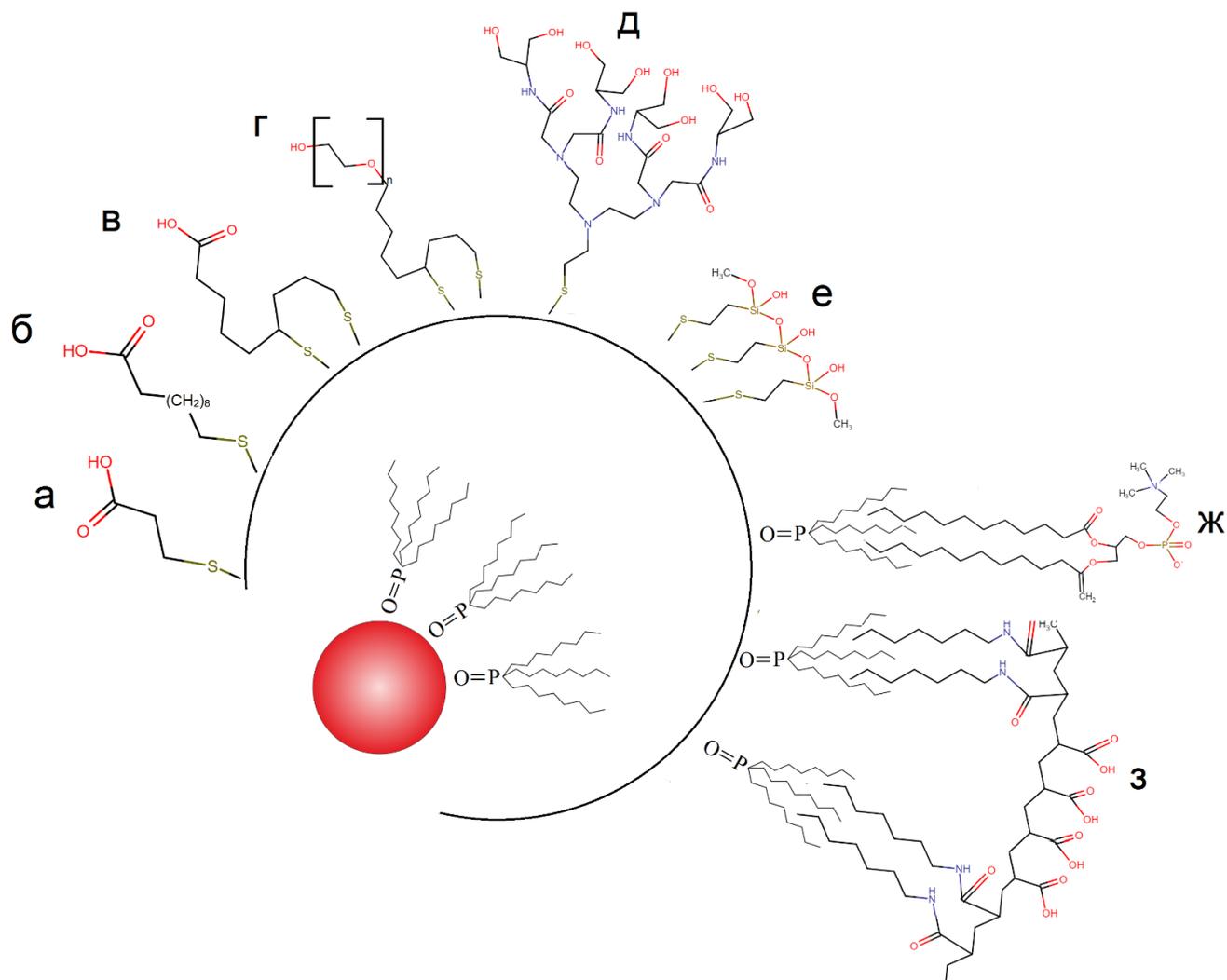


Рисунок 12 — Методы гидрофилизации КТ: метод замены лигандов (а-е), покрытие амфифильной молекулой (ж, з)

Далее более подробно рассмотрим методы гидрофилизации КТ, синтезированных в неполярных растворителях.

### Метод замены лигандов

Наиболее распространенным подходом стабилизации нанокристаллов в водных растворах является метод замены лигандов. В этом случае производят обмен молекул гидрофобного поверхностно-активного вещества на бифункциональные молекулы, которые являются гидрофильными на одном конце и гидрофобными на другом [37]. В качестве бифункциональных молекул часто используются производные тиолов, тиольные

группы (-SH) которых связываются с КТ, а гидрофильные, например, -COOH группы, остаются на поверхности (Рисунок 12 а-е). Наиболее распространенными тиольными молекулами, используемыми для стабилизации полупроводниковых КТ в водных средах, являются тиольные алифатические карбоновые кислоты, такие как меркаптоуксусная кислота, МПК или меркаптоундекановая кислота. Очень часто используют дигидролипоевую кислоту или ее производные (Рисунок 12 в, г), связанные с молекулой полиэтиленгликоля. Благодаря бидентатному хелатному эффекту дитиольных групп происходит прочное взаимодействие таких молекул с поверхностью КТ. Кроме того, липоевая кислота, связанная с полиэтиленгликолем служит спейсером для дальнейшей конъюгации КТ с биомолекулами.

Очевидным недостатком данных КТ является их устойчивость только в средах с невысокой ионной силой и  $pH > 7$ . Другим недостатком КТ, покрытых тиокислотами, является их низкая стабильность во времени из-за легкости окисления тиольных групп до дисульфидных, которые, в свою очередь, не связываются с поверхностными атомами КТ, и нанокристаллы выпадают в осадок. Кроме того, замена гидрофобных лигандов на меркаптопроизводные может приводить к падению КВ, поскольку тиольная группа при контакте с флуоресцирующим ядром вызывает снижение интенсивности флуоресценции [96].

### **Метод покрытия оксидом кремния**

Одним из наиболее предпочтительных методов является покрытие КТ оксидом кремния [147]. Этот метод также называется силанизацией поверхности [148]. Он включает в себя замену исходных гидрофобных лигандов (например, ТОРО) на молекулы силанизирующих агентов, таких как меркаптопропилтрис(метилокси)силан [149], которые затем сшиваются с образованием оболочки оксида кремния вокруг КТ (Рисунок 12 е) [150]. Для улучшения стабильности и биосовместимости в слой оксида кремния вводят полиэтиленгликолевые цепи. Поскольку кремниевые оболочки имеют сильную поперечную связь, силанизированные КТ чрезвычайно стабильны. Силанизация предпочтительна также потому, что она менее токсична по сравнению с другими лигандами.

### **Покрывание дендримерами**

В последнее время для модификации КТ используются высокомолекулярные соединения, а именно дендримеры (или дендроны) — это сверхразветвленные,

монодисперсные макромолекулы со сложной регулярной структурой и строго определенным химическим составом. Они привлекли свое внимание из-за наличия большого числа терминальных функциональных групп и из-за превосходной растворимости. Манипулирование структурными особенностями дендримеров позволяет контролировать синтез целого ряда высокоразветвленных макромолекул с конечными функциональными группами [151]. По механизму гидрофилизации данный метод относится к методу замены лигандов (Рисунок 12 д). Для модификации используются полиамидаминные дендримеры, имеющие тиольную группу на одном конце, направленные к КТ, и гидрофильные гидроксогруппы [152], либо карбоксильные или аминогруппы от поверхности КТ [153, 154].

### **Метод покрытия гидрофобных КТ амфифильными молекулами**

Кроме замены гидрофобного поверхностно-активного вещества существует метод покрытия КТ амфифильными молекулами, в этом случае КТ покрыты сшитым амфифильным полимером. Амфифильные молекулы, используемые для покрытия КТ, имеют гидрофобные (как правило, углеводородные) цепи для связи с лигандами, изначально покрывающими КТ, и гидрофильные группы (например, карбоксильные), благодаря которым КТ стабилизируются в водном растворе и через которые КТ связываются с биомолекулами (Рисунок 12 ж, з). Чаще всего в роли амфифильных молекул выступают молекулы полимеров, поскольку одна молекула полимера имеет несколько гидрофобных фрагментов, что позволяет образовывать многочисленные связи с поверхностью КТ посредством гидрофобных взаимодействий [155]. Они возникают в результате контакта между неполярными радикалами, неспособными разорвать водородные связи между молекулами воды, в результате этого вода вытесняется на поверхность гидрофильных молекул [156]. Использование полимерных амфифильных молекул вместо низкомолекулярных реагентов приводит к образованию гораздо более стабильных во времени растворов КТ, поскольку одна полимерная молекула образует сразу много связей с одной КТ. Важно подчеркнуть, что исходные лиганды остаются на поверхности КТ, то есть в процессе гидрофилизации непосредственная поверхность КТ остаётся нетронутой, а это приводит к тому, что яркость флуоресценции практически не падает после перевода КТ в воду.

### 1.3 Взаимодействие «антитело-антиген»

Рассмотрим строение иммуноглобулинов на примере молекулы IgG, содержание которой в сыворотке крови человека в норме составляет 70 – 75% от общего количества сывороточных антител. Данная молекула состоит из трех фрагментов, два из которых идентичны и сохраняют способность связывать антигены — это Fab-фрагменты (от англ. «Fragment Antigen Binding» — фрагмент, связывающий антиген) и третий — Fc-фрагмент, способный к кристаллизации (от англ. «Fragment Crystallizable» — кристаллизующийся фрагмент), обеспечивающий взаимодействие комплексов антиген-антитело с системой комплемента (Рисунок 13) [157].

В свою очередь, каждая полипептидная H- и L-цепь состоит из вариабельной, или V-области ( $V_L$  и  $V_H$ ), и константной (C-области,  $C_L$  и  $C_H$ ) области. Каждая из H- и L-цепей состоит из повторяющихся участков (доменов), насчитывающих около 100 – 150 аминокислотных остатков (Рисунок 13). Они соответствуют V-областям и C-областям H- и L-цепей [158].

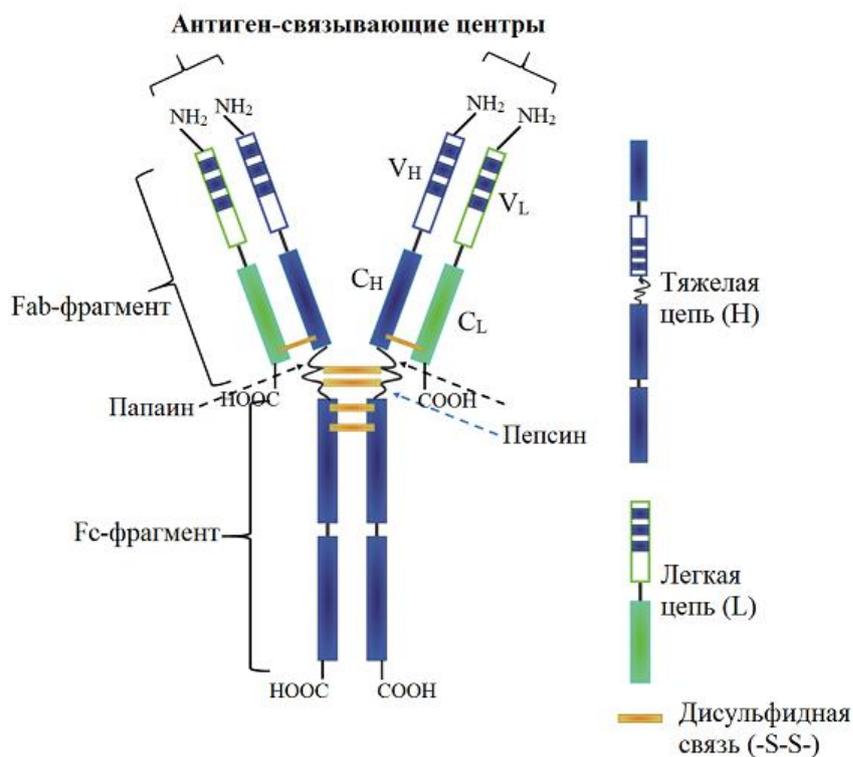


Рисунок 13 — Доменная структура иммуноглобулина G, по материалам [159]

Домены состоят из «петли», образованной соединением цистеиновых остатков посредством дисульфидных связей. «Петля» включает в себя около 60 аминокислот и 2 концевых участка, насчитывающих по 20 аминокислот [160].

Важнейшим свойством антитела является его способность распознавать и специфически взаимодействовать с антигенами. Это свойство антител обусловлено наличием у них антиген-распознающего участка, получившего название активного центра антитела, или паратопа. Паратоп образован V-доменами H- и L-цепей. V-домены характеризуются повышенной вариабельностью аминокислотного состава, данные участки называются гипервариабельными областями [161].

В свою очередь, участок антигена, с которым взаимодействует антитело, называется эпитопом (или антигенной детерминантой) (Рисунок 14) [161]. Большинство эпитопов, распознаваемых антителами, представляют собой трёхмерные структуры на поверхности молекул антигенов, которые точно совпадают по форме и пространственному расположению электрических зарядов с соответствующими паратопами антител. Связывание антитела с антигеном зависит от обратимых нековалентных взаимодействий, при этом комплекс находится в равновесии со свободными компонентами. Место связывания антитела может содержать от 6 до 10 аминокислот. Небольшие изменения в структуре антигена (например, одной аминокислоты) могут повлиять на силу взаимодействия антитело-антиген. Мера силы связывания называется аффинностью, и она обычно выражается через равновесную константу образования иммунокомплекса антитело-антиген. Обычно константа варьируется от микро ( $10^{-6}$ ) до пико ( $10^{-12}$ ) М (моль/л) [162]. Антитела с высоким сродством могут связывать больше антигена за более короткий период времени, чем антитела с низким сродством, и они образуют более стабильные комплексы. Следовательно, антитела с высоким сродством обычно предпочтительнее в иммунохимических методах.

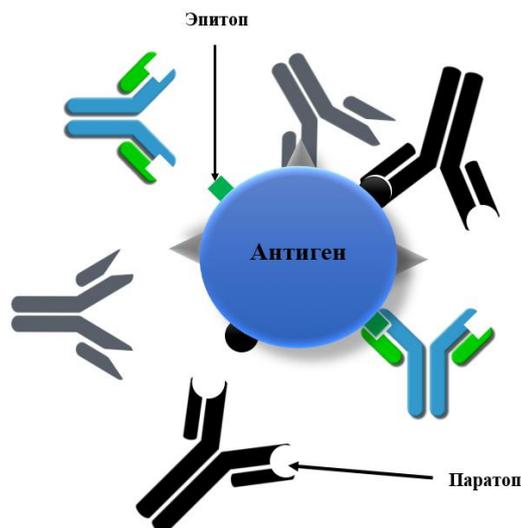


Рисунок 14 — Схематичное представление эпитопа и паратопа

Исключение составляют линейные эпитопы, свойства которых определяются характерной первичной структурой, а не пространственной организацией полипептидной цепи [163].

Авидность является еще одним параметром, используемым для характеристики реакции связывания антитело-антиген [164]. Это мера общей стабильности комплекса, определяемая сродством антитела к эпитопу, числом сайтов связывания на молекулу антитела и геометрическим расположением взаимодействующих компонентов. Авидность определяется всеми факторами связывания, и определяет успех всех иммунохимических методов [165, 166]. Антитела обычно являются высокоспецифичными для антигена. Однако некоторые антитела проявляют перекрестную реактивность к аналогичным эпитопам на других молекулах [165]. Это делает иммунохимический метод менее специфичным, но в то же время более применимым к ситуациям, когда мишенью является класс структурно связанных молекул.

### 1.3.1 Вирус болезни Ауески

В настоящей работе в качестве модельного антигена использовались непатогенные для человека белки ВБА. Болезнь Ауески — это вирусное заболевание грызунов и домашних животных, известное также под названиями псевдобешенство, дикование, инфекционный бульбарный паралич, зудящая чума и др. Возбудитель — Herpesvirus, рода Varicellavirus, герпесвирус свиней 1-го типа. Вирус поражает кожные покровы и ЦНС, вызывая парезы, параличи конечностей и гибель животных. Болезнь заключается в воспалении головного и спинного мозга, сопровождающимся сильным местным зудом.

Больные и переболевшие животные, еще долгое время, оставаясь вирусоносителями, выделяют возбудитель в окружающую среду через носовую слизь, молоко и т.д. [167].

Резервуарным хозяином являются свиньи, но заражению подвержены и животные других классов (крупный рогатый скот, овцы, собаки, кошки, грызуны). Заражение происходит при контактах с инфицированными свиньями, при поедании мяса больных животных. Инкубационный период длится обычно 3 – 8 дней, но сама болезнь часто заканчивается быстрой смертью [167].

Гликопротеины представляют наиболее охарактеризованную группу белков ВБА. Идентифицировано до 17 гликопротеинов ВБА — gB, gC, gE, gD, gI, gG, gH, gK, gL, gM и gN. Гликопротеины ВБА участвуют в ключевых событиях репликации вирусов и являются основными индукторами защитного иммунитета. Гликопротеин gB является самым консервативным среди всех гликопротеинов герпесвирусов. Установлено, что gB необходим для развития вируса. Это делает gB ВБА перспективной мишенью для разработки модельных диагностических тест-систем для выявления ВБА в биологических жидкостях. Таким образом, мы ориентировались на систему для выявления gB ВБА в качестве модельной в рамках создания иммунохроматографических тест-систем на основе конъюгатов с КТ [168].

#### **1.4 Биоконъюгация с квантовыми точками**

Для использования коллоидных КТ в качестве флуоресцентных меток необходимо провести процесс биоконъюгации, то есть создать стабильную связь между двумя объектами, одним из которых является биомолекула [169]. Существует два основных подхода для связывания КТ с биомолекулами (Рисунок 15): нековалентное и ковалентное связывание. Нековалентное связывание достигается за счет физической адсорбции. Ковалентное требует образования ковалентной связи между лигандами на КТ и биомолекулой, например, с использованием связующих агентов. Отдельно можно выделить биортогональное ковалентное связывание, где биоконъюгация проходит хемоселективно. В процессе биоконъюгации нужно учитывать следующие факторы [170]:

- 1) биоконъюгация не должна повлиять на активность биомолекулы;
- 2) в процессе биоконъюгации нанометки не должны утратить свои флуоресцентные свойства;
- 3) количество биомолекул на поверхности КТ должно контролироваться;
- 4) полученные биоконъюгат должен быть стабильным в физиологических условиях;

- 5) биоконъюгат не должен связываться неспецифически с биологическими системами, и поэтому при необходимости следует применять блокировку непрореагировавших связующих центров.



Рисунок 15 — Блок-схема различных видов конъюгации КТ с биомолекулами

Ковалентная связь между КТ и биомолекулами может быть осуществлена с помощью различных типов связующих агентов — кросс-линкеров. Кросс-линкеры (или кросс-сшивающие агенты) — это молекулы, содержащие две функциональные группы (одинаковые или различные) и предназначенные для конъюгации биомолекул. В работе [170] эти кросс-линкеры разделяют на три класса: нулевой длины, гомобифункциональные и гетеробифункциональные. Связывающие агенты нулевой длины выступают посредниками между двумя функциональными группами, образуя новую связь без дополнительных спейсеров. Гомобифункциональные агенты обладают двумя идентичными реакционными участками, по одному на каждом конце спейсерной молекулы, что позволяет проводить конъюгацию между двумя молекулами с идентичными функциональными группами. Гетеробифункциональные сшивающие агенты имеют два различных реакционных участка, которые могут образовывать ковалентную связь с двумя молекулами, имеющими различные функциональные группы на поверхности.

Перечисленные методы на рисунке 15 — это основные методы конъюгаций КТ с антителами. На этих методах основываются множество различных методик ковалентной

конъюгации, где модифицируют либо антитела [171], либо КТ [172], либо и КТ и антитела [173-175] для дальнейшей конъюгации их между собой. Наиболее распространенным, безопасным и эффективным методом связывания антител с КТ является карбодиимидный метод [176].

#### **1.4.1 Конъюгация карбодиимидным методом**

Ковалентное связывание аминной и карбоксильной групп чаще всего осуществляют при помощи 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид (EDC), который активирует карбоксильные группы, давая возможность связывания их с аминогруппами белка. EDC водорастворим, поэтому его можно добавлять прямо в реакционную смесь без использования органических растворителей. Вместе с тем, в реакции конъюгации с использованием EDC существует вероятность гидролиза, т.е. если целевая аминогруппа не успеет атаковать карбоксильную группу до гидролиза, конъюгация не произойдет (это особенно важно в работе с белками — когда белок находится в небольшой концентрации по отношению к воде). С этой целью в реакционную смесь добавляется N-гидроксисукцинимид (NHS) [177]. Более подробно карбодиимидный метод синтеза описан в обсуждении результатов.

Таким образом, реакция с использованием EDC/NHS обладает рядом преимуществ:

- реагент и побочные продукты водорастворимы;
- работа без органических растворителей;
- образование стабильной амидной связи.

Биомолекулы и биологические системы обладают разнообразием функциональных групп и реакционных участков, которые могут вызывать нежелательные побочные реакции. Важным является ориентированная конъюгация белков на КТ с целью сохранения функциональности белков. Кроме того, КТ должны селективно реагировать только с нужной функциональной группой биомолекулы.

#### **1.4.2 Ориентированная конъюгация антител**

В зависимости от используемого метода конъюгации иммобилизация антител на поверхности наночастиц может проходить специфичным или случайным образом, что определяет ориентацию антител. Идеальная ориентация антител в конъюгатах наночастиц-антитело возникает, когда Fc-область прикреплена к поверхности наночастиц, 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.

Адсорбция является одним из простейших методов конъюгации. Однако, из-за отсутствия специфичности, связанной с физическими и ионными взаимодействиями, имеет место случайная ориентация антител. Тем не менее тщательно контролируя рН раствора антител в диапазоне от 7,5 до 8,5 и, следовательно, заряд поверхности антител, можно довольно точно настроить ориентацию молекул [178].

Ковалентное связывание является более предпочтительным, поскольку ковалентные связи более устойчивы. Конъюгация за счет ковалентного связывания приводит к более упорядоченной ориентацией антител по сравнению с адсорбцией. Нековалентные подходы с использованием адаптерных биомолекул позволяют избежать случайно ориентированных антител. Однако эти Fc-связывающие белки дороги, и поскольку конъюгация является биологической по своей природе, связанные антитела могут быть обратно диссоциированы от Fc-связывающих белков, что ограничивает их применение [179].

Для ориентированной конъюгации антител на поверхности наночастицы очень часто используются фрагменты антител, где химическое взаимодействие происходит между тиольными группами антитела [180]. Другим способом ориентирования антител необходимым образом является использование гетеробифункциональных сшивающих агентов [181]. Несмотря на то, что такой подход позволяет ориентировать антитела с хорошим выходом реакции, он требует агрессивных сред, что может быть причиной потери функциональности антител.

Многие вышеуказанные способы ориентированной конъюгации сложны и сопряжены с риском снижения активности антител. В работах [182, 183] рассматривается более простой метод ориентированной конъюгации антител, используя распределение заряда и гидрофильность антител. Суть метода в том, что антитела связывают с поверхностью наночастиц за счет физической адсорбции с последующим химическим сшиванием в местах адсорбции. 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 определяет изоэлектрическую точку (pI) всего антитела, (Fab)<sub>2</sub> и Fc-фрагментов. При рН 5,8-7,8 почти каждая карбоксильная группа на поверхности наночастицы полностью депротонируется и заряжается отрицательно. Таким образом, при снижении рН до 5,8, с одной стороны, распределение заряда и гидрофобная область антител облегчает их ориентацию Fc-концом, а с другой стороны, снижается скорость сшивания, что дает антителам больше времени для полной корректировки своего направления под влиянием микроокружения антител и поверхности наносфер. В работе [184] методами молекулярного моделирования было определено распределение амино- и карбоксильных групп на

поверхности антитела (IgG) (Рисунок 16). Распределение основных и кислотных групп на поверхности антител неравномерно. Учитывая, что при адсорбции взаимодействие антитела и носителя происходит в большом количестве точек, то иммобилизация будет происходить на фрагменте с наибольшим количеством ионизированных аминокислотных остатков. Таким образом, регулируя значения pH, относительно pI, можно влиять на ориентацию биомолекул на поверхности носителя.

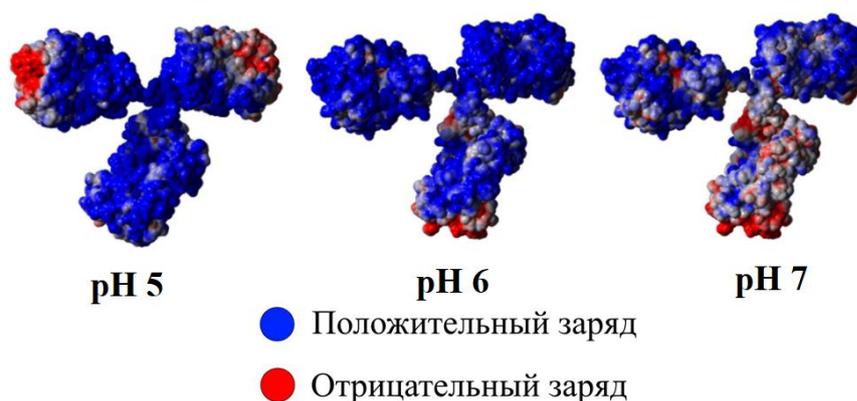


Рисунок 16 — Распределение заряженных аминокислотных остатков на поверхности IgG при различных значениях pH [184]

При ориентированной конъюгации с полноразмерными антителами необходимо, чтобы на наночастице иммобилизовалась Fc-область антитела. Для этого в работе [185] используют метод ковалентного связывания с использованием EDC/NHS. Связывание антител с карбоксиактивированной поверхностью является наиболее приемлемой стратегией, использующей силу ионного взаимодействия. Контролируя условия иммобилизации, карбоксильно-активированная матрица может демонстрировать преимущества быстрой обратимой электростатической адсорбции и ковалентного связывания, при этом активирующий агент оказывает значительное влияние на ориентацию связанных биомолекул. В работе [186] сообщается, что EDC/сульфо-NHS является наиболее эффективным активирующим реагентом из-за сохранения отрицательного заряда во время активации поверхности и последующей необратимой ковалентной конъюгацией.

Используя наночастицы с различными поверхностными зарядами, возможно осуществлять контроль над ориентацией антител на поверхности носителя. Область антитела, с наибольшей плотностью положительных или отрицательных зарядов адсорбируется на носители с противоположным знаком поверхностного заряда.

Длительная инкубация может способствовать образованию ковалентной связи с наиболее доступными аминокислотными группами антитела – фрагментами лизина. В следствие того,

что скорость адсорбции выше скорости образования ковалентных связей, процесс конъюгации можно разделить на 2 этапа. На первом этапе происходит электростатическая адсорбция, а во втором – ковалентное связывание с ближайшими к носителю аминогруппами.

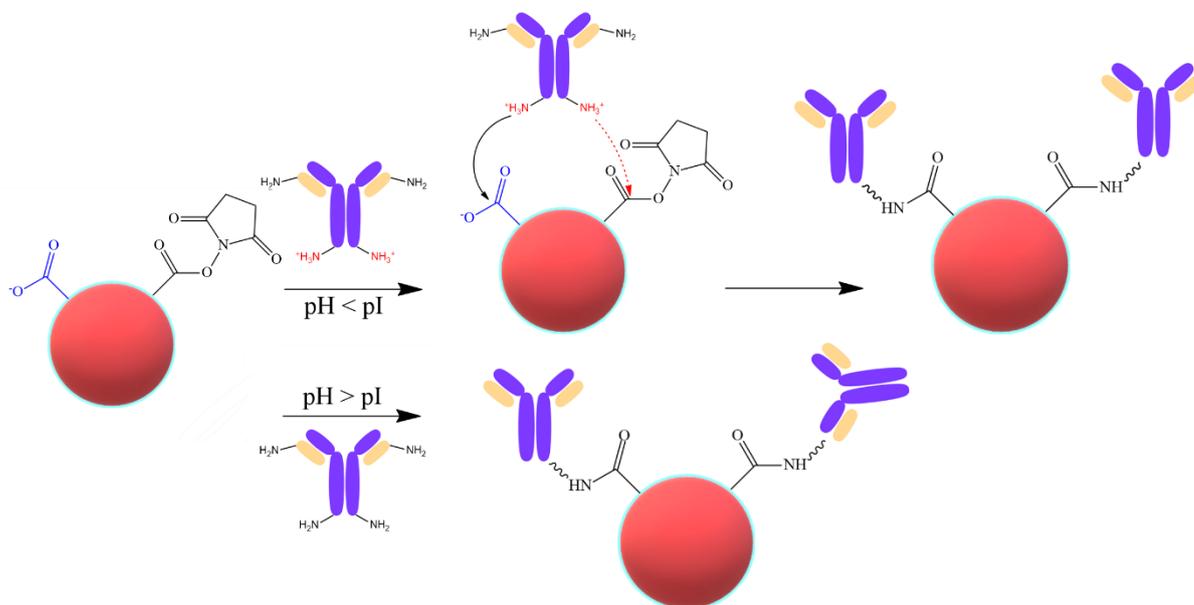


Рисунок 17 — Влияние pH на ориентацию антител на поверхности носителя

Таким образом, при  $pH < pI$  конъюгация несет ориентированный характер, в то время как при  $pH > pI$  – случайный (Рисунок 17). Поскольку ионные взаимодействия происходят между аминогруппами на поверхности антител и  $-COO^-$  группами на поверхности КТ, немаловажным является лишь частичная активация карбоксильных групп. При активации изменяется распределение поверхностного заряда на поверхности КТ с отрицательного на нейтральный (при использовании EDC/NHS), необходимо соблюдать соотношения активирующих реагентов для предотвращения агрегации наночастиц.

Данный подход возможно осуществить с любыми видами КТ и наночастиц, если их коллоидная стабильность сохраняется при pH инкубации, и плотность якорных групп на поверхности достаточно высока для осуществления ионных взаимодействий с антителами. Однако, плотность якорных групп не должна быть слишком высокой, поскольку высокая плотность иммобилизованных антител может снижать пространственную доступность антигенсвязывающих фрагментов.

Оптимальная ориентация антител на поверхности КТ, а следовательно, пространственная доступность антигенсвязывающих фрагментов, является определяющим фактором для снижения пределов обнаружения иммунохроматографических тест-систем.

Большинство подходов к определению ориентации биомолекул на поверхности твердого носителя основаны на исследовании плоских поверхностей.

Для подтверждения ориентированной иммобилизации антител на поверхности КТ сравнивают интенсивность аналитического сигнала иммунокомплексов со случайной и оптимальной ориентацией антител. Конъюгаты, в которых антигенсвязывающие фрагменты антител стерически более доступны, связывают большее количество антигенов.

На сегодняшний день не существует надежного и универсального метода ориентированной конъюгации антител на поверхности наночастиц.

Таким образом, иммобилизация антител на поверхности наночастиц должна соответствовать следующим параметрам:

- желаемое количество антител на наночастицу;
- правильная ориентация антител на поверхности наночастицы;
- образование стабильной связи и сохранение биологической активности антитела.

## 1.5 Методы исследования квантовых точек и их конъюгатов

Понимание механизмов взаимодействия между наночастицами и биомолекулами является ключевым аспектом, необходимым для дальнейшего улучшения их характеристик. Это знание позволит значительно расширить их сферы применения и открыть новые горизонты для инновационных решений и эффективных разработок. Охарактеризовать и оценить эффективность процесса конъюгации с КТ можно различными физико-химическими методами анализа, которые представлены на рисунке 18.



Рисунок 18 — Методы анализа КТ и их конъюгатов с биомолекулами

Следует отметить, что многие из представленных методов применяется не только для исследования и характеристики конъюгатов, но и для анализа КТ в отдельности.

Результаты спектроскопии поглощения позволяют рассчитать концентрацию конъюгатов белков с наночастицами и оценить их размер, что имеет критическое значение для изучения механизмов образования конъюгатов. Для определения концентрации конъюгатов используется зависимость поглощения при максимуме экситонного пика поглощения от их концентрации.

С помощью метода флуоресцентной спектроскопии можно определить значение КВ флуоресценции КТ до конъюгации и после конъюгации с белками [187, 188], измерить время жизни возбужденного состояния, интенсивность флуоресценции [188-190]. Этот метод позволяет регистрировать различные энергетические состояния, присутствующие в КТ и их конъюгатах.

Методы ИК-спектроскопии позволяют получить информацию о наличии определенных функциональных органических групп на поверхности КТ после их синтеза и модификации поверхности. Данный метод был успешно применен для анализа эффективности покрытия КТ молекулами стабилизатора и доказательства успешности проведения биоконъюгации КТ с биомолекулами (была проведена оценка появления новых пиков на спектрах поглощения, свидетельствующих об образовании связей с биомолекулой и появлению новых функциональных групп) [191, 192].

Для оценки размера конъюгатов КТ с белками используются методы электронной микроскопии, метод динамического рассеяния света (ДРС). Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) и сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) обычно используется для оценки морфологии, размерных характеристик, структуры материала, а также кристаллической решетки и дефектов КТ [193]. В работе [194] используется высокоскоростной атомно-силовой микроскоп (ВАСМ) для понимания молекулярной конформации конъюгатов КТ-антитело в масштабе одной молекулы. Метод позволяет определять промежуточное состояние конъюгации, когда антитела неоднократно прикреплялись и отделялись от КТ, также ВАСМ применим для количественного анализа синтезированных конъюгатов.

Ещё одним распространённым методом для характеристики КТ по их размеру является ДРС, который позволяет определять коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости путем анализа корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света [195, 196]. Далее, из коэффициента диффузии рассчитывается радиус наночастиц. Несферическим частицам задаётся диаметр сферической частицы, имеющей тот же коэффициент диффузии, что и измеренная частица. Этот диаметр, называемый

гидродинамическим, будет отклоняться от диаметра, измеренного ПЭМ или СЭМ, в тех случаях, когда частицы имеют органические молекулы в качестве стабилизирующих покрытий на поверхности, что часто характерно для многих КТ.

Одним из методов определения эффективности процесса конъюгации является оценка дзета-потенциала ( $\zeta$ -потенциала).  $\zeta$ -потенциал дает информацию о коллоидной стабильности системы. Суспензия с хорошей коллоидной стабильностью ( $\zeta > +20$  мВ или  $< -20$  мВ) не подвержена агрегации в виду взаимного электростатического отталкивания между частицами. Отчетливый положительный сдвиг кривой  $\zeta$ -потенциала при конъюгации обычно говорит об успешном проведении синтеза [197].

Метод капиллярного электрофореза стал мощным инструментом для разделения и характеристики КТ и их конъюгатов с биомолекулами. Данный метод позволяет определять размеры образующихся частиц, разделять и анализировать смеси различных КТ и проводить аналитическое сопровождение процессов синтеза и конъюгации КТ с целью оптимизации условий получения конъюгатов КТ с биомолекулами [198]. В таблице 3 приведены условия анализа КТ методом капиллярного электрофореза.

Таблица 3 — Условия проведения анализа КТ и их конъюгатов методом капиллярного электрофореза

Объект исследования	Метод анализа	Условия проведения анализа	Ссылка
CdTe-МПК CdTe-БСА	КЗЭ	<i>Фоновый электролит: 6,25 мМ Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> с рН=10. Напряжение: 12 кВ. Ввод: 3,45 кПа, 5 с. Температура: 25 °С. Капилляр: L/L<sub>эф</sub> = 40/30 см, ID=75 мм. Детектор: ЛИФ.</i>	[199]
CdTe-МПК	КГЭ	<i>Фоновый электролит: 178 мМ Трис, 178 мМ борная кислота, рН 8,8. Покрытие капилляра: ПАА (полиакриламид), ID=75 мм, L/L<sub>эф</sub>=40/30 см, электрокинетическая инъекция: 10 с, УФ-обнаружение на 250 нм, напряжение: -10 кВ.</i>	[200]
CdTe-МПК CdTe-антиовальбумин	Изоэлектрическая фокусировка	<i>Фоновый электролит: 0.1 М Трис/Taps с рН =8,3. Кварцевый капилляр: ID=75 мм, L/L<sub>эф</sub>=25/15 см. Возбуждение при 488 нм (Аргонный лазер), детектирование при 610 нм. Напряжение: 6 кВ.</i>	[201]
CdTe-МПК CdTe-гептапептид	КЗЭ	<i>Фоновый электролит: 20 мМ борат натрия с рН=9,2. Напряжение: +20 кВ. Капилляр: L/L<sub>эф</sub>=47/40 см, ID=75 мкм. Ввод: 20 с, 3,4 кПа. Детектор: ЛИФ.</i>	[202]
CdTe-МУК	Изотахорофорез	<i>Ведущий электролит: 10 мМ HCl с 20 мМ гистидином с рН 5,9; конечный электролит: 5 мМ 2-морфолино-этансульфоновая кислота.</i>	[203]

Объект исследования	Метод анализа	Условия проведения анализа	Ссылка
		<i>Сила тока: 50 мкА. Длина волны возбуждения 266 нм. Длина волны излучения наночастицы 586 нм.</i>	
CdSe-МПК		<i>Ведущий электролит: 10 мМ HCl с 20 мМ имидазолом до pH 8, конечный электролит: 5 мМ тетраборат натрия. Сила тока: 50 мкА. УФ-поглощение при 254 нм.</i>	
CdTe-МУК	КЗЭ	<i>Рабочий буфер: 25 мМ борат, 50 мМ ДДСН, pH=8,5. Напряжение: 25 кВ. Температура: 25 °С. Ввод: 5 с, 0,5 фунт/ кв. дюйм. Длина волны излучения КТ 530 нм (длина волны эмиссии = 400 нм).</i>	[204]
CdTe- L-Cys			
CdTe- Глутатион			
CdSe/ZnS – 4-МПК	МЭКХ	<i>Фоновый электролит: 5 мМ Трис, 50 мМ ДДСН с pH 10. Ввод: 0,5 фунт/кв. дюйм, 3 с. Приложенное напряжение: +20 кВ. Длина волны обнаружения: 214 нм. Капилляр: L/L<sub>эф</sub>=50.2/40 см, ID=75 мкм. Температура: 25 °С.</i>	[205]
CdSe/ZnS- тиогликолят натрия	КГЭ	<i>Фоновый электролит: водорастворимые полимерные добавки в различных концентрациях в растворах 25 мМ Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> с pH 9,2 доводят с помощью 0,10 М HCl или 0,10 М NaOH до желаемого значения pH. Для разделения использовались условия нормальной полярности, т.е. катод на выходе из капилляра. Ввод: гидродинамический при разнице высот 15 см в течение 60 с на аноде. Капилляр: плавленный кварц, ID=75 мкм; L/L<sub>эф</sub>=60/35 см. Температура: 25 °С.</i>	[206]
CdSe/ZnS- глутатион CdSe/ZnS-БСА	КЗЭ	<i>Фоновый электролит: 25 мМ Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> с pH 9,3. Капилляр: плавленный кварц, ID=75 мкм, L/L<sub>эф</sub>=60/35 см. Ввод: гидродинамический при разнице высот 15 см в течение 15 с на аноде. Температура: 25 °С. ЭОП измеряли с использованием родамина В в качестве нейтрального маркера. <math>U_{ЭО} = 6,94 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2/\text{с}\cdot\text{В}</math>.</i>	[207]
КТ-IgG КТ-биотин КТ-стрепта-видин	КЗЭ	<i>Фоновый электролит: 100 мМ 2-циклогексиламиноэтансульфоновая кислота (CHES) с pH 9,5. Ввод: 4 с, 0,5 фунт/кв. дюйм. Напряжение: 20 кВ. Капилляр: L/L<sub>эф</sub>=30/20 см, ID=50 мкм. Температура: 25 °С. Детектор: ЛИФ</i>	[208]

\*Примечание: ID — внутренний диаметр капилляра; КЗЭ — капиллярный зонный электрофорез; КГЭ — капиллярный гель электрофорез; ЛИФ — лазерно-индуцируемая флуоресценция; ДДСН — додецилсульфат натрия; ЭОП — электроосматический поток;  $U_{ЭО}$  — электроосматическая подвижность; МПК — меркаптопропионовая кислота; БСА — бычий сывороточный альбумин; МУК — меркаптоуксусная кислота; L-Cys — L-цистеин; МЭКХ — мицеллярная электрокинетическая хроматография.

Как видно из данных, приведенных в таблице 3, исследование КТ и их конъюгатов проводят различными видами капиллярного электрофореза, но наиболее часто делают выбор в пользу капиллярного зонного электрофореза на основании таких достоинств как низкая стоимость анализа, высокая воспроизводимость, доступность используемых реагентов и простота пробоподготовки.

Еще одним методом исследования КТ и их конъюгатов является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для исследования конъюгатов чаще использую вариант эксклюзионной ВЭЖХ. С помощью метода эксклюзионной хроматографии в работе [191] разделяли конъюгаты КТ с костным морфогенетическим белком от несвязавшихся агентов. Помимо разделения, эксклюзионная ВЭЖХ позволяет определять молекулярное число связывания биологических молекул с одной КТ, что было продемонстрировано в работе [209]. В эксклюзионной хроматографии обычно используют неподвижные фазы либо на основе полимера (например, матрицы на основе стирола/дивинилбензол или полисахаридов), либо на основе диоксида кремния. В качестве неподвижных фаз могут использованы водные, органические так и водно-органические растворы. В статье [210] содержится обзор большого количества комбинаций колонок и подвижных фаз для анализа КТ. Как видно из таблицы 4, колонки как на основе полимеров, так и на основе диоксида кремния (Nucleosil) могут применяться с использованием водной подвижной фазы, тогда как колонки на основе полимера (Nucleogel и PL/PLgel) обычно используются только с органическими растворителями.

Таблица 4 — Обзор различных комбинаций неподвижных и подвижных фаз при анализе КТ и их конъюгатов

КТ и конъюгаты	Эксклюзионная колонка	Элюент	Детектор	Ссылка
<i>Эксклюзионная хроматография с использованием водной подвижной фазы</i>				
CdS (полифосфат)	Nucleosil 500 C4 + Nucleosil 1000 C4 (Machery-Nagel)	1 мМ Cd(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> + 10 мМ гексаметафосфат	PDA	[210]
ZnS (полифосфат)	Nucleosil 500 C4 + Nucleosil 1000 C4 (Machery-Nagel)	1 мМ Zn(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> + 1 мМ гексаметафосфат	PDA	[210]
CdSe (амфифильный полимер)	Superdex 200 (GE Healthcare Life Sciences)	0.1 М NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , pH 7,4	UV-Vis, FL, ICP- MS	[210]

КТ и конъюгаты	Эксклюзионная колонка	Элюент	Детектор	Ссылка
CdSe/ZnS core/shell (амфифильный полимер)	Superdex 200 (GE Healthcare Life Sciences)	0.1 М NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , pH 7,4	UV-Vis, FL, ICP-MS	[210]
Конъюгаты КТ-ДНК	NAP-5 (GE Healthcare Life Sciences)	1xPBS; pH 7,4	—	[211]
CdSe/ZnS КТ КТ-стрептавидин и КТ-IgG	Shodex KW-804 Shodex SB-804	20 мМ боратный солевой буфер, содержащий 0,1 М NaCl pH 7,0	UV-Vis, DRI, FL	[212]
CdSe/ZnS КТ КТ-DNA Ligands	Sephadex G100 (4–120 мкм)	1xPBS; pH 7,2; 50 мМ	UV-Vis	[213]
<i>Эксклюзионная хроматография с использованием органической подвижной фазы</i>				
CdS (додекантиол)	Nucleosil 500 + Nucleosil 1000 (Machery-Nagel)	1 мМ Cd(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> + 1 мМ додекантиол в ТГФ	PDA	[210]
CdSe (алкилфосфины)	PL-50 or PL-1000 (Agilent/Polymer Laboratories)	ТГФ	PDA, DRI, FL	[210]
CdSe (алкилтиолы)	PLgel 1110 (Agilent/Polymer Laboratories)	0,1 М TOP в толуоле	UV-Vis	[210]
CdSe/ZnS core/shell (алкилфосфины)	PL-50 or PL-1000 (Agilent/Polymer Laboratories)	ТГФ	PDA, DRI, FL	[210]
CdSe/ ТОРО	TOYOPEARL gel (HW-65F, 45 мкм)	N-метил-2-пирролидинон	—	[214]

\*Примечание: PDA — матричный фотодиодный детектор; FL — флуоресцентный детектор; ICP-MS — масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой; DRI — рефрактометрический детектор; ТГФ — тетрагидрофуран; TOP — триоктилфосфин; ТОРО — триоктилфосфиноксид.

Благодаря своим преимуществам ВЭЖХ широко используется для разделения макромолекул разных размеров, таких как белки и полимеры, а также для эффективной очистки различных наночастиц. Важным аспектом является тщательный подбор оптимальных условий для проведения анализа, в особенности, ПФ и НФ в зависимости от специфики объектов исследования и поставленных задач.

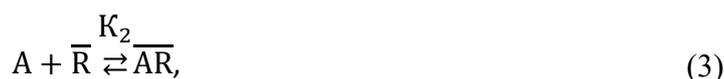
## 1.6 Математическое описание иммунохроматографического анализа

Для изучения процессов, происходящих на ИХ тест-системе в работах [215, 216] были разработаны математические модели, основанные на уравнениях конвективно-диффузионного переноса. Биохимические взаимодействия, происходящие во время анализа можно описать следующим образом:

- 1) Целевой аналит А взаимодействует с конъюгатом С (КТ-антитело), образуя комплекс СА:



- 2) При движении под действием капиллярных сил на тестовой линии свободный аналит А и комплекс СА взаимодействуют с иммобилизованными лигандами  $\bar{R}$  с образованием комплексов:



- 3) Несвязанный конъюгат С может связываться с комплексом  $\overline{AR}$  с образованием комплекса  $\overline{CAR}$ :



В иммунохроматографической системе концентрации всех реагентов являются функциями расстояния вдоль тест-полоски и времени процесса:  $[A(x, t)]$  — концентрация свободного целевого аналита;  $[CA(x, t)]$  — концентрация комплекса конъюгат-аналит;  $[C(x, t)]$  — концентрация свободного конъюгата;  $[\overline{AR}(x, t)]$  — концентрация комплекса антитело-аналит;  $[\overline{CAR}(x, t)]$  — концентрация комплекса конъюгат-аналит-лиганд. Введем обозначения:  $D_A$  и  $D_C$  — коэффициенты молекулярной диффузии аналита и конъюгатов соответственно;  $F_{CA}$ ,  $F_{\overline{AR}}$ ,  $F_{\overline{CAR}}^1$  и  $F_{\overline{CAR}}^2$  — скорости образования комплекса конъюгат-аналит (СА), комплекса лиганд-аналит ( $\overline{AR}$ ) и  $\overline{CAR}$  комплекса, соответственно.  $\overline{AR}$  и  $\overline{CAR}$  существуют только в тестовой зоне и вне этой зоны их концентрации равны нулю.

Уравнения конвективно-диффузионного переноса описываются следующим образом:

$$\frac{\partial[A]}{\partial t} = D_A \frac{\partial^2[A]}{\partial x^2} - U \frac{\partial[A]}{\partial x} - (F_{CA} + F_{\overline{AR}}), \quad (6)$$

$$\frac{\partial[\text{CA}]}{\partial t} = D_C \frac{\partial^2[\text{CA}]}{\partial x^2} - U \frac{\partial[\text{CA}]}{\partial x} - (F_{\text{CA}} - F_{\text{CAR}}^1), \quad (7)$$

$$\frac{\partial[\text{C}]}{\partial t} = D_C \frac{\partial^2[\text{C}]}{\partial x^2} - U \frac{\partial[\text{C}]}{\partial x} - (F_{\text{CA}} - F_{\text{CAR}}^2), \quad (8)$$

$$\frac{\partial[\overline{\text{AR}}]}{\partial t} = F_{\overline{\text{AR}}}, \quad (9)$$

$$\frac{\partial[\overline{\text{CAR}}]}{\partial t} = F_{\overline{\text{CAR}}}, \quad (10)$$

Данная модель была использована для изучения функционирования ИХ-тестов в различных условиях эксплуатации с использованием различного программного обеспечения. Следует отметить, что на основе данной модели авторы [217] предсказали оптимальное расположение тестовой линии на полоске ИХА, объем образца и общее время реакции, необходимое для достижения требуемой чувствительности для разных аналитов. Данная модель может быть использована в качестве инструмента проектирования для оптимизации процесса изготовления полоски ИХА. Однако надо понимать, что данные уравнения (распределение компонентов в потоке подчиняется закону Фика) не учитывает многих факторов:

- неспецифические взаимодействия с мембранами;
- возможность перемешивания реагентов до введения в аналитическую мембрану;
- десорбции реагентов с подложки и др.

Реальные процессы диффузии в ИХА тестах невозможно учесть в полной мере.

Сотников и др. [218] разработали математическую модель определения антител методом ИХА и установили зависимость кинетики образования детектируемого иммунного комплекса от концентраций реагентов и параметров межмолекулярных взаимодействий в ходе анализа. Ими было показано, что увеличение регистрируемого сигнала и снижение предела обнаружения аналита можно достигать разбавлением анализируемого образца до 100 раз. Это связано с тем, что концентрация комплекса конъюгат-аналит-лиганд на тестовой линии  $[\overline{\text{CAR}}]$  экспоненциально уменьшается при увеличении концентрации аналита  $[\text{A}]$  от  $10^{-5}$  М и выше. Причиной уменьшения  $[\overline{\text{CAR}}]$  при увеличении  $[\text{A}]$  является то, что конъюгат КТ (С) способен связать лишь небольшую долю аналита (например, антигена) А в пробе, если проба предварительно не разбавляется более чем на два порядка. После достижения фронтом жидкости аналитической зоны теста связанные и несвязанные с меткой молекулы специфических аналитов (антигенов) конкурируют между собой за взаимодействие с иммобилизованным лигандом (антителом). Такой эффект зависимости интенсивности

сигнала от концентрации анализата в иностранной литературе называют «Хук-эффектом», который будет описан далее.

## 1.7 «Хук-эффект»

В традиционном сэндвич-ИХА отношение интенсивности окраски тестовой линии к интенсивности окраски контрольной линии увеличивается с увеличением концентрации анализата. Это связано с тем, что большая концентрация анализатов в растворе приводит к тому, что большее количество меток (например, КТ) связывается на тестовой линии, приводя к ее интенсивной окраске. По мере увеличения концентрации анализата сигнал тестовой линии перестает увеличиваться и вместо этого начинает уменьшаться. В ИХА при больших концентрациях анализата проявляется так называемый «хук-эффект». «Хук-эффект» приводит к ложноотрицательным результатам, полученным из-за низкого сигнала, при этом концентрация целевого анализата высокая (Рисунок 19). «Хук-эффект» является результатом одновременного связывания избыточного количества целевых антигенов с иммобилизованными и мечеными антителами. В такой реакции избыточное количество целевого антигена нарушает сэндвич-иммуноанализ на тестовой линии и появляется ложноотрицательный результат, несмотря на высокую концентрацию целевого антигена. Для избежания «хук-эффекта» в работе [219] использовали штрих-кодированные тест-полоски с несколькими тестовыми линиями. Интенсивность тестовой линии уменьшается или исчезает из-за «хук-эффекта»; однако дополнительная тестовая линия может обнаружить содержание антигена в образце пациента с помощью полуколичественного метода анализа.

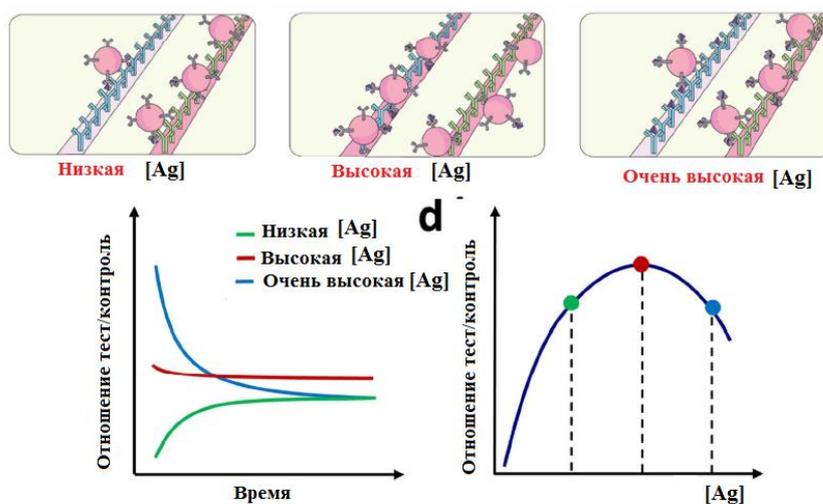


Рисунок 19 — Схематическое объяснение «хук-эффекта» [220]

Для определения антигена в работе [221] частично усовершенствовали конструкцию тест-полоски (Рисунок 20). Была разработана система ИХА для разделения целевых антигенов и конъюгатов с использованием замедляющего компонента. Мембрана для образца расположена в середине тест-полоски в качестве моста над разрывом в нитроцеллюлозной мембране.

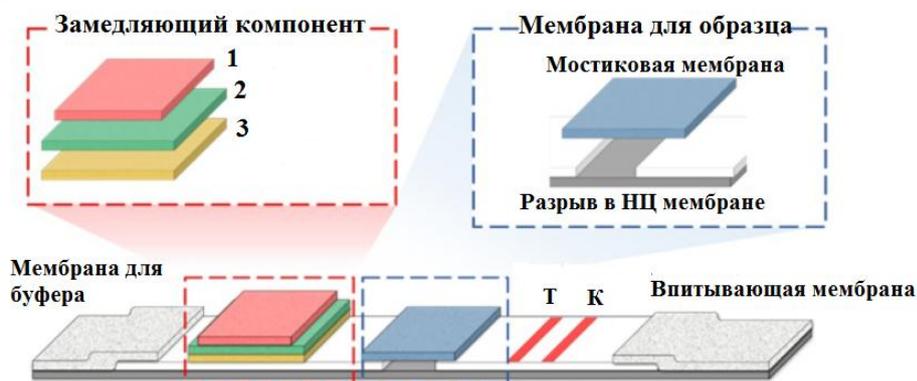
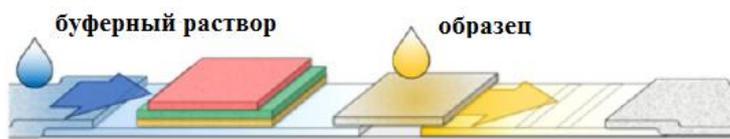


Рисунок 20 — Схематическое изображение иммунохроматографического анализа без «хук-эффекта»: 1 — мембрана для конъюгата; 2 — асимметричная полисульфоновая мембрана; 3 — промежуточная мембрана [221]

Замедляющий компонент находится между мембраной для буфера и аналитической мембраной. Сначала раствор образца вводится в мостиковую мембрану для пробы, а буферный раствор наносится на буферную мембрану (Рисунок 21). Целевой белок (антиген) мигрирует с буферным раствором и связывается с иммобилизованным антителом на тестовой линии. Затем несвязанный антиген вымывается и замедляющий компонент смачивается буферным раствором во время миграции образца. Далее конъюгат КТ-антитело высвобождается из конъюгатной подложки, и связывается с антигеном на тестовой линии, образуя иммунокомплекс. Несвязавшийся конъюгат КТ-антитело вымывается на впитывающую мембрану.

### 1. Нанесение образца и буферного раствора



### 2. Движение конъюгата после реакции антигена с иммобилизованными антителами на тестовой линии



Рисунок 21 — Схематическое изображение иммунохроматографического анализа без «хук-эффекта»: механизм, по материалам [221]

Однако, чувствительность таких модифицированных иммунохроматографических тестов ниже, чем у стандартного ИХА; поэтому они не подходят для определения биомаркеров, которые требуют обнаружения с высокой чувствительностью. При этом для таких биомаркеров, как С-реактивный белок, ХГЧ (тест на беременность) и ПСА (простатический специфический антиген), где более важен широкий диапазон концентраций, а не высокая чувствительность — такие ИХА тесты пригодны.

В работе [220] предлагается использовать кинетику анализа в реальном времени, контролируруемую с помощью недорогого и легкого устройства для определения аналита в широком диапазоне на ИХА тестах, включая диапазон «хук-эффекта». Авторы показывают, что, измеряя скорости, с которыми развивается каждая из линий, можно различать реальные и искусственно заниженные измерения концентрации аналита. В данной работе предложен метод учитывающий эффект высоких концентраций на соотношении сигналов тестовой/контрольной линий (Т/К). В данном методе используется скорость проявления тестовой и контрольной линий (кинетика протекающих на них реакций), что определяется с помощью специального устройства с камерой, светодиодами, фокусирующего объектива и т.д. [220]. На рисунке 22 представлен пример двух испытаний, которые имеют сходное соотношение Т/К, но существенно различную кинетику.

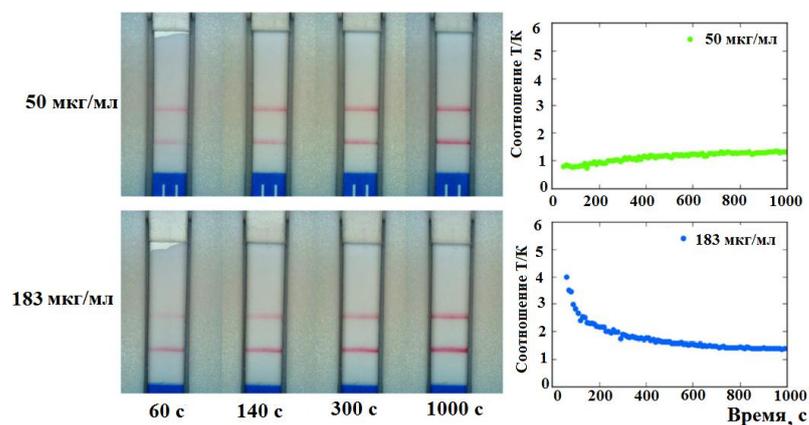


Рисунок 22 — График зависимости соотношения Т/К от времени при концентрации аналита 50 и 183 мкг/мл [220]

Зависимости соотношения Т/К от времени для всех концентраций, охватывающих область эффекта высоких доз, можно наблюдать на рисунке 23. Чтобы контролировать кинетику реакций, в работе применяют экспоненциальные функции интенсивностей тестовых и контрольных линий от времени. Это исключает возможность влияния отдельных изображений, которые были неправильно обработаны. Из рисунка 23 видно, что при высоких концентрациях антигена величина Т/К начинается с высокой и уменьшается, а при низких концентрациях — величина Т/К начинается с низкой и увеличивается.

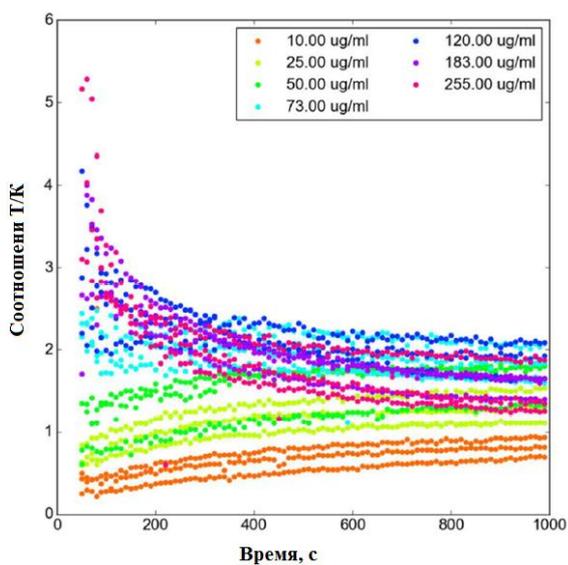


Рисунок 23 — Зависимости соотношения Т/К от времени при различных концентрациях аналита [220]

Проанализировав скорость изменения Т/К во времени, используя производную Т/К по времени, авторы получили зависимость, представленную на рисунке 24. Производная данной функции задается уравнением:

$$\tilde{D}f(a) = \log_{x \rightarrow a} \left( \frac{f(x)}{f(a)} \right)^{\frac{1}{x-a}}, \quad (11)$$

где  $f(x)$  и  $f(a)$  — значения функции в двух различных точках. Взяв эту производную для функции Т/К в моменты времени  $x = 120$  и  $a = 121$  секунды, получают приближенную производную.

Авторы показали, что скорость изменения Т/К (производная функции Т/К по времени) изменяется линейно с концентрацией аналита (Рисунок 24).

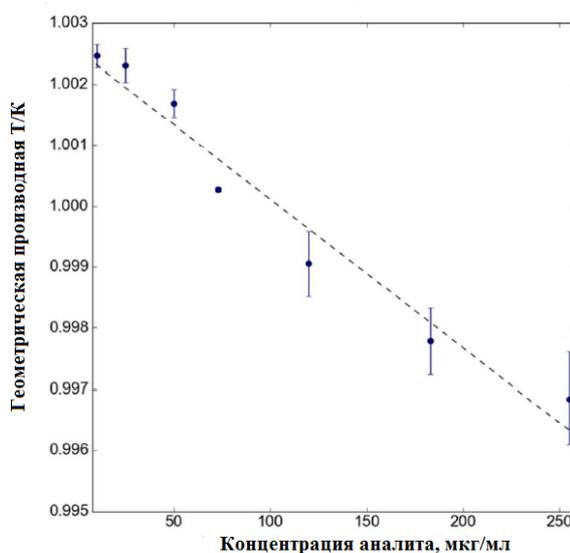


Рисунок 24 — Зависимость производной соотношения Т/К по времени от концентрации аналита [220]

Таким образом, «хук-эффект» в сэндвич-иммуноанализе влияет на результаты определения различных аналитов в широком диапазоне. Поэтому данный эффект требует тщательного изучения и выбора способа избавления от «хук-эффекта».

## 1.8 Выбор направления исследования

По результатам литературного обзора выбраны следующие основные направления данного исследования:

1. Модификация многослойных квантовых точек, полученных металлоорганическим коллоидным синтезом, методом замены лигандов, который является наиболее распространенным подходом для гидрофилизации и стабилизации наночастиц. В качестве

модификаторов широко используют тиолсодержащие молекулы. Благодаря высокому сродству тиольных групп с КТ образуется прочная связь с поверхностью КТ.

2. Для образования стабильной амидной связи с минимальными побочными продуктами и обеспечения ориентированной конъюгации КТ с антителами к gV ВБА, при которой на наночастице иммобилизуется Fc-область, был выбран карбодимидно-сукцинимидный метод связывания. Этот подход позволяет контролировать условия иммобилизации, поддерживая необходимый уровень pH. После проведения конъюгации свойства КТ будут исследоваться в зависимости от выбранной среды с помощью физико-химических методов анализа.

3. КЗЭ представляет собой эффективный метод для изучения КТ и их конъюгатов благодаря высокой разрешающей способности и возможности разделения частиц по их размеру и заряду. Данный метод позволяет исследовать физико-химические свойства КТ и их взаимодействие с различными молекулами. Тем не менее, для проведения анализа КТ и их конъюгатов с использованием КЗЭ необходимо разработать специфические условия, адаптированные для каждого отдельного объекта исследования, что является одной из задач данной работы.

4. Для очистки и разделения наноразмерных структур и их конъюгатов все чаще используется эксклюзионная ВЭЖХ. Однако данный метод подходит также для характеристики КТ и изучению взаимодействий КТ с различными биообъектами, позволяющий точно определить размерные характеристики и распределение частиц. Для обеспечения точного определения размерных характеристик и эффективного разделения частиц при применении эксклюзионной ВЭЖХ крайне важно разработать и установить оптимальные условия анализа, включающие в себя выбор подходящей ПФ и НФ, подбор скорости потока, что позволит достичь максимальной разрешающей способности и воспроизводимости результатов. Правильно подобранные условия анализа играют ключевую роль в повышении достоверности получаемых данных и дальнейшем исследовании свойств квантовых точек и их конъюгатов.

5. Анализ публикаций показал, что использование в качестве меток в ИХА КТ уменьшает предел обнаружения аналита по сравнению с ИХА на основе КЗ. При этом остается нерешенной проблема мешающего влияния биологических объектов и флуоресценции НЦМ на результат ИХА, что сильно влияет на чувствительность анализа. Таким образом, разработка иммунохроматографической системы с возможностью быстрого определения ВБА является одним из основных направлений исследования с дальнейшей оптимизацией данной системы с использованием диагностической техники и увеличение чувствительности анализа по сравнению с имеющимися аналогами.

6. При большой концентрации анализата возникает «хук-эффект», являющийся результатом одновременного связывания избыточного количества антигена с иммобилизованными на тест-полосках антителами и антителами, связанными с КТ, который приводит к ложноотрицательным результатам. Необходимо провести исследование возникновения «хук-эффекта» при больших концентрациях антигенов для ИХА ВБА.

## Глава 2. Экспериментальная часть

### 2.1 Реактивы, материалы и оборудование

**Реактивы:** Квантовые точки CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS (в толуоле, НИИПА), моноклональные антитела ADV 34/2 к гликопротеину gB ВБА (под сульфатом аммония, ИБК РАН), антитела козы к иммуноглобулинам мыши IgG, IgA, IgM (Имтек), альбумин бычий сывороточный (БСА) ( $\geq 98\%$ ,  $\sim 66$  kDa, лиофилизированный порошок, Sigma Aldrich), лизат ВБА (Вирус псевдобешенства, PRV-k) (содержание антигена в лизате — 20 мкг/мл), N-гидроксисукцинимид (NHS)  $C_4H_5NO_3$  ( $\geq 97\%$ , Sigma-Aldrich), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC)  $C_8H_{17}N_3$  ( $\geq 99\%$ , Sigma Aldrich), триэтиламин  $C_6H_{15}N$  ( $\geq 99.5\%$ , Sigma-Aldrich), хлорид натрия NaCl (ч.д.а, Химмед), хлорид калия KCl (ч.д.а, Химмед), гидрофосфат натрия  $Na_2HPO_4$  (ч.д.а., Лабтех), дигидрофосфат калия  $KH_2PO_4$  (ч.д.а., Лабтех), диэтаноламин (DEA)  $C_4H_{11}NO_2$  (99,9%, Sigma-Aldrich), твин-20  $C_{58}H_{114}O_{26}$  ( $\leq 3,0\%$  воды, Sigma-Aldrich), Твин-80  $C_{64}H_{126}O_{124}$  (Scharlau), superose-6 (размер частиц: 30 мкм, матрица: высокосшитая агароза, Химмед), гидроксид натрия NaOH (ч.д.а., Prime Chemicals Group), фосфатно-солевой буфер, таблетированный (PBS: 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ  $Na_2HPO_4$  и 1,76 мМ  $KH_2PO_4$ ) (Sigma-Aldrich), диметилформамид (ДМФА)  $C_3H_7NO$  (99%, Sigma-Aldrich), сахароза (Sigma-Aldrich), ТРИС  $(HOCH_2)_3CNH_2$  ( $\geq 99,9\%$  Trizma<sup>®</sup> base, Sigma-Aldrich), 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (MES)  $C_6H_{13}NO_4S$  ( $\geq 99,0\%$ , Sigma-Aldrich), этиленгликольдиметакрилат (ЭГМ)  $C_{10}H_{14}O_4$  (98 %, Sigma-Aldrich), малеиновый ангидрид (МАН)  $C_4H_2O_3$  (98%, Fluka), 4,4'-Азобис (4-циановалериановая кислота) (АБЦВК)  $C_{12}H_{16}N_4O_4$  (98%, Sigma-Aldrich), тетрагидрофуран (ТГФ)  $C_4H_8O$  (99,9 %, Sigma-Aldrich), пентагидрат гидроксида тетраметиламмония (ТМАГ)  $C_4H_{23}NO_6 \times 5H_2O$  (99%, Acros Organics), аргон Ar<sub>2</sub> (газ)

**Материалы:** ультрацентрифужные фильтры Amicon, фильтрационная система Тип 16309, Sartorius Stedim (ДВ-Эксперт), мембранные фильтры Sorte RC тип RC 58, размер пор 0,20 мкм, (Healthcare), насадки на шприц для фильтрования Millex-GP, поры 0,22 мкм, 33 мм diam., стер., (Millex), 96-луночные полистирольные планшеты Nunc<sup>®</sup> MicroWell<sup>™</sup>, прозрачные, с плоским дном, 400 мкл/лунка (Thermo Scientific<sup>™</sup>), впитывающая мембрана 20×30 см (Millipore), аналитическая мембрана Hi Flow Plus 135 (HF135) 6×30 см (Millipore), мембрана для образца стекловолоконная 20×30 см (Millipore), пластиковые кассеты на 6 тест-полосок, колонка ZORBAX GF-250 фирмы Agilent: сферические частицы кремнезема модифицированная цирконием с монослоем гидрофильных молекул диольного типа; диаметр пор: 150 Å; площадь поверхности: 140 м<sup>2</sup>/г; диаметр частиц: 4 – 4,5 мкм.

**Оборудование:** платформа диспенсера ZX1010 (BioDot, Англия); резак гильотинного типа CM4000 (BioDot, Англия); спектрофотометр UNICO-2100 (UNITED PRODUCTS & INSTRUMENTS, США) (Диапазон длин волн: 190-1100 нм); спектрофлуориметр FluoroLog 3 модель FL3-21 (Horiba Jobin Yvon SAS, Франция) (Спектральный диапазон возбуждения флуоресценции — 200 – 850 нм, точность установки длины волны  $\pm 0,5$  нм); анализатор  $\zeta$ -потенциала серии Zetasizer Nano Z (Malvern Instruments Ltd, UK) (Диапазон измерения: 5 нм – 10 микрон (диаметр)); анализатор размера частиц серии Zetasizer Nano S (Malvern Instruments Ltd, UK) (Диапазон измерения: 0,6 нм – 6 микрон (диаметр)); центрифуга (Thermo Scientific Sorvall ST 16R); система капиллярного электрофореза Agilent 7100 CE, оснащенная диодно-матричным детектором (190 – 600 нм) и кварцевым капилляром диаметром (ID) 50 мкм, Лобш/Лэф = 64,5/56 см; центрифуга (Thermo Scientific Sorvall ST 16R), максимальное ускорение до 15000 об/мин; микроцентрифуга «MiniSpin plus» («Eppendorf», Германия), вместимость: 1,5/2,0 мл; максимальное ускорение до 14500 об/мин; Жидкостной хроматограф LC-20 фирмы «Shimadzu» (Киото, Япония), оснащенный: 1) диодно-матричным детектором SPD-M20 А и системой обработки данных LC-Solutions, 2) насосом LC-20 AD, который с высокой точностью может создавать потоки подвижной фазы, начиная от 0,0001мл/мин, 3) автодозатором SIL-20А, 4) термостатом СТО-20 А для поддержания постоянной температуры колонки, 5) аналитической колонкой Luna C18, фирмы Phenomenex, размеры колонки 4,6x250мм, размер частиц сорбента 5 мкм, 6) аналитической колонкой для эксклюзионной хроматографии ZORBAX GF-250 с гидрофильной диольной привитой фазой на основе диоксидов циркония и кремния; рН-метр seven compact S220-KIT лабораторный; аналитические весы AW SHIMADZU (модель AW-220; предел взвешивания - 220 г; стандартное отклонение - 0,1 мг), система подготовки деионизированной воды «Elix Advantage 5» с блоком E-POD, до 2 л/мин, Merck («Millipore», США); термостат суховоздушный TC-1/20 СПУ (модель 1003; Диапазон регулируемых температур, °C: от t окр. среды до +60; Максимальное отклонение температуры в любой точке рабочей камеры, °C:  $\pm 0,4$ ); запайщик пакетов настольный CNT300/2 (CAS Corporation, Южная Корея); встряхиватель типа Vortex V3 (Скорость вращения держателя адаптера (RPM) об/мин.: 50 – 4500; Тип вращения: орбитальное); ИК-спектрометр с Фурье преобразованием Nicolet 6700 (Thermo Scientific ( USA); спектральный диапазон 25000 - 20 см<sup>-1</sup>; спектральный диапазон Фурье-Роман модуля 4350–100 см<sup>-1</sup> в Стоксовской области); холодильный шкаф Liebherr LCv 4010 Mediline (Диапазон внутренних температур: +3 °C до +16 °C / –9 °C до – 30 °C; точность до 1/10 °C); флуоресцентный ридер на основе цифрового микроскопа USB Digital Microscope EL-Micro-2 (аналог BW-400X китайской фирмы Brighwell Technology

LTD.) с модифицированной оптикой, с возбуждением флуоресценции светодиодами при 450 нм и светофильтром КС-17, обеспечивающим регистрацию флуоресценции в области свыше 700 нм; спектрометра USB-650 Red Tide фирмы OceanOptics (350 – 1000 нм).

## **2.2 Металлорганический синтез квантовых точек CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS и их гидрофилизация**

Металлорганический синтез многослойных CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS–КТ проводился в рамках гранта РНФ сотрудником НИИ «Прикладной акустики», Дежуровым С.В. по методике [222].

### **2.1.1. Гидрофилизация CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS–КТ тиол-содержащим сополимером винилпирролидона, малеинового ангидрида и этиленгликольдиметакрилата (ПТВП)**

#### **Синтез гидрофильного модификатора ПТВП**

В трехгорлую колбу на 250 мл загружали 25 мл ВП, 25 мл ТГФ и 0,66 г АБЦВК. Нагревали под аргоном до кипения и выдерживали 15 мин. Затем в реакционную смесь вводили 5 г МАН в 20 мл ТГФ. Смесь выдерживали при кипении в течение 10 минут. Далее вводили 2 мл ЭГМ в 15 мл ТГФ с 0,3 г АБЦВК. Реакционную массу выдерживали при кипении в течение 10 минут. Затем вводили 25 мл гександитиола и 50 мл ТГФ и выдерживали 1 час при кипении. Продукт осаждали диэтиловым эфиром и центрифугировали 5 мин 9000 об/мин. Осадок перерастворяли в ДМФА и еще раз переосаждали. Повторяли последнюю процедуру дважды. Продукт сушили под вакуумом. Химический выход продукта 3,5 г.

#### **Гидрофилизация КТ CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS 700 нм**

5 мл дисперсии гидрофобных КТ, растворенных в толуоле ( $m = 100$  мг) переосаждали метанолом в присутствии 0,1 мл ТОФ. Осадок диспергировали в 5 мл ТГФ. Отдельно готовили раствор гидрофильного модификатора ПТВП ( $m = 0,3$  г) в 9 мл смеси ДМФА:ТГФ (1:2). При перемешивании дисперсию КТ медленно добавляли к раствору модификатора. Через 1 час к этой смеси добавляли 2-3 мл насыщенного раствора ТМАГ в смеси ДМФА:вода (10:1) до выпадения осадка. Смесь оставляли с перемешиванием еще на 1 час. Далее осадок КТ отделяли центрифугированием (5 мин 9000 об/мин). Осадок промывали 10 мл ТГФ, подсушивали на воздухе и затем растворяли в 3 мл воды. Очистку гидрофильных КТ проводили путем гель-фильтрации на сорбенте Superose 6.

## **2.3 Получение конъюгатов квантовых точек с моноклональными антителами**

### **2.1.2. Получение конъюгатов квантовых точек с моноклональными антителами (MAbs) со случайной ориентацией**

В качестве рабочего буфера для получения конъюгатов использовали однократный фосфатно-солевой буфер (1×PBS) pH = 7,8 (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Синтезированные КТ активировали реагентами: EDC и NHS. Необходимые количества соединений EDC и NHS готовили в виде 1,64 % и 1,21 % растворов в ДМФА соответственно. Через 15–20 минут активации КТ к ним приливали при перемешивании необходимое количество раствора антител (Ат) из расчета КТ:Ат 1:10 по молям. Смесь инкубировали в течение 1,5–2 часов при комнатной температуре в темноте. Полученный после конъюгирования раствор стабилизировали, добавляя 1/10 часть от общего объема конъюгата 10 % DEA (диэтанолamina) в деионизированной воде, и оставляли еще на 20 минут в темноте. После стабилизации конъюгат концентрировали ультрацентрифугированием в пробирках Amicon на 30 кДа при 15 000 об/мин. На последнем этапе конъюгаты очищали от несвязавшихся свободных антител методом гель-фильтрации на колонке с Superose 6 в качестве сорбента.

### **2.1.3. Получение конъюгатов квантовых точек с моноклональными антителами (MAbs) со оптимальной ориентацией**

Ориентированную конъюгацию КТ с антителами проводили в 10 mM растворе MES с pH = 5 с мольным соотношением КТ:Ат = 1:10. Для активации карбоксильных групп на поверхности КТ к рассчитанному объему КТ добавляли 2000-кратный молярный избыток 0,1 М раствора EDC, 1000-кратный молярный избыток 0,1 М раствора NHS и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут при постоянном перемешивании. Антитела, после очистки от сульфата аммония переводили в 10 mM раствор MES с pH = 5 и инкубировали при постоянном перемешивании в течение 30 минут при комнатной температуре. После активации карбоксильных групп, КТ очищали от избытка активирующих агентов с помощью ультрафильтрации. Затем в реакционную смесь добавляли рассчитанное количество очищенных от сульфата аммония антител и оставляли на 1,5 часа в темноте при постоянном перемешивании. После завершения процесса конъюгации в реакционную смесь добавляли раствор блокатора в количестве 1/10 часть от общего объема конъюгата и оставляли на 30 минут при постоянном перемешивании. В качестве блокатора использовали 10% BSA в 0,01 М 1×PBS. Полученные конъюгаты перератворяли в 0,01 М 1×PBS с использованием ультрацентрифужных концентраторов

Amicon на 30 кДа, затем очищали от несвязавшихся компонентов с помощью гель-хроматографии.

## 2.4 Получение иммунохроматографических тест-полосок

Иммунохроматографические стрипы (тест-полоски) изготавливали по технологии, представленной в литературе [223].

В качестве основной мембраны использовали листы Н-F135 (Millipore) размером 30×6 см. При этом липкие края мембраны оставались неотклеенными.

В качестве антигена для сорбции использовали растворы моноклональных антител ADV 34/2 к целевому анализу с концентрацией 1 мг/мл (тестовая полоса) и антивидовых (анти-мышь) контрольных антител с концентрацией 0,5 мг/мл (положительный контроль) в 1×PBS. В качестве анти-мыши в данной работе использовали антитела козы к иммуноглобулинам мыши. Перед работой автоматический диспенсер тщательно промывали раствором «bio-terge», поставляемый с оборудованием, согласно инструкции к прибору, а затем тщательно промывали деионизированной водой и оставшиеся на капилляре капли аккуратно убрали чистой фильтровальной бумагой.

Мембрану клали на подвижную платформу системы для разработки и производства экспресс-тестов (автоматический диспенсер). Антитела вносили в соответствующие емкости системы. Наносили первую (тестовую) полосу — моноклональные антитела к целевому анализу с концентрацией 1 мг/мл в количестве 1 мкл/см на расстоянии 12 мм от края основной мембраны со стороны будущего фильтра для конъюгата. На вторую (контрольную) полосу наносили контрольные антивидовые антитела с концентрацией 0,5 мг/мл в количестве 1 мкл/см на расстоянии 17 мм от края основной мембраны со стороны будущего фильтра для конъюгата. Расстояние между тестовой и контрольной линиями составляло 5 мм. Затем мембрану инкубировали 30 мин при +37 °С.

При работе с мембранами рекомендуется надевать медицинскую маску во избежание засорения мембраны, рабочий стол тщательно протирать спиртом. Высушенную мембрану укладывали горизонтально на полиэтиленовую пленку и наносили блокирующий буфер для деактивации неспецифического связывания (1% БСА в 1×PBS pH = 7,4) от одного края к другому. Буфер наносили с избытком. Следили за тем, чтобы мембрана не пересыхала. Блокировали 10 мин при комнатной температуре. На одну мембрану наносили около 10 мл блокирующего раствора (последовательно по 4,5 мл раствора) и оставляли на 10 минут на воздухе.

Для удаления лишнего раствора БСА мембрану устанавливали на фильтровальную бумагу в вертикальное положение. Затем мембрану тщательно промывали в буфере (0,05 % Твин-20 в 1×PBS), промывку проводили трижды в двух разных емкостях в течении 20–30 минут. Далее повторно устанавливали в вертикальное положение на фильтровальную бумагу для удаления лишнего отмывочного буфера. Затем мембрану размещали горизонтально на полиэтиленовую пленку и наносили буфер для стабилизации белка (5 % раствор сахарозы в 5 мМ Трис-НСl рН = 7,5) от одного края к другому. На одну мембрану наносили около 10 мл стабилизирующего раствора. Последовательно наносили по 4,5 мл раствора. Мембрану инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Для удаления лишнего стабилизирующего буфера, мембрану переносили на фильтровальную бумагу в вертикальное положение. Затем, мембрану помещали на 15 часов в термостат (+37 °С).

С подготовленной мембраны удаляли защитную пленку и на открытый адгезивный слой накладывали мембрану для пробы, впитывающую мембрану и мембрану для конъюгата, точно позиционируя их взаимное положение. Полосы фильтров позиционировали таким образом, чтобы при склеивании одним концом перекрыть на 2–3 мм нитроцеллюлозную мембрану. Плотнo прижимали целлюлозную мембрану для пробы и мембрану для конъюгата к адгезивной поверхности подложки. Мембрану для конъюгата наклеивали на целлюлозную мембрану со стороны, которая ближе к тестовой зоне. Для прочной фиксации фильтров полученную конструкцию выдерживали около 8–10 часов в герметичной упаковке с силикагелем при комнатной температуре. Изготовленную систему нарезали на стрипы (тест-полоски) шириной 4 мм на резакe гильотинного типа.

Готовые стрипы помещали в пластиковые кассеты на 6 тест-полосок.

## **2.5 Проведение иммунохроматографического анализа**

### **2.5.1 Тестирование синтезированных конъюгатов квантовых точек с моноклональными антителами**

В качестве антигена использовали лизат ВБА (далее лизат). В качестве элюента применяли раствор 1×PBS (рН = 7,4) с добавлением 2% Твина-80. В буфере разводили лизат в различных соотношениях. На тест-полоску в кассете наносили нужное количество раствора конъюгата (3–5 мкл). Далее наносили 50 мкл элюента с антигеном. Когда элюент проходил всю аналитическую зону, добавляли еще 50 мкл элюента, через 3-5 минут дополнительно 50 мкл буфера. Через 20 минут по завершению элюирования интерпретировали результат теста.

### **2.5.2 Исследование флуоресценции тестовой и контрольной зон**

В исследовании использовали специально изготовленный флуоресцентный ридер на основе цифрового микроскопа USB Digital Microscope EL-Micro-2 (аналог BW-400X китайской фирмы Brighwell Technology LTD.) с модифицированной оптикой, с возбуждением флуоресценции светодиодами при 450 нм и светофильтром КС-17, обеспечивающим регистрацию флуоресценции в области свыше 700 нм.

В микроскопе использовали цветную RGB-фотоматрицу. Модуль оцифровки обрабатывал RGB-сигналы и давал яркость каждого канала в диапазоне от 0 до 255. Делением этих значений на 255 получали величины сигналов в условных единицах (у.е.) в интервале 0 – 1.

### **2.5.3 Исследование распределения конъюгата по всей тест-полоске**

Сканирование всей тест-полоски проводили при возбуждении флуоресценции при 470 нм на приборе, сконструированном на базе спектрометра USB-650 Red Tide фирмы OceanOptics (350 – 1000 нм).

## **2.6 Исследование квантовых точек и конъюгатов методом эксклюзионной хроматографии**

Хроматографирование проводили в изократическом режиме на колонке ZORBAX GF-250 фирмы Agilent с гидрофильной диольной привитой фазой на основе диоксидов циркония и кремния. В работе в качестве подвижной фазы (ПФ) выбрали фосфатный буфер с  $pH = 7$ , находящийся в рабочем диапазоне колонки и при этом  $pH$  КТ стабильны. В качестве ПФ - выбрали 33,5 мМ фосфатный буфер с  $pH = 7$ , скорость потока составляла 1 мл/мин, объем инъекции — 1 мкл. Анализ проводили в изократическом режиме элюирования. Однако, при этих условиях хроматографический фронт не формировался, пики наночастиц на хроматограмме были уширены и сильно размыты. Следовательно, данные условия хроматографирования не подходили для анализа выбранных объектов исследования. В режиме эксклюзионной хроматографии увеличение элюирующей силы ПФ достигался уменьшением ионной силы элюента.

Поэтому для дальнейших исследований выбрали следующие условия: фосфатный буфер с концентрацией  $c = 33,5$  мМ, объемная скорость ПФ — 3 мл/мин. При данных условиях анализа хроматографическая зона формировалась достаточно хорошо, однако не соблюдался порядок удерживания в зависимости от размера. Вероятно, это связано с возникновением взаимодействий различной природы между аналитом и ПФ. В литературных источниках указывали, что для снижения такого взаимодействия и получения узких и симметричных пиков в подвижную фазу необходимо добавлять

анионные и неионногенные поверхностно-активные вещества (ПАВ). При добавлении в ПФ ПАВ может происходить увеличение отрицательного заряда НФ и смена заряда аналита с положительного на отрицательный. Таким образом, за счет отталкивания одноименных зарядов между НФ и объектами исследования снижается их взаимодействие. Поэтому для исследования данных объектов методом эксклюзионной хроматографии в фосфатном буфере с  $[c] = 33,5$  мМ добавляли 0,1 % ДДСН.

## **2.7 Исследование квантовых точек и конъюгатов методом капиллярного зонного электрофореза**

Для исследования КТ использовали систему капиллярного электрофореза CE 7100 Agilent, оснащенную диодно-матричным детектором и кварцевым капилляром диаметром 50 мкм, общей длиной 64,5 см и эффективной длиной 56 см.

Перед началом анализа КТ растворяли в деионизированной воде, пропускали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 минут.

Перед работой капилляр промывали по следующей схеме:

- 3 минуты дистиллированной водой;
- 5 минут раствором 0,1 М раствором гидроксида натрия;
- 5 минут дистиллированной водой;
- 5 минут раствором фонового электролита, для приведения поверхности капилляра в равновесие с фоновым электролитом.

Проверку чистоты, используемой для приготовления растворов дистиллированной воды, проводили, регистрируя электрофореграмму. Качество дистиллированной воды считается удовлетворительным, если на полученной электрофореграмме не обнаруживаются пики.

Непосредственно перед анализом капилляр промывали фоновым электролитом в течение 3 минут. Через 4–5 анализов вials с фоновым электролитом заменяли. Непосредственно перед анализом все растворы центрифугировали в течение 5 минут при 5000 об/мин.

Анализ проводили при длине волны детектирования 210 нм, приложенном напряжении +30 кВ, температуре 20 °С, ввод пробы в капилляр осуществляли в гидродинамическом режиме (давление: 50 мбар; время впрыска: 2 с). Для оптимизации способа определения варьировали состав и концентрацию фонового электролита.

## 2.8 Определение аналитических характеристик иммунохроматографического анализа

Основные аналитические характеристики диагностической системы — это чувствительность, специфичность, воспроизводимость получаемых результатов, которые определяют информативную диагностическую ценность. В контексте иммунохроматографических тест-систем важно различать аналитическую и диагностическую чувствительность. Аналитическая чувствительность относится к минимальной концентрации аналита, которую может обнаружить система, тогда как диагностическая чувствительность связана с эффективностью теста в выявлении заболеваний. ИХА может показывать как истинные положительные и отрицательные результаты, так и иногда ошибочные — ложноположительные и ложноотрицательные результаты. Ложноположительный результат теста — ошибочный положительный результат анализа пробы, которая на самом деле отрицательная. Ложноотрицательный результат теста — ошибочный отрицательный результат анализа пробы, которая на самом деле положительная.

Чувствительность ( $Se$ ) — показатель, выражающий долю истинно положительных результатов:

$$Se = \frac{ИП}{ИП + ЛО} \times 100\%, \quad (12)$$

где ИП — количество истинно положительных результатов ИХА, ЛО — количество ложноотрицательных результатов ИХА.

Специфичность ( $Sp$ ) — показатель, выражающий долю истинно отрицательных результатов:

$$Sp = \frac{ИО}{ИО + ЛП} \times 100\%, \quad (13)$$

где ИО — количество истинно отрицательных результатов ИХА, ЛП — количество ложноположительных результатов ИХА.

Более чувствительной будет иммунохроматографическая система, которая дает меньше ложноотрицательных результатов, а более специфичной — которая дает меньше ложноположительных результатов.

Также важными характеристиками диагностической системы являются предел обнаружения  $C_{обн}$  или  $C_{min}$  определяемого компонента (в зарубежных изданиях — limit of detection, DL или LOD) и предел определения ( $C_n$  или  $C_{lim}$ ), ранее называвшимся нижней границей определяемых содержаний (в зарубежных изданиях — limit of quantitation, DQ или LOQ, реже limit of determination) [224].

Количественно  $C_{min}$  можно определить:

$$C_{min} = \frac{3\sigma_{фон}}{S}, \quad (14)$$

где  $\sigma_{фон}$  — стандартное отклонение аналитического сигнала фона;  $S$  — коэффициент чувствительности, который характеризует отклик аналитического сигнала на содержание компонента.

Коэффициент чувствительности — это значение первой производной градуировочной функции при данном определении концентрации. Для прямолинейных градуировочных графиков — это тангенс угла наклона:

$$S = \frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{y_2 - y_1}{c_2 - c_1} = \frac{y_3 - y_2}{c_3 - c_2}, \quad (15)$$

Таким образом, более высокий коэффициент чувствительности позволяет обнаруживать и определять меньшие количества компонента, сохраняя при этом одинаковый аналитический сигнал. При разработке нового метода или методики химического анализа необходимо стремиться повысить коэффициент чувствительности, применяя различные подходы: концентрирование, усовершенствование аппаратуры, создание новых реагентов и т. п.

## Глава 3. Исследование свойств многослойных квантовых точек в растворе и на иммунохроматографических тестах

### 3.1 Гидрофобные квантовые точки, их свойства и модификация

Общая схема синтеза CdTeSe–КТ представлена на рисунке 25.

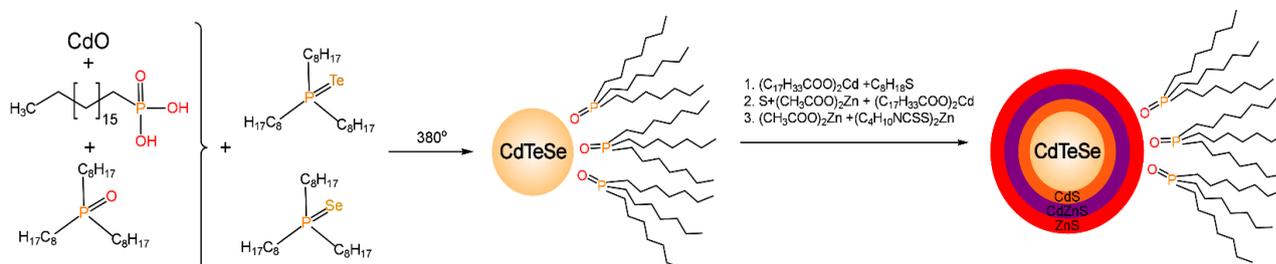


Рисунок 25 — Схема синтеза CdTeSe-КТ методом МКС

В основу разработанной методики была положена работа [225], где синтезировали халькогенидные КТ с ядром CdSe. При этом толщина оболочек широкозонных полупроводников (CdS, ZnS) увеличивали до 7 и более монослоев [226]. Создание оболочки CdS не только существенно увеличивал квантовый выход, но и значительно пассивировал КТ. В работе было предложено использовать добавки теллура (3–7 мол. % по отношению к селену) при синтезе зародышей. Это позволило увеличить bathochromic shift ядер КТ до 70 нм относительно результатов работы [225]. Дополнительный подход заключался в создании дополнительной оболочки из ZnS для пассивации КТ в воде. Кроме того, ZnS является более биосовместимым материалом по сравнению с халькогенидами кадмия. Наряду с дополнительным bathochromic shift (10 – 30 нм) применение дополнительных полупроводниковых оболочек приводило к более симметричным пикам излучения при сохранении КВ (Рисунок 26).

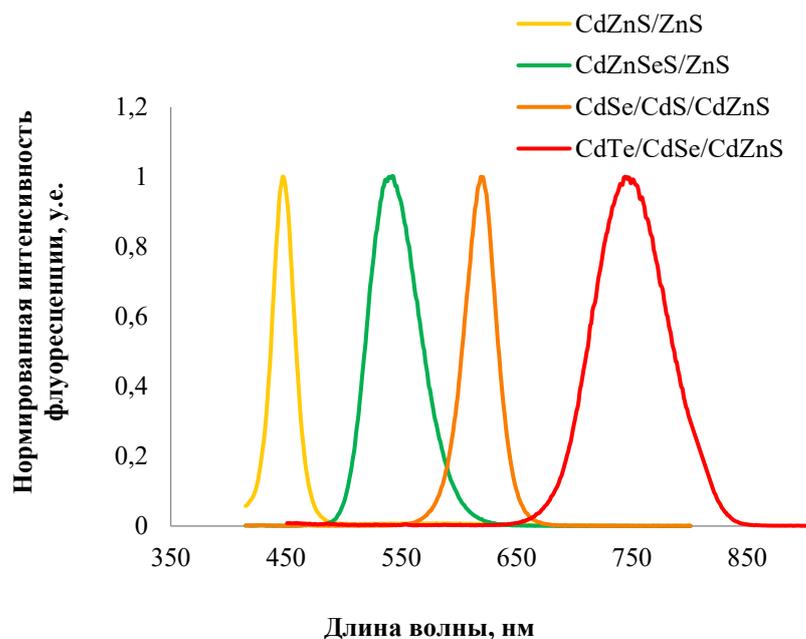


Рисунок 26 — Нормированные спектры флуоресценции КТ различной структуры и размера

Размер нанокристаллов после формирования оболочек увеличился с 4–5 до 10–11 нм. Для работы выбрали многослойные CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS–КТ с максимумами эмиссии при 600, 640, 680, 700 нм.

### 3.1.1 Гидрофилизация квантовых точек CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS

Для обеспечения растворимости в водной среде, предотвращения агрегации и осаждения наночастиц полученные гидрофобные CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS–КТ требуется модифицировать, вводя необходимые функциональные группы на поверхность КТ для последующей конъюгации их с биоконпонентами. Гидрофилизацию КТ проводили методом замены исходных гидрофобных TOP-групп лигандами, имеющими с одной стороны тиольную группу, а с другой карбоксильную группу. При выборе покрывающего лиганда, необходимо чтоб он удовлетворял следующим критериям: высокое сродство к поверхности КТ, обеспечение коллоидной стабильности КТ в широком диапазоне рН и концентрации солей. При этом покрытие должно давать малый гидродинамический диаметр КТ, минимальное неспецифическое связывание с биологическим окружением, обладать минимальной токсичностью, коммерческой доступностью или простотой синтеза, и иметь доступные функциональные группы для конъюгации.

В работе реализовали одnoreакторный многоступенчатый синтез гетеробифункционального лиганда [227], обеспечивающего водорастворимость,

коллоидную стабильность, биосовместимость, простоту конъюгации КТ с белковыми молекулами. 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 сомономер МАН и в качестве разветвителя (сшивающего агента) этиленгликольдиметакрилат (ЭГМ), далее, инициатор 4,4'-азобис(4-циановалериановую кислоту) (АБЦВК) [228]. 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 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 27.

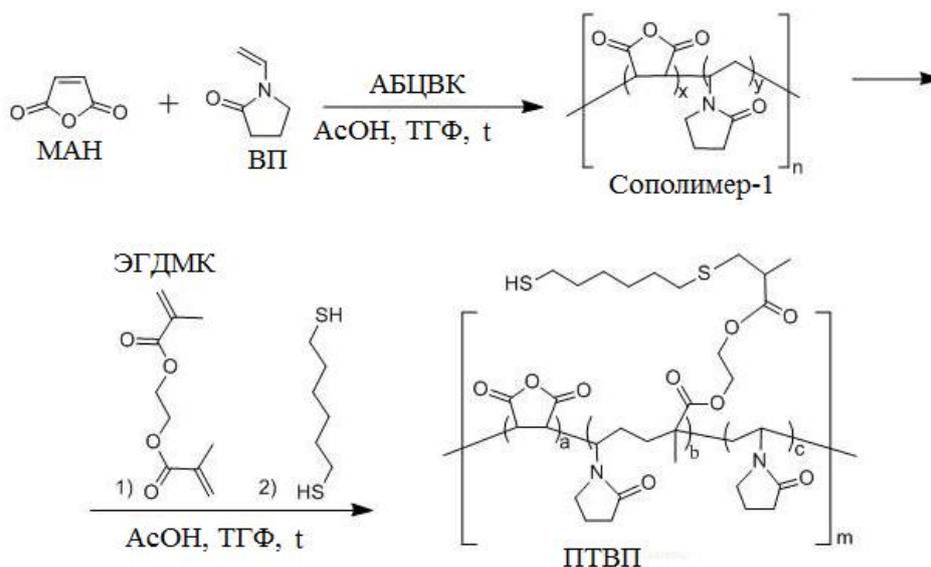


Рисунок 27 — Схема синтеза ПТВП [227]:

МАН — малеиновый ангидрид, ВП — винилпирроллидон, АБЦВК — 4,4'-азобис(4-циановалериановая кислота), ЭГДМК — этиленгликольдиметакрилат, ПТВП — полиотиолвинилпирроллидон, ТГФ — тетрагидрофуран [227]

В ИК-спектрах ПТВП (Рисунок 28 а) присутствует пик при частоте  $1653\text{ см}^{-1}$ , соответствующий валентным колебаниям группы  $\text{C}=\text{O}$  в лактаме ПВП.

Характеристическим пиком валентных колебаний  $-C(O)-O-C(O)-$  групп малеинового ангидрида является пик при  $1780$  и  $1851\text{ см}^{-1}$ . Валентное колебание сложноэфирной группы ЭГМ наблюдается при частоте  $1720\text{ см}^{-1}$ , в области  $2555-2930\text{ см}^{-1}$  наблюдаются валентные колебания связи  $-SH$  ГДТ. Сравнение ИК-спектров полученного сополимера со спектром ПВП (Рисунок 28) подтверждает образованием более сложной полимерной системы.

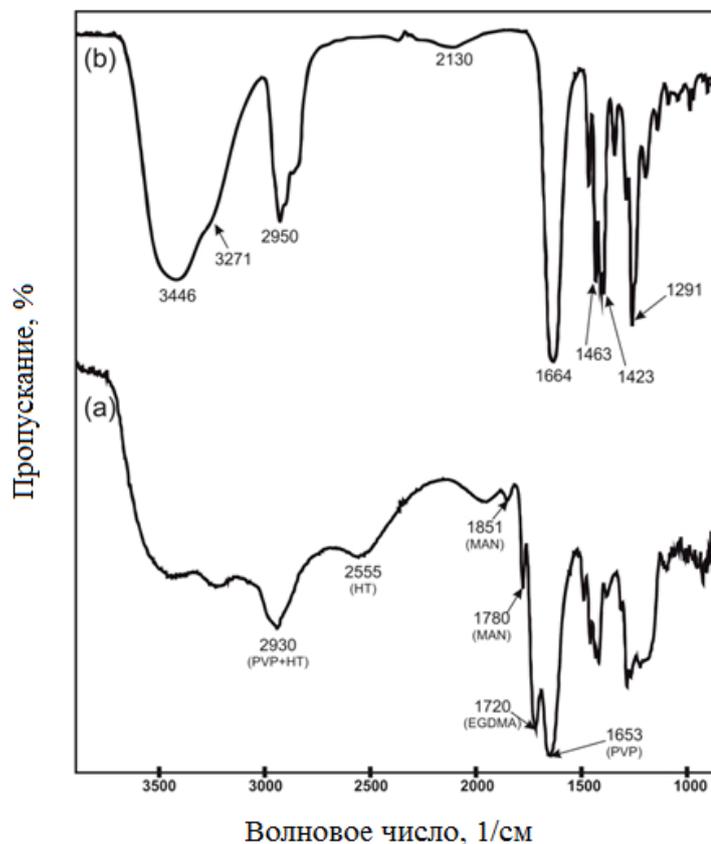


Рисунок 28 — ИК-спектр ПВП и ПТВП. Измерения проводились на ИК-спектрометре с Фурье-преобразованием Nicolet 6700

Схематично процесс формирования оболочки КТ показан на рисунке 29.

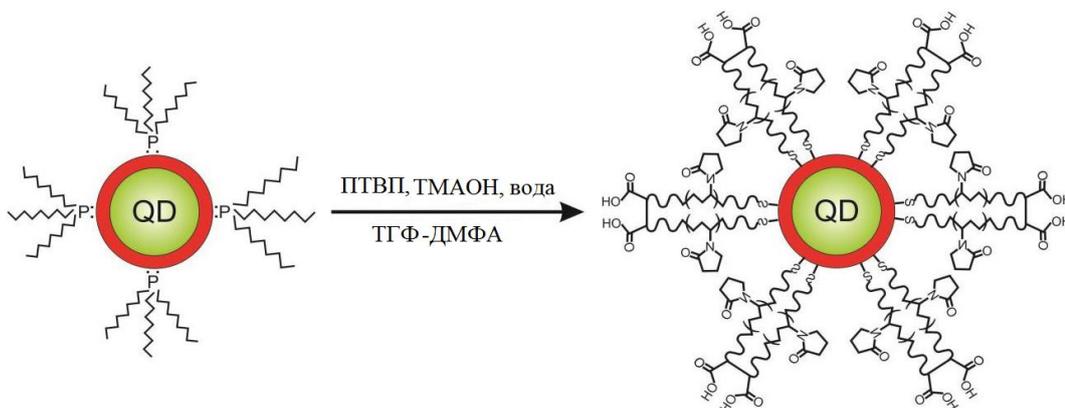


Рисунок 29 — Схема гидрофилизации гидрофобных CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-КТ [227]

Оптические свойства CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS–ПТВП–КТ после гидрофилизации полностью сохранялись, за исключением небольшого снижения КВ (Рисунок 30). Однако, для КТ с максимумом флуоресценции при 600 нм наблюдалось сильное снижение КВ с 84 до 55 %, что может быть связано со структурой данных КТ. Чем меньше размер КТ и меньше дополнительных полупроводниковых слоев на поверхности КТ, тем сильнее проявляется влияние полимерной оболочки на оптические свойства КТ.

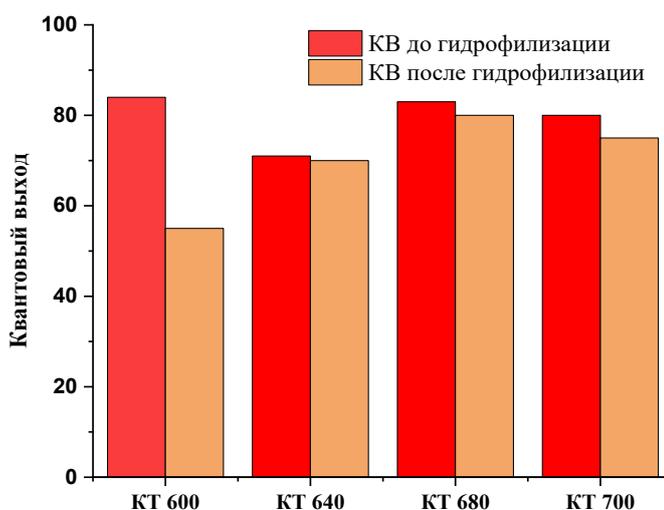


Рисунок 30 — Квантовый выход КТ с максимумами флуоресценции при 600 (КТ600), 640 (КТ640), 680 (КТ680) и 700 (КТ700) нм; до и после гидрофилизации; длина волны возбуждения 450 нм [227]

В водных средах заряженные частицы окружены противоположно заряженными ионами, присутствующими в растворе, т.е. вокруг частиц образуется двойной электрический слой, состоящий из противоионов. Двойной электрический слой имеет адсорбционный слой (внутренняя область) и диффузный слой (внешняя область) (Рисунок 31). Ионы, прочно связанные с частицами, находятся в адсорбционном слое, тогда как ионы, слабо связанные с частицами, находятся в диффузном слое. «Виртуальная» граница в диффузном слое, в которой ионы движутся в электрическом поле вместе с КТ, также называется плоскостью скольжения. Электрический потенциал, формируемый на этой границе раздела, определяется как  $\zeta$ -потенциал. Для определения  $\zeta$ -потенциала электрическое напряжение подается в специальную кювету, содержащую заряженные КТ в суспензии. Наночастицы движутся к электроду противоположной полярности с постоянной

скоростью, пропорциональной поверхностным зарядам ( $\zeta$ -потенциалу). Данная скорость регистрируется при помощи светорассеяния.  $\zeta$ -потенциал дает информацию о коллоидной стабильности системы. Суспензия с хорошей коллоидной стабильностью ( $\zeta > +20$  мВ или  $< -20$  мВ) не подвержена агрегации в виду взаимного электростатического отталкивания между частицами. Кроме того, модификация поверхности КТ (например, добавление лиганда) также может быть оценена с помощью измерения  $\zeta$ -потенциала.

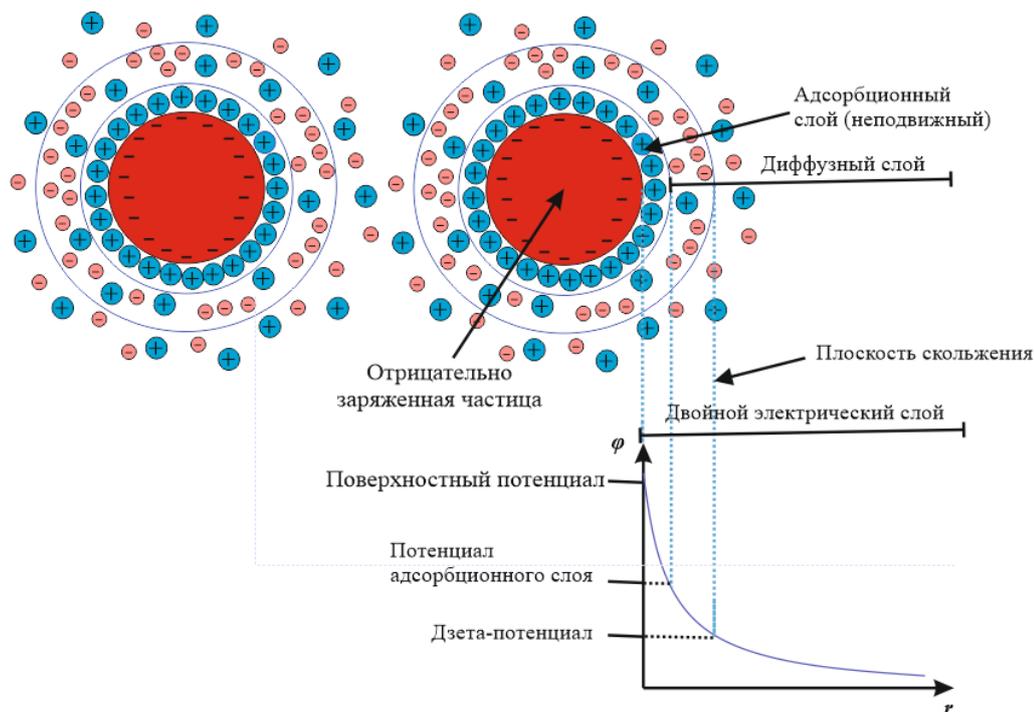


Рисунок 31 — Схематичное изображение двойного электрического слоя

Полученные данные о  $\zeta$ -потенциале на поверхности гидрофильных КТ и размере наночастиц приведены в таблице 5. При рН 8,0 на частицах наблюдается существенный отрицательный заряд, что указывает на стабильность коллоидной дисперсии.

Таблица 5 — Физико-химические характеристики КТ

Квантовая точка	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм	$d_{\text{ПЭМ}}$ , нм	$d_{\text{ДРС}}$ , нм	$\zeta$ -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:  $\lambda_{\text{макс}}$  — длина волны максимального значения интенсивности флуоресценции;  $d_{\text{ПЭМ}}$  — диаметр КТ, измеренный ПЭМ;  $d_{\text{ДРС}}$  — диаметр КТ, измеренный методом ДРС

Кроме того, КТ, покрытые ПТВП были охарактеризованы горизонтальным электрофорезом в агарозном геле (Рисунок 32).

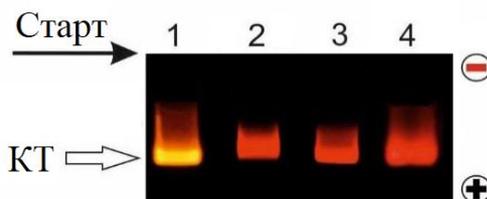


Рисунок 32 — Агарозный гель-электрофорез КТ-ПТВП с максимумами флуоресценции при 600 нм (1), 640 нм (2), 680 нм (3), 700 нм (4)

Анализ показал, что все КТ имеют одинаковую электрофоретическую подвижность, что позволяет говорить об однородности КТ и близком по значению поверхностном заряде.

### 3.1.2 Спектральные характеристика квантовых точек в растворе и на иммунохроматографических тестах

Так как БЛИК область входит в окно прозрачности биологических матриц, для исследования были синтезированы КТ, флуоресцирующие именно в данной области спектра 700–800 нм. В рамках работы исследовали два вида КТ состава CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS, покрытых ПТВП, люминесцирующие в БЛИК области спектра, с максимумом эмиссии при 700 нм (КТ700) (Рисунок 33) и 800 нм (КТ800) (Рисунок 34) [222]. 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 [229]. Помимо этого, в спектрах поглощения КТ800 не проявляется экситонный пик, что может свидетельствовать о содержании примесных ионов и дефектов кристаллической решетки в КТ.

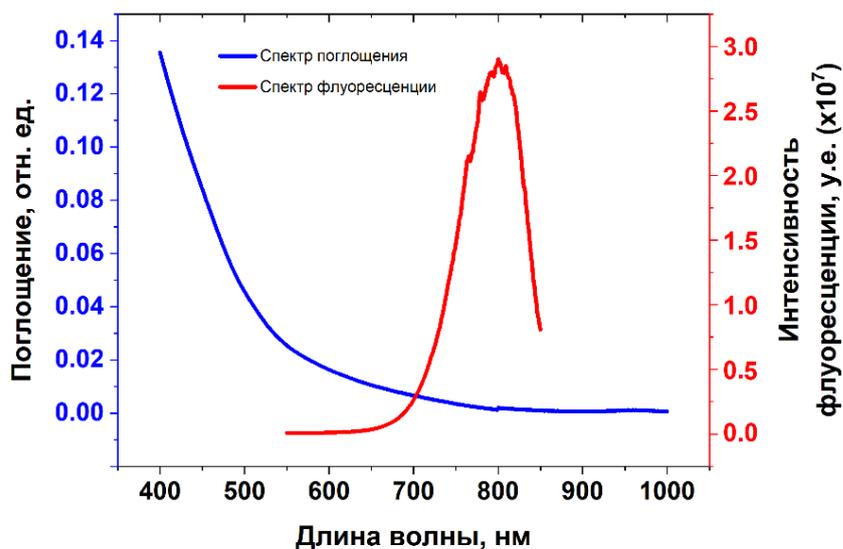


Рисунок 33 — Спектр поглощения и флуоресценции синтезированных методом МКС CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВПИ–КТ800 с  $c = 7$  мг/мл,  $V = 2$  мкл. Измерения проводились спектрофлуориметре FluoroLog 3 модель FL3–21

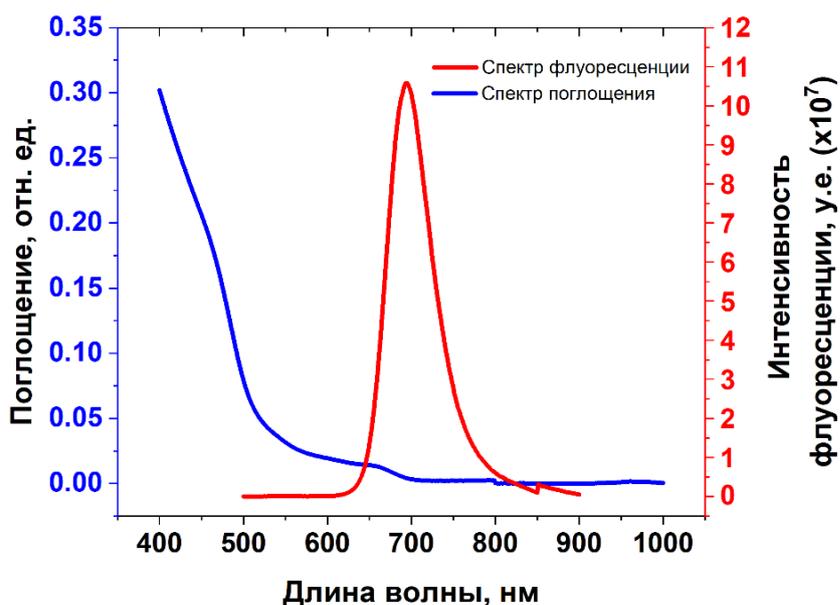


Рисунок 34 — Спектр поглощения и флуоресценции синтезированных методом МКС CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВПИ–КТ700 с  $c = 4$  мг/мл,  $V = 2$  мкл. Измерения проводились спектрофлуориметре FluoroLog 3 модель FL3–21

CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВПИ-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 [230].

Тест-полоски для проведения ИХА изготавливали по методике [231].

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 (Рисунок 35).

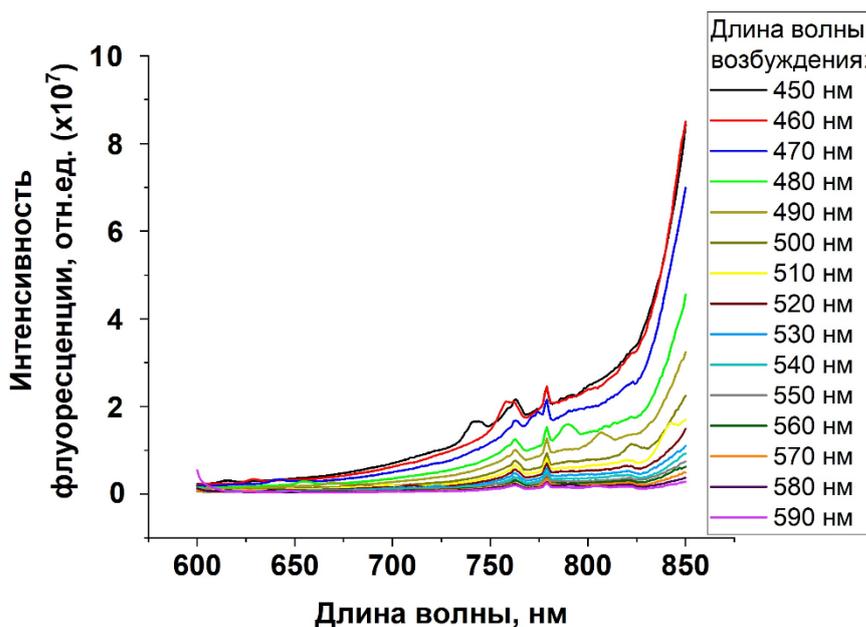


Рисунок 35 — Спектры флуоресценции нитроцеллюлозной мембраны HF135 Milipore при различной длине волны возбуждения от 450 до 590 нм с шагом 10 нм. Измерения проводили на спектрофлуориметре FluoroLog 3 модели FL3-21

Согласно [232] при длине волны возбуждения 350 нм спектр флуоресценции НЦМ охватывает широкую область спектра и пик флуоресценции в видимой области находится при 550 нм (Рисунок 36).

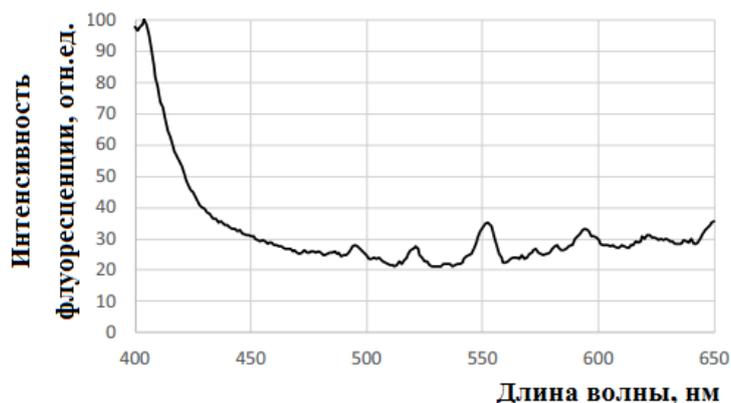


Рисунок 36 — Спектр флуоресценции НЦМ HF180 Milipore при длине волны возбуждения 350 нм, по материалам [232]

Результаты зависимости флуоресценции нитроцеллюлозной мембраны от длины волны возбуждения, снятые в данной работе показывают, что наибольшая интенсивность флуоресценции соответствует длине волны эмиссии 850 нм (Рисунок 37).

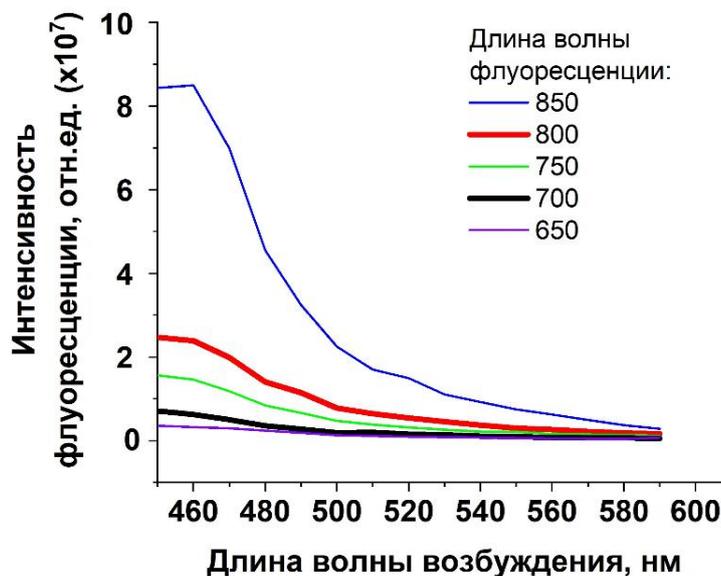


Рисунок 37 — Зависимость интенсивности флуоресценции НЦМ HF135 Milipore от длины волны возбуждения при различных длинах волн эмиссии. Измерения проводили на спектрофлуориметре FluoroLog 3 модели FL3–21

Аналогичные спектры возбуждения были получены и для КТ800 и КТ700 (Рисунок 38).

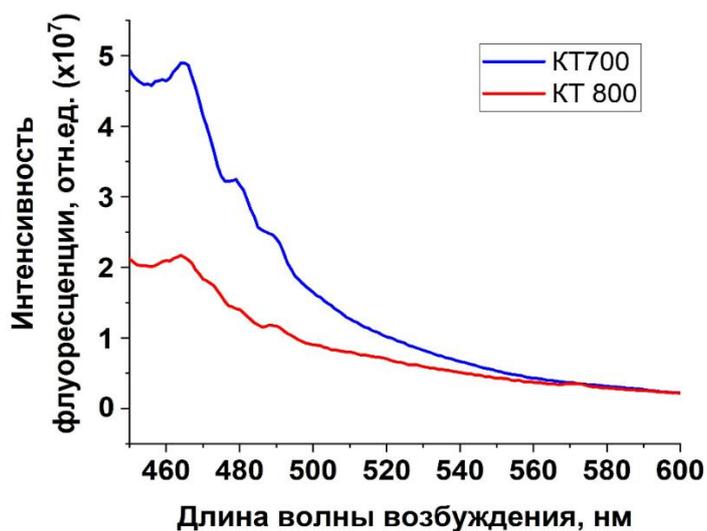


Рисунок 38 — Спектры возбуждения для синтезированных методом МКС КТ800 КТ с  $[c] = 7$  мг/мл,  $V=2$  мкл (слева) и КТ700 с  $[c] = 4$  мг/мл,  $V = 2$  мкл (справа). Измерения проводили на спектрофлуориметре FluoroLog 3 модели FL3–21

На основании вышеизложенных данных (Рисунок 35 –Рисунок 38) была построена зависимость соотношения интенсивности сигнала к фону (фон — НЦМ) от длины волны возбуждения для КТ700 и КТ800 (Рисунок 39). Зависимость показывает, что оптимальная длина волны возбуждения для КТ700 нм лежит в области 460–500 нм, для КТ800 — 570 нм.

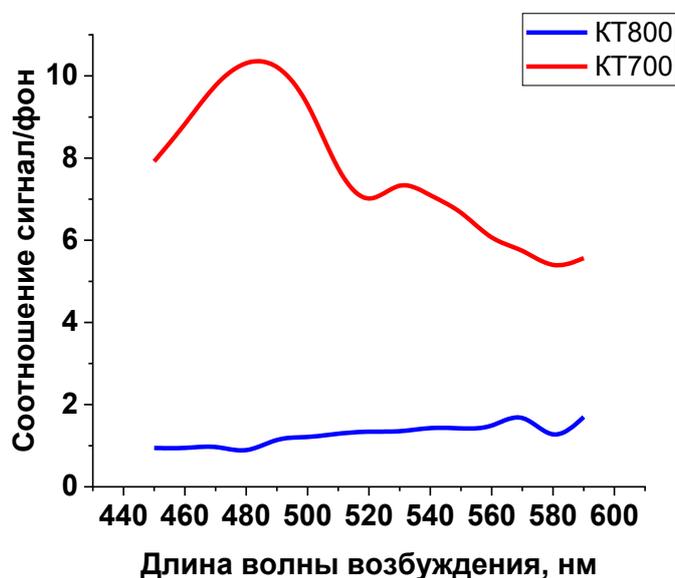


Рисунок 39 — Зависимость соотношения сигнал/фон от длины волны для синтезированных методом МКС КТ800 и КТ700. Измерения проводили на спектрофлуориметре FluoroLog 3 модели FL3–21

Исходя из того, что максимальное соотношение сигнал/фон соответствует КТ700, эти КТ были выбраны в качестве меток антител в ИХА для конъюгации с антителами и дальнейшего исследования.

### ***Заключение по главе 3:***

Осуществлена модификация гидрофобных CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-КТ с целью получения биосовместимых КТ и исследованы свойства модифицированных КТ. Изучено влияние гидрофилизующего сополимера ПТВП на размерные и оптические свойства КТ с различными пиками флуоресценции и выявлено, что чем меньше дополнительных полупроводниковых слоев на поверхности, тем сильнее влияние ПТВП на свойства КТ. Изучение  $\zeta$ -потенциала и исследование КТ горизонтальным электроферозом показало, что поверхность КТ обладает существенным отрицательным зарядом и КТ имеют одинаковую подвижность, свидетельствующую об их однородности. Гидродинамический размер после гидрофизации составил 12–15 нм, КВ уменьшился в среднем на 10 – 15 %.

Изучено мешающее влияние компонентов тест-полоски на сигнал при использовании КТ, флуоресцирующий в БЛИК области спектра (КТ700 и КТ800). 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, соответствующая 460–500 нм.

## **Глава 4. Конъюгация квантовых точек с антителами к gB вируса болезни Ауески**

В работе для получения конъюгатов КТ с антителами использовали ковалентную иммобилизацию антител [233]. Для этого исходные КТ подвергались модификации с образованием на их поверхности карбоксильных групп [234]. Пришивка белков к карбоксильным группам осуществлялась в мягких условиях карбодимидным методом с образованием ковалентной связи [177] согласно вышеописанной методике по схеме, представленной на рисунке 40.

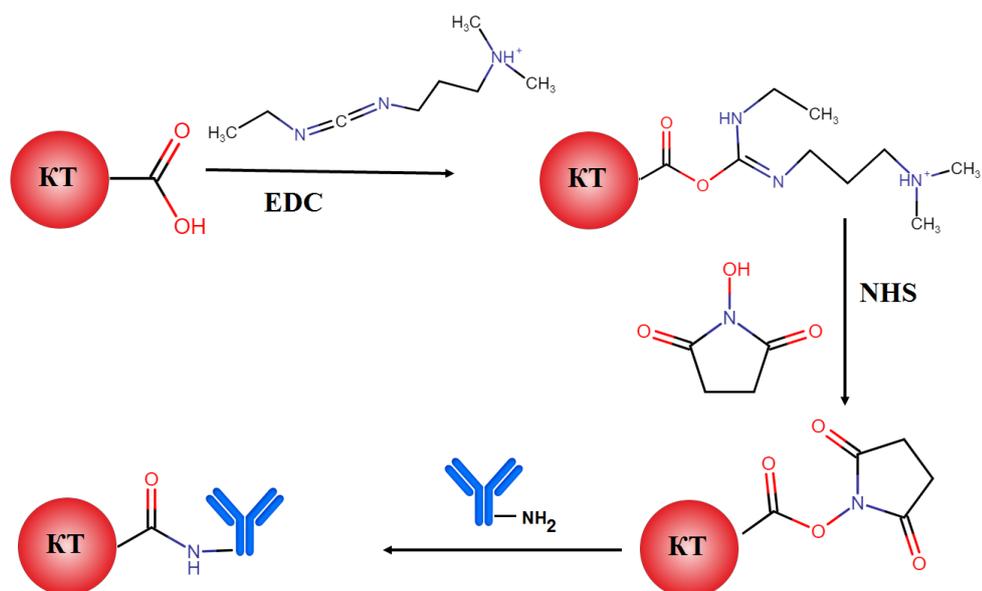


Рисунок 40 — Схема конъюгации КТ с антителами при использовании EDC и NHS

При взаимодействии КТ с EDC происходит нуклеофильная атака кислорода карбоксильной группы на карбодиимид с образованием O-ацилизоумочевины, высоко реакционноспособного промежуточного соединения, которое может реагировать с аминами с образованием амидной связи. Добавление NHS позволяет образовывать второе промежуточное соединение (NHS-эфир), более растворимое и стабильное, которое в итоге реагирует с амином с образованием конечного продукта. Первое образовавшееся промежуточное соединение (O-ацилизоумочевина) медленно реагирует с аминами, и в процессе может происходить гидролиз, снижая выход конъюгации. Другим недостатком, связанным с низкой скоростью реакции, является потенциальная рацемизация аминокислот, которая может привести к денатурации белка или потере активности. Второе промежуточное соединение, образующееся в реакции с NHS, устойчиво к гидролизу в воде и быстро реагирует с аминами, образуя стабильную амидную связь (Рисунок 40). Оптимальный диапазон pH для сочетания EDC составляет 4,5–7,5, за пределами этого значения pH скорость реакции и выход снижаются [170].

Биологические системы могут содержать аминогруппы, которые связываются с активированными карбоксильными группами, поэтому для блокирования непрореагировавших сложных эфиров NHS требуется заключительный этап. Это может быть выполнено путем взаимодействия биоконъюгата с глицином или трис-(гидроксиметил)аминометаном. Необходимо заметить, что активация карбодиимидом уменьшает отрицательный заряд поверхности наночастиц, что может привести к их

агрегации. Это ограничение может быть минимизировано путем уменьшения количества используемых связующих агентов [170].

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 41). Образование конъюгатов КТ с антителами сопровождалось изменением электрофоретической подвижности. В образце без антител этот сдвиг не наблюдали (Рисунок 41 а). Хорошая электрофоретическая однородность продуктов и отсутствие неконъюгированных КТ были получены при соотношении антитело:КТ 10:1 и соотношении КТ:EDC 1:2000 (Рисунок 41ж).

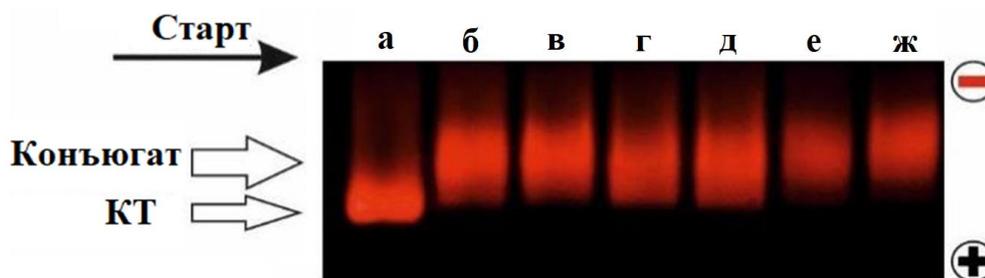


Рисунок 41 — Агарозный гель-электрофорез продуктов конъюгации между CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS с антителами при различных соотношениях КТ:антитело:EDC.

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 исследовали зависимость  $\zeta$ -потенциала антител к gV ВБА и КТ состава CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВП от pH растворов (Рисунок 42). 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.

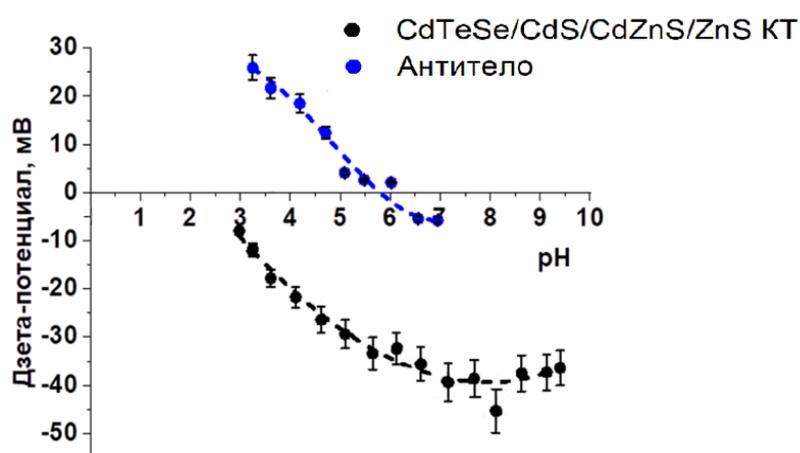


Рисунок 42 – Зависимость  $\zeta$ -потенциала моноклональных антител ADV 34/2 к гликопротеину gV ВБА и КТ состава CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВП от pH раствора

Значение  $\zeta$ -потенциала позволяет количественно оценить величину электрического заряда в двойном электрическом слое. Анализ публикаций, посвященных молекулярному моделированию распределения заряженных групп на поверхности антител при различных значениях pH, показал, что при  $\text{pH} < \text{pI}$  антител, наибольшая плотность реакционноспособных положительно заряженных участков находится на Fc-фрагменте между  $\text{C}_{\text{H}2}$  и  $\text{C}_{\text{H}3}$  доменами.

Анализируя полученную зависимость  $\zeta$ -потенциала от pH возможно определить значение pI, которое для антител, используемых в работе, равно 6. Для осуществления электростатических взаимодействий необходимо, чтобы раствор антител имел pH на 0,5–1,0 ниже изоэлектрической точки. КТ CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВП при  $\text{pH} = 5$  имеют значение  $\zeta$ -потенциала равное  $-30$  мВ, обусловленное наличием отрицательно заряженных

COO<sup>-</sup> групп, и сохраняют коллоидную стабильность. Для осуществления электростатических взаимодействий необходимо, чтобы буферный раствор, в котором проводится конъюгация не содержал электролитов с высокой ионной силой. Ввиду этого в качестве реакционной среды был выбран органический буферный раствор MES с pH = 5,0. После проведения иммобилизации антител на КТ, полученные конъюгаты очищали от несвязавшихся компонентов методом гель-хроматографии. Таким образом, полная схема ориентированной конъюгации КТ с антителами с дальнейшей очисткой представлена на рисунке 43 [235].

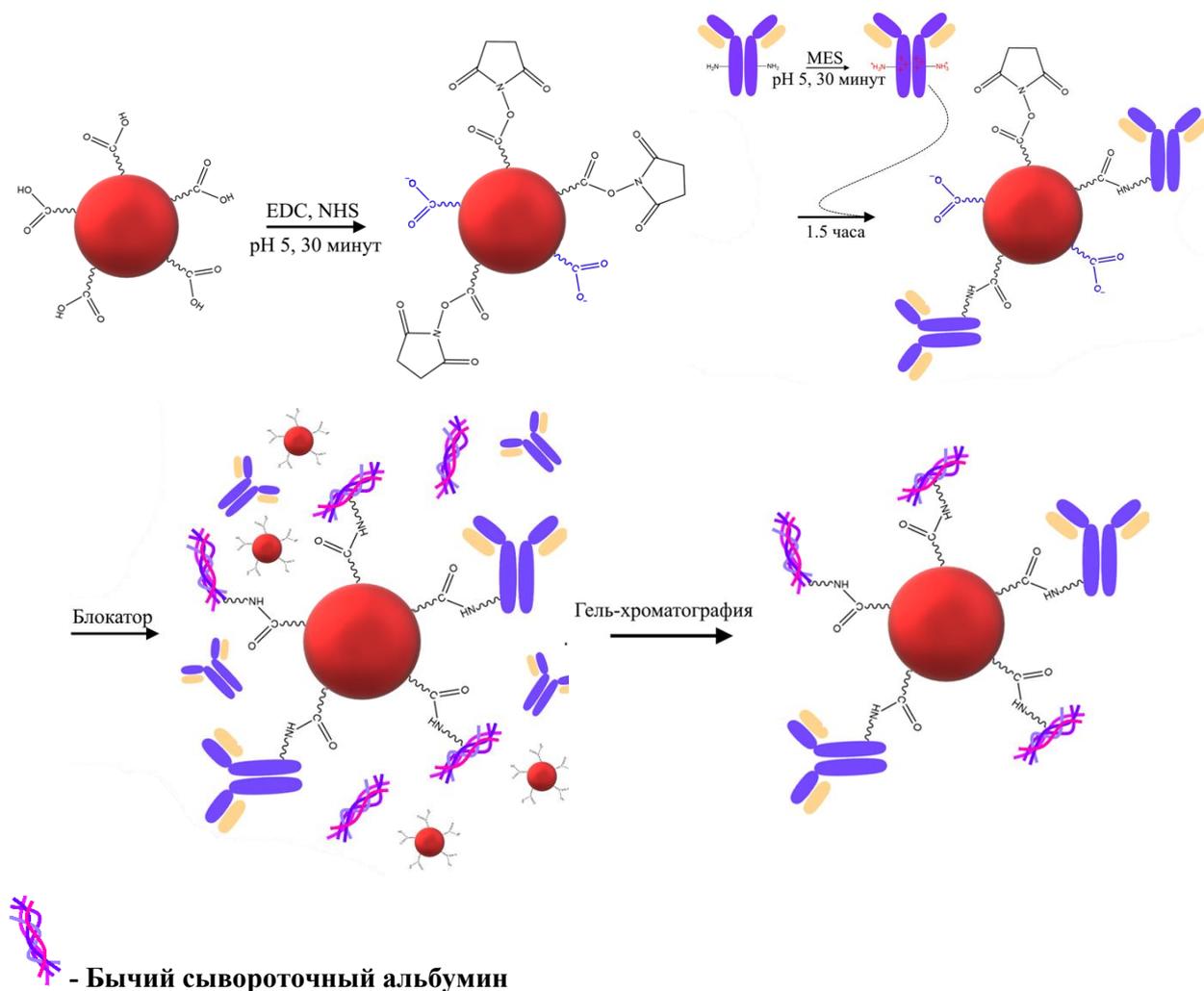


Рисунок 43 – Схема ориентированной конъюгации КТ с антителами с дальнейшей очисткой

Анализируя спектры поглощения КТ и конъюгатов, можно наблюдать в районе 470 – 490 нм экситонный пик, при этом около 280 нм появляется перегиб, что соответствует поглощению белков (Рисунок 44).

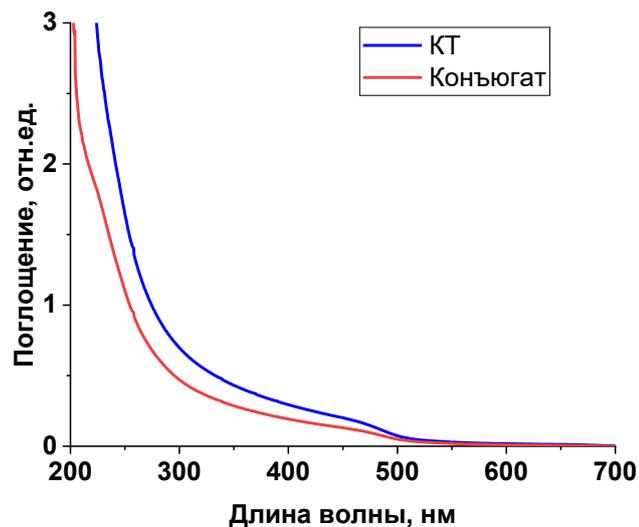


Рисунок 44 — Спектры поглощения синтезированных методом МКС КТ700 и конъюгата КТ700 с моноклональными антителами ADV 34/2 к гликопротеину gB ВБА при мольном соотношении 1:10. Измерения проводили на спектрофотометре UNICO-2100/2800

Ковалентная иммобилизация антител на КТ приводит к уменьшению интенсивности спектра поглощения, что может свидетельствовать об образовании конъюгата КТ с антителами [236].

Для определения влияния рН раствора на конъюгацию и ориентацию антитела на поверхности КТ, антитела предварительно ионизировали при рН 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 и затем конъюгировали с КТ (Рисунок 45).

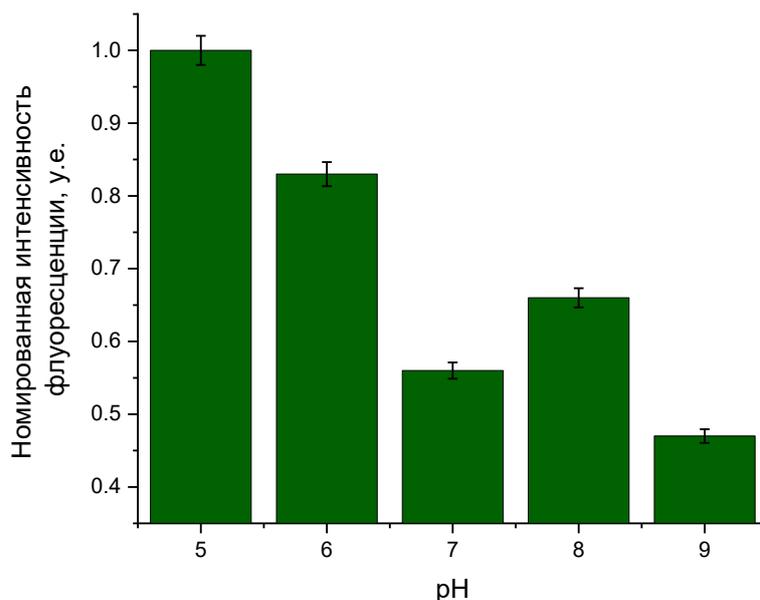


Рисунок 45 — Зависимость интенсивности флуоресценции тестовой зоны от рН буферного раствора для проведения конъюгации КТ700 с антителами;  $[c]_{gB} = 0,2$  мкг/мл

Из зависимости можно предположить, что поверхность КТ, обусловленная отрицательно заряженными карбоксильными группами, будет связывать больше антител при низких рН, поскольку на антителах при рН 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.

Размеры КТ и их конъюгатов измерялись методом ДРС. Средний гидродинамический размер многослойных КТ составил 15 – 20 нм. После конъюгации средний размер увеличивался до 30 – 40 нм. Такое увеличение может быть вызвано присутствием антител на поверхности. При этом КВ КТ после конъюгации снижался с 80 % до 45 %.

Помимо рН на ориентацию и количество антител, которые могут быть прикреплены к поверхности КТ, могут влиять сочетание таких факторов, как размер КТ, свойства поверхности КТ, природа биомолекулы, стерические причины и используемый метод биоконъюгации.

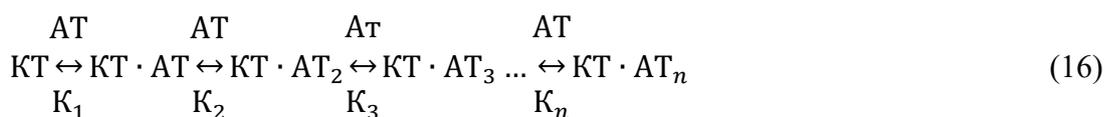
На поверхности КТ после присоединения первой молекулы белка остается поверхность для присоединения последующих молекул белков. Предельное количество молекул белка, которое может присоединиться к КТ, определяется соотношением размеров этих наночастиц. В связи с этим начнем с обсуждения размеров всех этих частиц. Оценку размеров участвующих в конъюгации частиц проводили как экспериментально, так и с привлечением литературных данных (

Таблица 6).

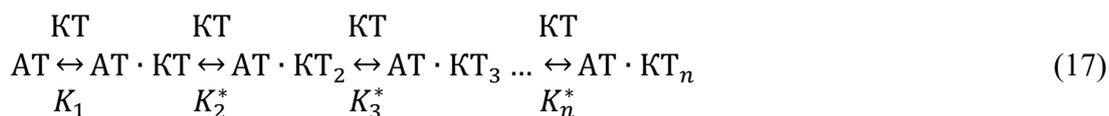
Таблица 6 — Размер КТ, антител и их конъюгатов

Объект	Размер, измеренный методом ДРС, нм	Размер из литературного источника, нм
КТ	15–20	5,8–6,3 [173]
Антитело	10	14 [239]
Конъюгат	30–40	17,4–18 [173]

Из данных, приведенных в таблице 6, можно предположить, что конъюгат образуется из одной КТ и одной молекулы антитела. Между тем конъюгаты могут включать различное число молекул антител и КТ. Максимальное число антител, связанных с одной КТ, определяется плотной упаковкой этих частиц, представляемых в первом приближении в виде шаров. Предположительно КТ и антитела имеют приблизительно одинаковый размер, что соответствует изучаемым нами системам. Плотная упаковка одинаковых сфер предполагает их расположение в пространстве таким образом, чтобы они занимали минимально возможное пространство. Эта проблема имеет большое значение для кристаллохимии. Наиболее плотная упаковка имеет место для гексагональной и кубической гранецентрической упаковки шаров. При этом число касающихся шаров (координационное число) не может превышать 12 [237]. Таким образом с геометрической точки зрения конъюгаты КТ могут содержать до 12 молекул антител. В работе [238] было показано, что КТ способны образовывать в биологических средах вокруг себя «белковую корону», плотно покрывающую поверхность КТ. Образование ряда конъюгатов с различным количеством молекул антител может быть представлено следующей схемой:



Аналогично можно представить образование конъюгатов антител с несколькими КТ:



В работе [240] упоминается, что по стерическим причинам только от 2 до 5 молекул белка массой 100 кДа могут быть присоединены к КТ размером 5 нм.

Однако, процесс взаимодействия антител (в общем случае белков) с КТ может приводить к образованию более сложных надструктур, в которых имеет место чередование антител с КТ. Такие, чаще всего нерастворимые надструктуры, не представляют интереса для иммунохимических методов анализа и их образование нежелательно. Необходимо четкое понимание с какой стехиометрией конъюгаты оптимальны для иммунохимического анализа. Формально увеличение числа флуоресцентных меток КТ по отношению к частицам антител в конъюгате должно приводить к увеличению чувствительности определения аналита. Однако следует учитывать, что введение в конъюгат более одной частицы КТ может приводить к стерическому блокированию паратопов антител, распознающих эпитопы антигенов — целевых аналитов и тем самым понижать чувствительность иммунохимического анализа.

Таким образом, оптимальными являются конъюгаты со стехиометрией 1:1, все конъюгаты с иной стехиометрией нежелательны. В ходе синтеза конъюгатов необходимо создавать такие условия, при которых процесс конъюгации останавливается на первой стадии, и дополнительно очищать этот конъюгат от побочных продуктов. Следует отметить, что получению конъюгатов с низкой стехиометрией на практике способствует использование антител и КТ с низкой концентрацией, а также понижение констант связывания в рядах  $K_1 > K_2 > K_3 > \dots > K_n$  и  $K_1 > K_2^* > K_3^* > \dots > K_n^*$ . В случае второго ряда понижение констант взаимодействия прежде всего может вызываться за счет электростатического отталкивания поверхностно заряженных КТ.

#### ***Заключение по главе 4:***

Проведена конъюгация КТ700 с антителами к модельному вирусу gВ ВБА карбодимидным методом. Осуществлен подбор оптимальных условий для проведения конъюгации с помощью горизонтального агарозного гель-электрофореза. Выявлено, что электрофоретическая однородность продуктов и отсутствие неконъюгированных КТ наблюдается при соотношении антитело:КТ 10:1 и соотношении КТ:EDC 1:2000 в процессе синтеза конъюгатов.

Исследована зависимость  $\zeta$ -потенциала антител и КТ от рН растворов, определена рI антител, равная 6, и максимальное значение разноименных зарядов взаимодействующих

КТ и антител. Изучена зависимость интенсивности сигнала тестовой зоны от рН при проведении конъюгации и показано, что при рН 5,0 максимальная интенсивность флуоресценции иммунокомплекса, образующегося на тестовой зоне тест-полоски после проведения ИХА. Увеличение интенсивности сигнала может косвенно доказывать связывание большего количества антигенов с доступными паратопами антител на поверхности КТ.

Установлено, что после конъюгации средний размер увеличивался с 15 – 20 нм до 30 – 40 нм, при этом КВ КТ после конъюгации снижался с 80 % до 45 %.

На основании экспериментальных и литературных данных сделан вывод о влиянии различных факторов на иммунную активность антител, связанных с поверхностью КТ: рН и природа буферного раствора, стерические факторы (количество иммобилизованных антител на поверхности КТ). Выявлено, что оптимальными являются конъюгаты со стехиометрией 1:1, все конъюгаты с иной стехиометрией нежелательны.

## **Глава 5. Исследование свойств квантовых точек и их конъюгатов методами капиллярного электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии**

Целью этого раздела являлось получение дополнительной информации о КТ, антителах и их конъюгатах с антителами. Основными факторами, определяющими поведение высокомолекулярных аналитов в данных методах разделения, являются размеры исходных объектов и их комплексов (конъюгатов), их заряды и химическая структура поверхности.

В условиях капиллярного электрофореза скорость миграции частиц определяется их электрофоретической подвижностью и электроосмотическим потоком. На скорость влияет приложенное напряжение, состав фонового электролита, его вязкость, ионная сила, pH, а также размер и поверхностный заряд определяемого аналита. КЗЭ используется для разделения и анализа белковых молекул и является универсальным методом определения образования конъюгатов наночастиц с антителами. В связи с этим, метод КЭ является хорошей альтернативой существующим методам анализа и характеристики белков, КТ и их конъюгатов. К преимуществам КЭ относятся высокая эффективность разделения, экспрессность, простота пробоподготовки, низкие пределы обнаружения и надёжная работа капилляра с экономичными водными буферами.

CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS КТ, покрытые ПТВП, на поверхности также имеют  $\text{COO}^-$ , что обуславливает отрицательное значение  $\zeta$ -потенциала в диапазоне  $\text{pH} = 5 - 10$ . Следует отметить, что исследуемые КТ при  $\text{pH} \geq 10$  нестабильны и склонны к коагуляции. В таком состоянии они не только не подлежат исследованию методом КЭ, но и могут привести к засорению капилляра. В связи с чем при исследовании КТ методом КЭ в качестве фонового электролита целесообразно выбирать буфер со значением pH в диапазоне от 5 до 9,5.

Для анализа отрицательно заряженных частиц используют отрицательную полярность – анод у детектора. При отрицательной полярности движение ЭОП направлено в сторону, противоположную детектору. В этом случае, для модификации стенок капилляра и обращения ЭОП в фоновый электролит вводят катионный ПАВ, например, цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ). Однако при проведении анализа в условиях отрицательной полярности КТ не определялись, что может быть связано с их нестабильностью в фоновом электролите, взаимодействием отрицательно заряженной поверхности наночастиц с ЦТАБ и модификацией их поверхности, при которой может увеличиваться размер и изменяться заряд поверхности КТ. Таким образом, дальнейшее исследование проводили методом КЗЭ в условиях положительной полярности.

В работе было проведено исследование влияния значения рН 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 рН. Эффективность системы оценивали по значениям высоты эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ) и числа теоретических тарелок (N).

ПАВ часто используют в качестве добавок к ведущему электролиту, так как многие ПАВ не взаимодействуют с анализируемым веществом, а адсорбируются на внутренней стенке капилляра, предотвращая необратимую сорбцию образцов. В условиях положительной полярности анионные ПАВ не меняют направление ЭОП. Для исследования влияния ПАВ на эффективность электрофоретической системы в качестве анионного ПАВ в фоновый электролит добавляли ДДСН. Однако при добавлении в фоновый электролит ДДСН, на электрофореграмме наблюдалось сильное уширение пиков КТ и АТ. Поэтому для дальнейших исследований были выбраны фоновые электролиты без добавления ПАВ. В таблице 7 приведены электрофоретические параметры для ведущих электролитов различного состава и рН.

Таблица 7 — Электрофоретические параметры КТ, антител и конъюгатов в фоновых электролитах с различным рН

Аналит	Фоновый электролит, рН	$t_m$ , мин	$\mu$ , $\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	N, шт	H, см
Конъюгаты	25 мМ боратный буфер, рН = 9,2	4,57	$4,4 \cdot 10^{-1}$	$1,34 \cdot 10^6$	$2,54 \cdot 10^{-5}$
Антитела		6,59	$3,0 \cdot 10^{-1}$	$6,95 \cdot 10^5$	$8,05 \cdot 10^{-4}$
КТ		14,84	$1,4 \cdot 10^{-1}$	$2,20 \cdot 10^7$	$2,54 \cdot 10^{-5}$
Конъюгаты	25 мМ фосфатный буфер, рН = 8	7,24	$2,8 \cdot 10^{-1}$	$5,25 \cdot 10^6$	$1,07 \cdot 10^{-4}$
Антитела		8,12	$2,5 \cdot 10^{-1}$	$1,17 \cdot 10^5$	$4,78 \cdot 10^{-3}$
КТ		8,17	$2,5 \cdot 10^{-1}$	$4,27 \cdot 10^6$	$1,31 \cdot 10^{-4}$
Конъюгаты	25 мМ фосфатный буфер, рН = 7	8,61	$2,3 \cdot 10^{-1}$	$1,18 \cdot 10^6$	$4,73 \cdot 10^{-4}$
Антитела		9,41	$2,1 \cdot 10^{-1}$	$2,46 \cdot 10^5$	$2,28 \cdot 10^{-3}$
КТ		8,67	$2,3 \cdot 10^{-1}$	$1,20 \cdot 10^6$	$4,66 \cdot 10^{-4}$
Конъюгаты	25 мМ фосфатный буфер, рН = 6	17,19	$1,2 \cdot 10^{-1}$	$5,25 \cdot 10^5$	$1,07 \cdot 10^{-3}$
Антитела		10,92	$1,8 \cdot 10^{-1}$	$3,05 \cdot 10^5$	$1,83 \cdot 10^{-3}$
КТ		11,11	$1,8 \cdot 10^{-1}$	$4,93 \cdot 10^5$	$1,13 \cdot 10^{-3}$

Аналит	Фоновый электролит, рН	$t_m$ , мин	$\mu$ , $\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	N, шт	H, см
Конъюгаты	25 мМ фосфатный буфер, рН = 5	—	—	—	—
Антитела		—	—	—	—
КТ		21,81	$0,9 \cdot 10^{-1}$	$2,11 \cdot 10^6$	$2,66 \cdot 10^{-4}$

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

Из приведенных в таблице 7 данных видно, что для конъюгатов и антител с возрастанием рН раствора наблюдается уменьшение времени миграции частиц. При увеличении рН фонового электролита наблюдается значительное улучшение разрешения пиков для конъюгатов (рН = 7 и 8) и КТ (рН = 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 рН = 9,2, капилляра диаметром 50 мкм  $L/L_{\text{эф}} = 64,5/56$  см, с расширением и длиной оптического пути 150 мкм. Таким образом, как видно из электрофореграммы (Рисунок 46), условия использования 25 мМ боратного буферного раствора с рН=9,2 при напряжении +30 кВ являются оптимальными для разделения КТ, антител и их конъюгатов (Таблица 8).

Таблица 8 — Рекомендуемые условия анализа КТ, антител и их конъюгатов для системы КЭ Agilent 7100 CE

Параметр	Значение
Капилляр	$L/L_{\text{эф}} = 64,5/56$ см, ID = 50 мкм
Температура	20 °С
Длина волны	210 нм
Ввод пробы	50 мбар, 2 с
Напряжение	+30 кВ
Время анализа	10 – 20 мин
Состав фонового электролита	25 мМ боратного буферного раствора с рН=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.

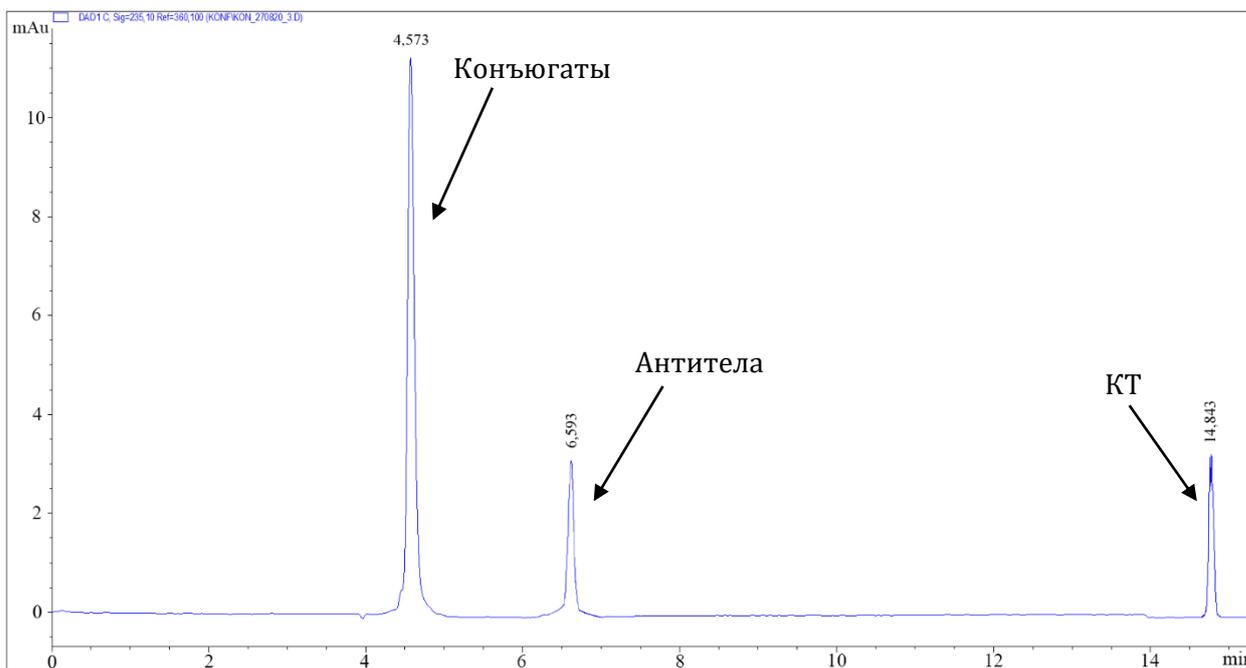


Рисунок 46 — Электрофореграмма смеси КТ, антител и их конъюгатов. Условия проведения анализа: детектирование  $\lambda=210$  нм, напряжение + 30 кВ, фоновый электролит: 25 мМ боратный буфер, pH = 9,2; ID= 50 мкм L/L<sub>эф</sub> = 64,5/56 см, с расширением и длиной оптического пути 150 мкм

Образование конъюгатов CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВП-КТ с антителами дополнительно подтверждали методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) с использованием сорбента C18 [241]. При этом были подобраны условия хроматографирования, которые могут быть применимы для анализа конъюгатов, КТ и антител. На рисунке 47 представлены хроматограммы конъюгатов CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВП-КТ с антителами и исходных частиц при использовании изократического режима элюирования с подвижной фазой (ПФ) состава ацетонитрил (AcN):H<sub>2</sub>O в объемном соотношении 60:40.

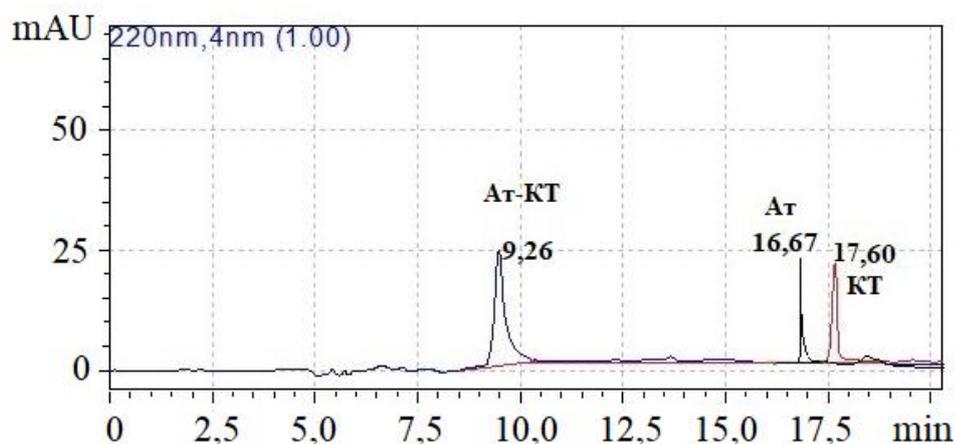


Рисунок 47 — Хроматограмма КТ,  $c = 1,6 \cdot 10^{-4}$  мМ; конъюгатов (Аг-КТ),  $c = 6,5 \cdot 10^{-4}$  мМ; моноклональных антител к гВ ВБА (Аг),  $c = 6,5 \cdot 10^{-4}$  ммоль/л; изократический режим элюирования; ПФ АсN: H<sub>2</sub>O = 60:40; НФ: С18; объем инъекции 1 мкл; скорость потока 1 мл/мин, аналитическая колонка Phenomenex Luna C18 250×4,6 мм, размер частиц сорбента 5 мкм, размер пор 100 Å

Идентификацию хроматографических пиков, соответствующих КТ и конъюгатам, проводили по временам удерживания и по спектрам поглощения. Из хроматограмм видно, что время удерживания КТ составило 17,6 мин, а антитела и конъюгатов — 16,67 и 9,26 мин, соответственно.

Хроматографические параметры, полученные в разработанных условиях для КТ, моноклональных антител и конъюгата в условиях изократического режима элюирования ОФ ВЭЖХ при объеме инъекции 1 мкл и скорости потока 1 мл/мин представлены в таблице 9.

Таблица 9 — Хроматографические параметры в условиях изократического режима элюирования ОФ ВЭЖХ

Аналит	Размер по ДРС, нм	$t'_R$ , мин	$k'$	N	H, мм
Конъюгат	30 – 40	7,41	6,29	$1,37 \cdot 10^4$	$1,82 \cdot 10^{-2}$
КТ	15 – 20	15,75	20,00	$42,93 \cdot 10^4$	$0,05 \cdot 10^{-2}$
Аг	10	14,82	12,08	$71,19 \cdot 10^4$	$0,04 \cdot 10^{-2}$

Примечание:  $t_R$  — время удерживания;  $k'$  — коэффициент емкости; N — эффективность колонки; H — высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ)

Таким образом, при изократическом режиме элюирования с подвижной фазой (ПФ) состава ацетонитрил (АсN):H<sub>2</sub>O в объемном соотношении 60:40 хорошо разделялись конъюгаты, КТ и антитела в условиях ОФ ВЭЖХ.

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.

Хроматографические параметры для КТ, моноклональных антител и конъюгата в условиях изократического режима элюирования при объеме инъекции 10 мкл и скорости потока 3 мл/мин представлены в таблице 10. В выбранных условиях достигалось хорошее разрешение пиков. Однако, время удерживания частиц не соответствовало закономерности удерживания в эксклюзионной хроматографии (Рисунок 48).

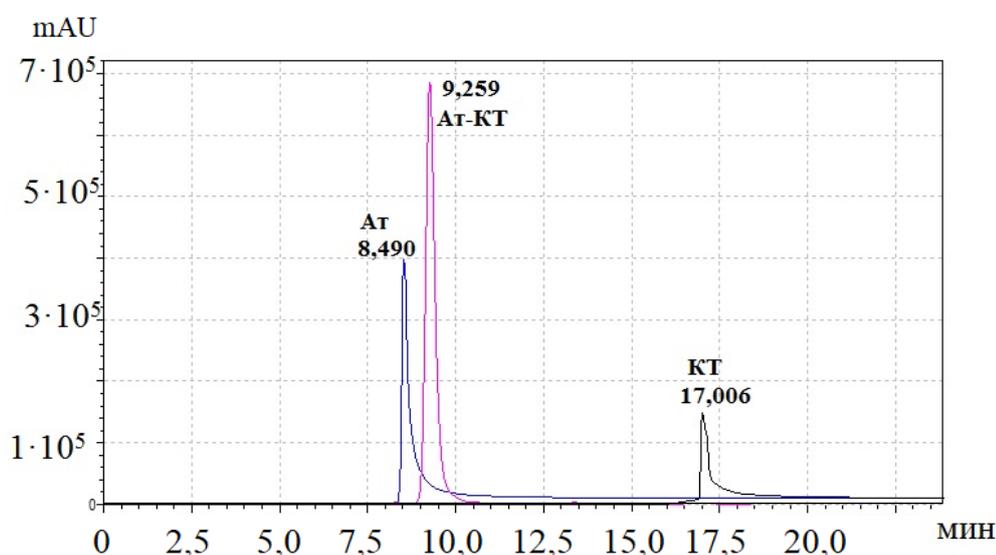


Рисунок 48 — Хроматограммы растворов конъюгата (АТ-КТ), КТ и моноклональных антител к гВ ВБА,  $c = 5,6 \cdot 10^{-4}$ ; ПФ: 33,5 мМ фосфатный буфер; НФ: сферические частицы кремнезема, модифицированный цирконием с гидрофильной диольной привитой фазой; изократический режим элюирования; объем инъекции 1 мкл; скорость потока 1 мл/мин

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 [242].

Таблица 10 — Хроматографические параметры в выбранных условиях хроматографирования

Аналит	Размер частиц, нм	$t'_R$ , мин	$k'$	N	H, мм
Конъюгат	30 – 40	8,06	3,41	$0,53 \cdot 10^4$	$4,7 \cdot 10^{-2}$
КТ	15 – 20	15,81	7,10	$4,01 \cdot 10^4$	$0,6 \cdot 10^{-2}$
Ат	10	7,29	3,04	$1,78 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^{-2}$

Примечание:  $t_R$  — время удерживания;  $k'$  — коэффициент емкости; N — эффективность колонки; H — высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ)

Производители обычно не выдают точную информацию о матрице сорбента. Однако, анализ литературных данных позволяет предположить, что НФ выглядит следующим образом (Рисунок 49).

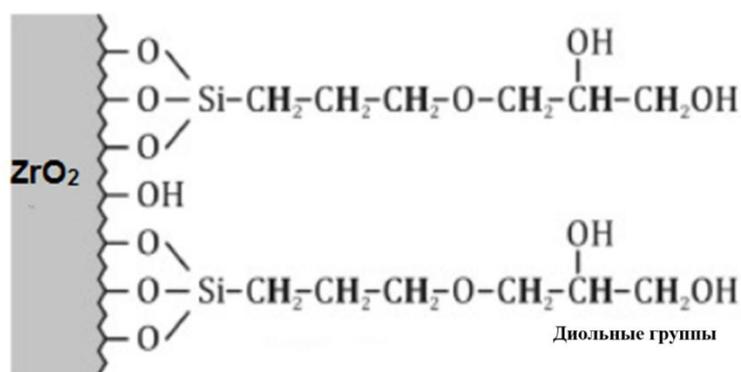


Рисунок 49 — Предполагаемая схема матрицы сорбента колонки для эксклюзионной хроматографии ZORBAX GF-250

Порядок выхода из колонки КТ и антител не соответствует эксклюзионному механизму и может свидетельствовать о взаимодействии аналитов с матрицей используемого эксклюзионного сорбента. Одной из причин «неправильной» последовательности выхода анализируемых веществ может являться образование ионных и водородных связей между материалом сорбента (диольные группы) и анализируемым веществом [242]. 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 50). 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 инъекции 1 мкл.

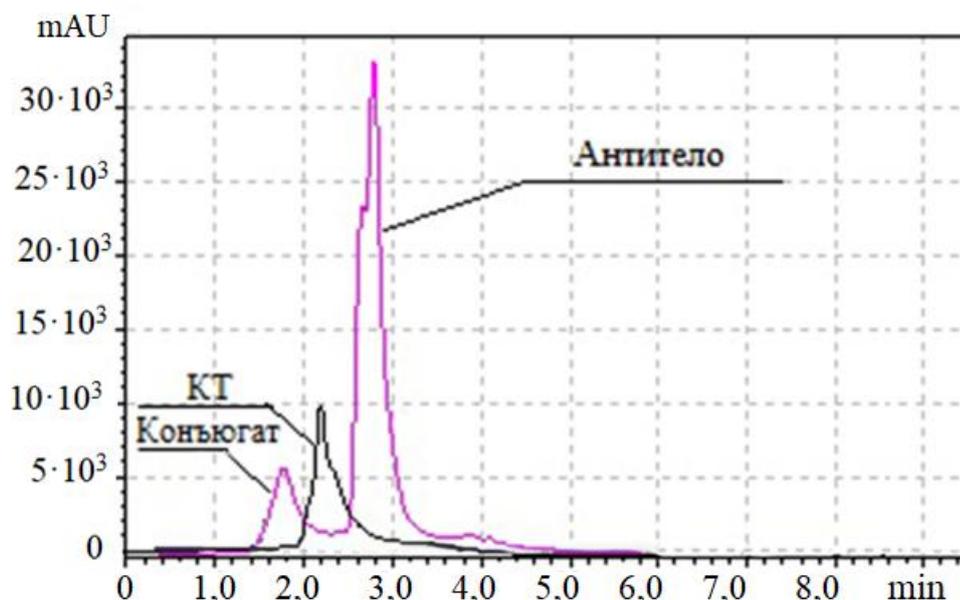


Рисунок 50 — Хроматограммы растворов конъюгатов, КТ и моноклональных антител к gV ВБА; ПФ: 33,5 мМ фосфатный буфер + 0,1% ДДСН, НФ: сферические частицы кремнезема, модифицированные цирконием с гидрофильной диольной привитой фазой, изократический режим элюирования, скорость потока – 3 мл/мин, объем инъекции 1 мкл

Как видно из таблицы 11, при использовании ПАВ в качестве добавки к ПФ, порядок элюирования аналитов соответствует ожидаемому в эксклюзионной хроматографии: конъюгаты, КТ, антитела.

Таблица 11 — Хроматографические параметры эксклюзионного разделения выбранных условиях анализа с добавлением ДДСН

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 и увеличения эффективности хроматографической системы необходимо использовать колонку с сорбентом с большим размером пор.

### **Заключение по главе 5:**

Разработан способ анализа КТ, антител и конъюгатов методами КЗЭ, ВЭЖХ и эксклюзионной хроматографией. Осуществлен выбор оптимальных условий для проведения разделения компонентов системы. Описаны процессы взаимодействия аналитов с матрицей неподвижной фазы. На основании полученных электрофореграмм и хроматограмм для смеси КТ, антител и конъюгатов сделан вывод об эффективности и селективности анализа методами КЗЭ, ВЭЖХ и эксклюзионной хроматографии и способах улучшения эффективности.

Таким образом, для определения и разделения КТ, антител и конъюгатов с высокой эффективностью методом КЗЭ выбраны следующие условия анализа:  $L_{эфф}/L_{общ} = 56/64,5$  см, ID = 50 мкм; состав фонового электролита — 25 мМ боратный буферный раствор, pH = 9,2; напряжение +30 кВ; длина волны детектирования 210 нм. В условиях ОФ ВЭЖХ показано, что конъюгаты, КТ и антитела хорошо разделялись при изократическом режиме элюирования с ПФ состава  $AcN:H_2O$  в соотношении 60:40. Методом эксклюзионной хроматографии эффективное разделение исследуемых частиц достигалось в условиях изократического режима элюирования, с использованием в качестве ПФ 33,5 мМ фосфатного буфера с добавлением 0,1 % ДДСН. При этом метод КЗЭ является наиболее простым, быстрым и эффективным методом анализа КТ и конъюгатов, позволяющим быстро и точно определить их состав и свойства.

## **Глава 6. Разработка и оптимизация иммунохроматографической системы для диагностики гВ вируса болезни Ауески**

Одним из направлений работы является разработка концепции двухуровневой диагностики опасных заболеваний с использованием ИХА. Исходя из этой концепции разработали новую аналитическую платформу двухуровневой иммунохроматографической диагностики особо опасных и резистентных инфекций (Аналитическая платформа ИДОРИ) [243], одной из особенностей которой является использование КТ в качестве меток для моноклональных антител. В ИДОРИ предусматривается два уровня проведения диагностики. Первый уровень диагностики осуществляется по месту забора пробы (РОСТ – *point of care testing*), который имеет ограниченный уровень автоматизации. Вторым уровнем диагностики реализуется в стационарных лабораторных условиях и предназначен для проведения массового анализа, отличается роботизацией аналитических процессов.

Первый уровень диагностики (Рисунок 51) может осуществляться при обследовании отдельного больного или животного, или при массовом обследовании людей или животных в местах их расположения. При диагностике отдельных единичных субъектов необходима недорогая ридерная техника, имеющая минимальную автоматизацию пробоотбора и пробоподготовки. Второй уровень диагностики более подробно описан в приложении А.

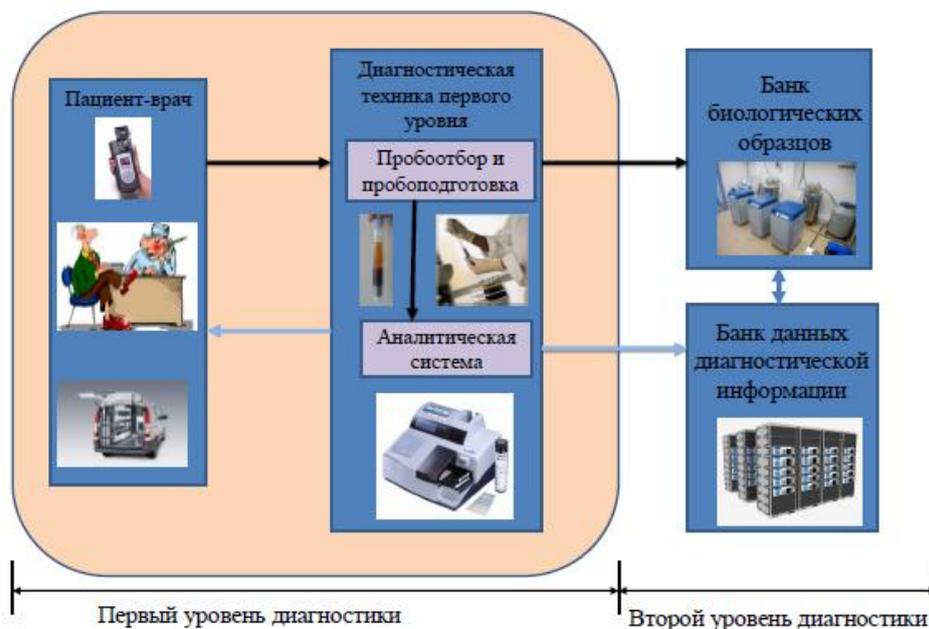


Рисунок 51 — Первый уровень диагностики инфекций [243]

С целью разработки такой техники с использованием ИХА осуществляли подбор оптимальных концентраций конъюгатов с использованием синтезированных КТ700. Сначала проводили сравнение спектров флуоресценции КТ700 в растворе и на тест-полоске. На рисунке 52 представлены зависимости интенсивности флуоресценции растворов КТ700 и их конъюгатов с моноклональными антителами ADV 34/2 к гликопротеину gV ВБА при длине волны эмиссии 700 нм от концентрации [244].

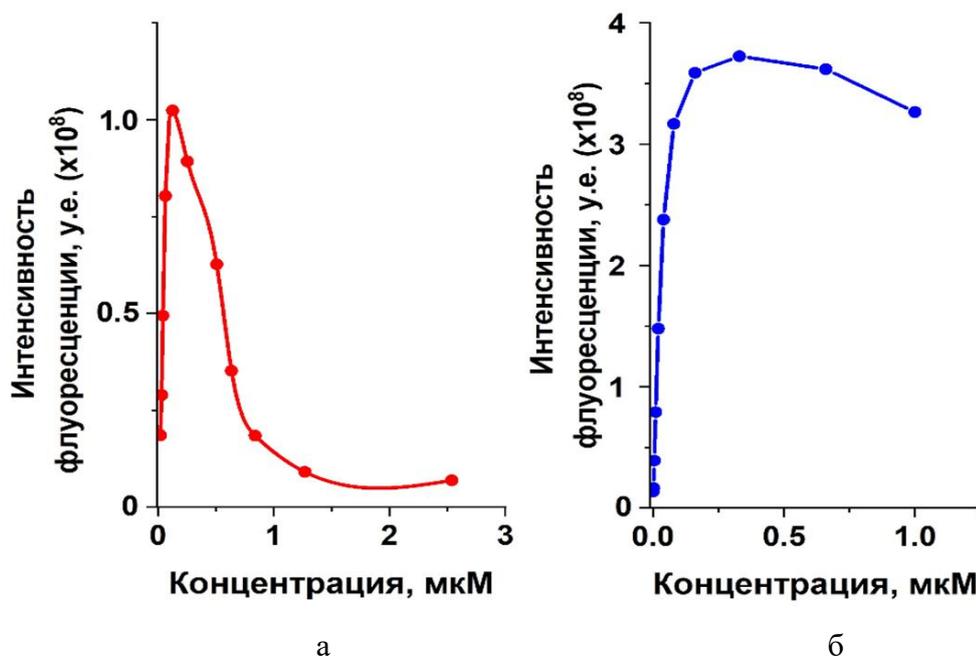


Рисунок 52 — Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации растворов КТ700 (а) и их конъюгатов с моноклональными антителами ADV 34/2 к гликопротеину gV ВБА (б) при длине волны эмиссии 700 нм и при длине волны возбуждения 470 нм

Как видно из рисунка 52 при увеличении концентрации КТ700 до 0,13 мкМ интенсивность пиков 700 нм быстро возрастает, достигает максимального значения при концентрации 0,13 мкМ, а затем резко убывает (Рисунок 52а). Таким образом, при концентрации выше 0,13 мкМ наблюдается явление тушения флуоресценции [245]. А интенсивность флуоресценции конъюгатов Антитело–КТ700 растет до концентрации 0,16 мкМ, далее зависимость выходит на плато и постепенно падает (Рисунок 52б), что также свидетельствует о тушении флуоресценции при высоких концентрациях флуоресцирующих частиц. При этом линейная область зависимости флуоресценции КТ и их конъюгатов от концентрации, представляющая интерес для аналитики не превышает концентрации 0,2 мкМ.

Аналогичные исследования зависимости интенсивности флуоресценции для КТ700 и конъюгатов Антитело–КТ700 были проведены на тест-полосках (Рисунок 53). Для этого 2 мкл раствора конъюгата и КТ наносили на аналитический участок тест-полоски, раствор растекался на площади около 0,25 см<sup>2</sup>. Затем полоску высушивали при комнатной температуре и производили измерение флуоресценции в центральной части пятна. Интенсивность флуоресценции КТ700 и конъюгатов линейно возрастает в диапазоне от 0 до 0,5 мкМ, далее сигнал выходит на плато. Однако, при одной и той же концентрации интенсивность флуоресценции для конъюгатов меньше, чем для исходных КТ700.

Изучение флуоресценции конъюгатов Антитело–КТ700 на нитроцеллюлозной мембране позволило подобрать соотношение реагентов для создания тест-систем с наилучшими характеристиками.

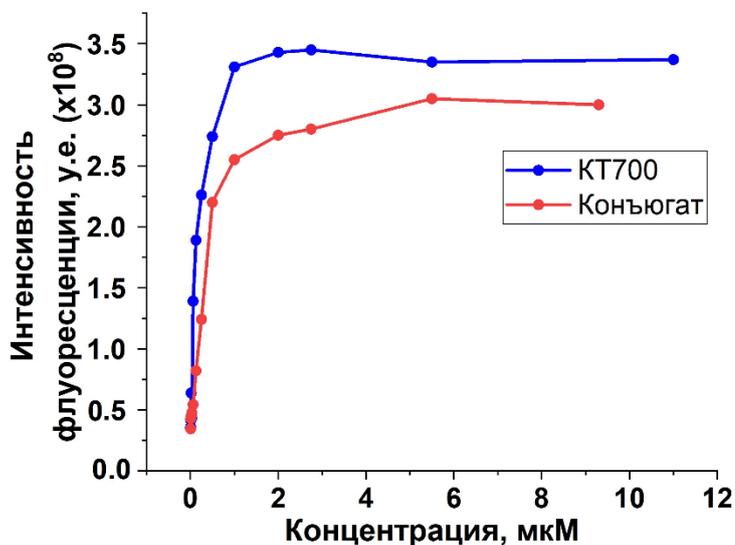


Рисунок 53 — Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации КТ700 и конъюгата КТ700 с моноклональными антителами к гВ ВБА при  $\lambda = 700$  нм и  $\lambda_{\text{возб}} = 470$  нм (на тест-полоске). Объем наносимого конъюгата и КТ 2 мкл

Таким образом, было установлено, что при проведении ИХА с использованием тест-полосок нужно использовать концентрации конъюгатов КТ700–Антитело в диапазоне 0,003–0,5 мкМ, лежащих в линейной области зависимости, представленной на рисунке 54. При этом зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации в растворе и на твердом носителе (тест-полоске) отличаются.

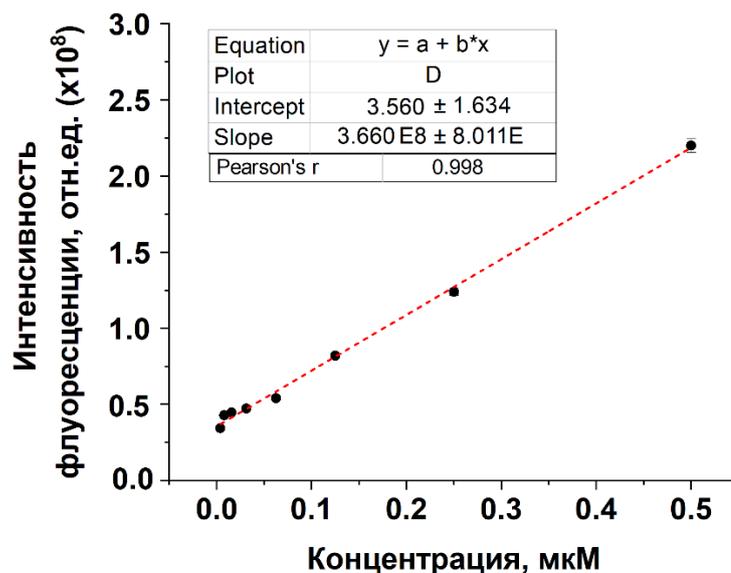


Рисунок 54 — Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации конъюгата КТ700 с моноклональными антителами к gB ВБА при  $\lambda = 700$  нм и  $\lambda_{\text{возб}} = 470$  нм на тест-полоске (линейная область)

Достоверный анализ и характеристика многообразия планарных систем требует использования различных специализированных измерительных устройств. В связи с этим был разработан UV-VIS сканер планарных систем, описанный более подробно в [246]. Для оптимизации иммунохроматографической системы, включающей стрип и ридер, с использованием UV-VIS сканера планарных систем было исследовано распределение КТ-меток вдоль стрипа после завершения иммунохроматографического процесса (Рисунок 55). Из приведенного на рисунке 55 скана тест-полоски 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.

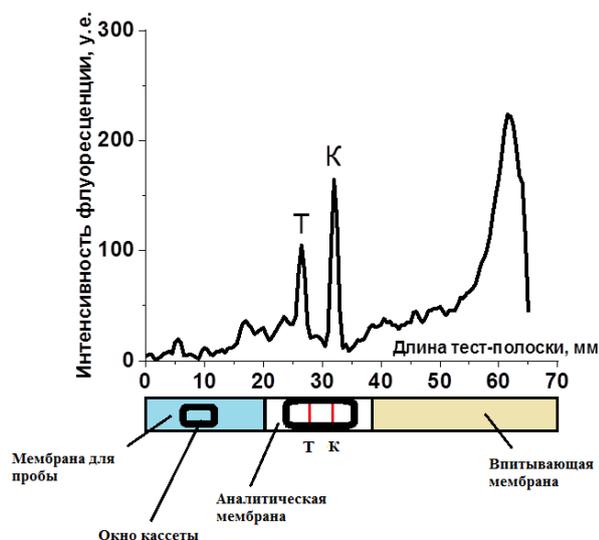


Рисунок 55 — Исследование распределения конъюгата КТ700 с моноклональными антителами к gV ВБА вдоль тест-полоски после завершения ИХА снятое на сканере, сконструированном на базе спектрофлуориметра USB-650 Red Tide фирмы OceanOptics (350 – 1000 нм). Концентрация наносимого конъюгата,  $c = 10 \text{ мкМ}$ ,  $V = 10 \text{ мкл}$

Было определено оптимальное количество наносимого конъюгата на тест-систему, при котором интенсивность сигнала максимальная (Рисунок 56). Исследование распределения конъюгатов вдоль полоски в зависимости от наносимого количества показывает, что наилучший результат, характеризующийся максимальным сигналом и оптимальным распределением, наблюдается при концентрации наносимого конъюгата 2,7 мкМ (Рисунок 56f). При концентрации ниже оптимальной сигнал от тестовой и контрольной зон снижается. В остальных случаях, кроме концентрации наносимого конъюгата 16 мкМ (Рисунок 56а), сигнал тестовой линии такой же, как на рисунке 56f, но с большим количеством конъюгатов во впитывающей зоне. Концентрация лизата ВБА во всех случаях составляет 200 нг/мл. Из зависимостей распределения конъюгата вдоль тест-полоски видно, что оптимальной концентрацией наносимого конъюгата на тест-полоску является 2,7 мкМ.

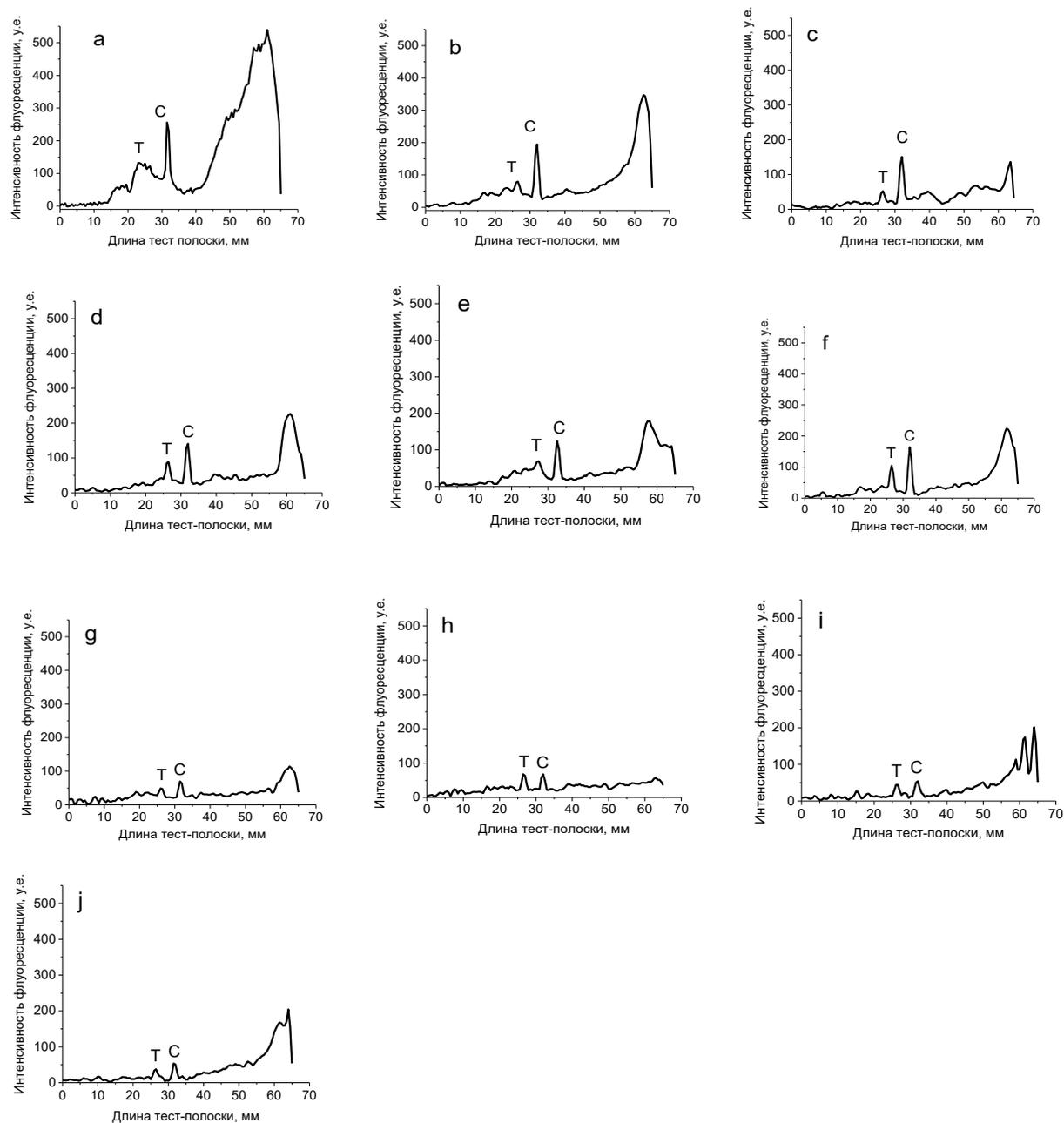


Рисунок 56 — Спектры распределения КТ вдоль тест-полоски в зависимости от концентрации наносимого конъюгата КТ700 с моноклональными антителами к gV ВБА на тест-полоску. Концентрации наносимого конъюгата в мкМ: а – 16; б – 8; в – 5,3; д – 4; е – 3,2; ф – 2,7; г – 2,3; h – 2; и – 1,8; j – 1,6. Объем наносимого конъюгата — 10 мкл. Измерения проводились на сконструированном сканере на базе спектрофлуориметра USB-650 Red Tide фирмы OceanOptics (350–1000 нм)

Одной из задач работы было изучение возможности разработки количественного ИХА. Для этого был разработан флуоресцентный ридер для быстрого определения

биомаркера заболевания по месту требования. Алгоритм процесса получения аналитического сигнала заключался в следующем:

1. Облучение тест-полоски;
2. С помощью светофильтра выделение излучения флуоресценции в соответствующей области спектра;
3. Фокусирование излучения флуоресценции на фотодиодную матрицу;
4. Оцифровки зарядов фотодиодов фотоматрицы;
5. Подавление схотастических шумов, возникающих при оцифровке данных;
6. Выделение отфильтрованных аналитических сигналов и преобразование информации с помощью помехоустойчивого кодирования.

Исследование спектров флуоресценции тестовой и контрольной зон, а также фоновой флуоресценции вне этих зон при различных длинах волн возбуждения флуоресценции позволило определить оптимальные оптические характеристики флуоресцентного ридера, которые соответствовали длине волны возбуждения 470 – 490 нм и регистрации выше 700 нм.

С учетом результатов данного исследования сконструировали и изготовили макет флуоресцентного ридера. Техническая разработка флуоресцентного ридера выходит за рамки данной диссертационной работы, и информация о конструкции данного прибора описана в работе [247]. Сигналы с фотоматрицы обрабатываются с помощью специальной программы на персональном компьютере. Пример получаемых при этом результатов приведен на рисунке 57.

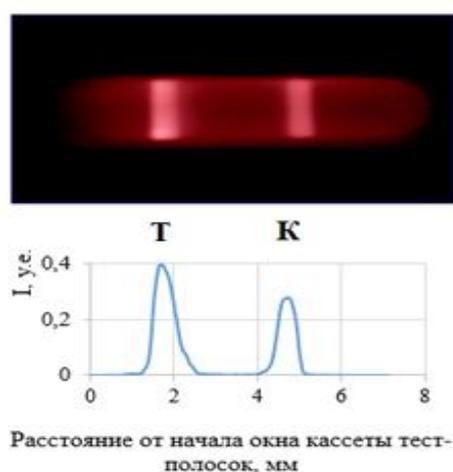


Рисунок 57 — Флуоресцентный скан тест-полоски с содержанием лизата ВБА 1:100 с использованием конъюгата КТ700 с моноклональными антителами к gV ВБА.

I — интенсивность флуоресценции в условных единицах.

Т - тестовая и К - контрольная зоны

С использованием флуоресцентного ридера была построена калибровочная кривая (Рисунок 58). Как видно из графика, имеет место линейная зависимость между флуоресцентным аналитическим сигналом и концентрацией антигена вплоть до концентрации 4 мкМ (0,8 мкг/мл). Это позволяет осуществлять определение антигенов в анализируемых пробах. Рассчитанные метрологические характеристики представлены в приложении Б.

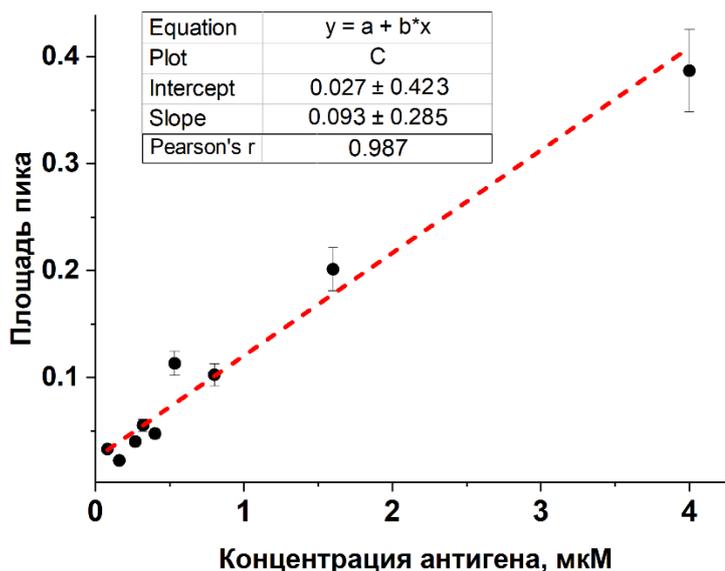


Рисунок 58 — Зависимость интенсивности флуоресценции тестовой зоны от концентрации антигена гВ ВБА. Измерения проводились на портативном флуоресцентном ридере

Необходимо заметить, что при больших концентрациях антигена наблюдается «хук-эффект» (Рисунок 59), когда сигнал с тест-полоски после определенной концентрации антигена начинает снижаться, что может приводить к заниженному результату анализа. Исходя из выше приведенных данных (Рисунок 52-53), в данном случае спад аналитического сигнала в области высоких концентраций антигена прежде всего объясняется перепоглощением флуоресценции КТ при высоких концентрациях тройного комплекса, образующегося на аналитической линии тест-полоски. Хотя полностью нельзя исключить вклад в «хук-эффект», связанный с механизмом взаимодействий антител и антигенов. Такие механизмы в литературе постулируются [248, 249], но строго математически не описаны. Как было указано в п.1.7, одним из легко осуществляемых методов устранения «хук-эффекта» является разбавление исходной анализируемой пробы. Однако этот метод не самый эффективный, поэтому необходимо применение других

методов устранения такого эффекта, например, создание мультиплексного анализа, где возможно определять не только антигены, но и антитела к ним.

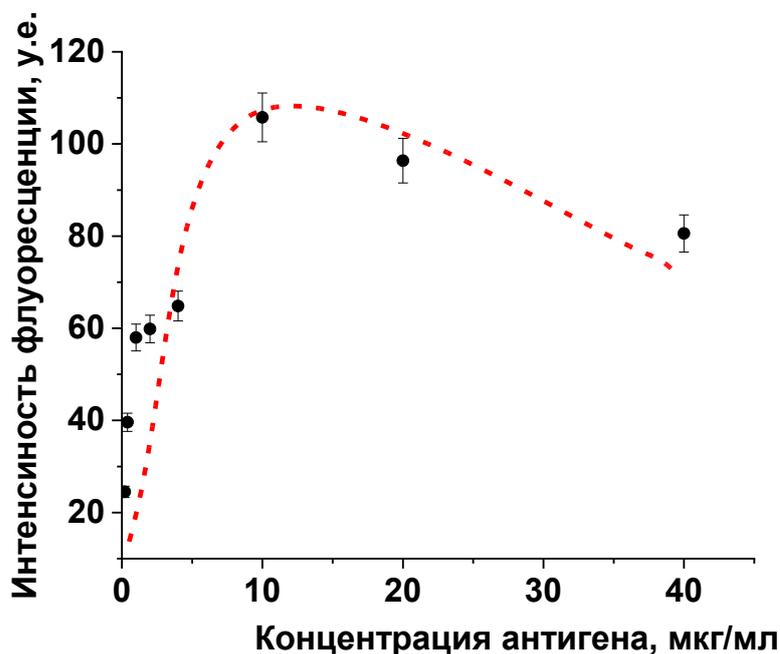


Рисунок 59 — Зависимость интенсивности флуоресценции тестовой зоны от концентрации антигена gV ВБА. Измерения проводились спектрофлуориметре FluoroLog 3 модель FL3–21

Предел обнаружения ( $C_{min}$ ) gV с использованием конъюгатов с коллоидным золотом находится в диапазоне 0,05–3,2 мкг/мл [250]. При этом минимальная концентрация ( $C_{lim}$ ) gV 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) [226], а предел обнаружения gV ВБА, рассчитанный по формуле (16), равен 0,15 нг/мл (0,0075 мкМ).

Для оценки аналитических характеристик иммунохроматографического определения gV ВБА анализ повторялся многократно ( $n = 30$ ) (Таблица 12).

Таблица 12 — Аналитические характеристики тест-системы для определения gV ВБА 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 ( $Sp$ ), по формуле (15)	96,7
Чувствительность ( $Se$ ), по формуле (14)	97,5

Рассчитанные по формулам (14) и (15) параметры удовлетворяют предъявляемым к тест-методам требованиям комиссии ЕС (Commission Decision 2002/657/ЕС): доля ложных результатов не должна превышать 5%. Определение аналитических характеристик разработанной иммунохроматографической тест-системы основано на результатах внутрилабораторной проверки, выполненной с сыворотками крови мыши, искусственно загрязненными антигенами gB ВБА.

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 13) 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 13 — Сравнение аналитических характеристик определения ВБА с использованием различных меток

Метка	Метод анализа	Определяемый антиген ВБА	$C_{min}$ (мкг/мл)	Se, %	Sp, %	Лит.
Полигистидиновая метка	ИФА	gE	—	97,6	96,4	[251]
КЗ	ИХА	gE	—	97,5	92,3	[252]
КЗ	ИХА	gB	—	97,5	96,7	[252]
КЗ	ИХА	gB	—	95,0	98,0	[253]
КЗ	Прямой ИХА	gB	0,05–3,2	98,6	98,0	[250]
КЗ	Конкурентный ИХА	gB	—	94,9	97,6	[254]
CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВП-КТ	Прямой ИХА	gB	$5,2 \cdot 10^{-3}$	97,5	96,7	Данная работа

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

### **Заключение по главе 6:**

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 состава CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВП. По результатам исследования было выявлено, что

оптимальная концентрация конъюгатов КТ700–Антитело на тестовой линии должна лежать в области 0,003 до 0,5 мкМ, при этом оптимальной концентрацией наносимого на тест-полоску конъюгата 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 с другими тест-системами на определение ВБА, установлено, что использование КТ в качестве меток снижает предел обнаружения и не уступает в специфичности и чувствительности другим методам ИХА и ИФА.

## 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 рН при проведении конъюгации и выбраны оптимальные условия для проведения ориентированной иммобилизации антител на поверхности КТ. Показано, что использование буферного раствора MES с рН = 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, рН 9,2, напряжение:

+30 кВ; детектирование при длине волны 210 нм; б) для ВЭЖХ — изократический режим элюирования, ПФ: 33,5 мМ фосфатный буфер с добавлением 0,1% ДДСН, НФ: сферические частицы кремнезема, модифицированные цирконием с гидрофильной диольной привитой фазой, скорость потока 3 мл/мин, объем инъекции 1 мкл, детектирование при длине волны 210 нм. Полученные данные указывают на перспективность применения КЗЭ, ВЭЖХ и эксклюзионной хроматографии для характеристики 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.

## Работы, опубликованные по теме диссертации

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.

## Опубликованные РИД

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 С1, 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 С1, 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-ротатор 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 С, 26.12.2017. Заявка № 2015153077 от 10.12.2015.

## Список 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., Wang 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. Yang J. et al. Reverse distal similarity of hapten structure enhancing antibody’s group-specificity: Development of an immunochromatographic strip for tylosin and tilmicosin in milk and water // Journal of Food Composition and Analysis. — 2023. — V. 116. — P. 105068.
12. Omersel J., Gobec M., Božič B. Chromatography Electrophoresis: Affinity separation techniques // Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition). — 2019. — P.62-70.
13. Qin Q. et al. Algorithms for immunochromatographic assay: review and impact on future application // Analyst. — 2019. — V. 144. — №19. — P. 5659-5676.

14. Urusov A.E., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Immunochemical methods of mycotoxin analysis // *Applied Biochemistry and Microbiology*. — 2010. — V. 46. — P. 253-266.
15. Panja A., Patra P. A review on Quantum Dots (QDs) and their biomedical applications // *4open*. — 2023. — V. 6. — P. 1.
16. Gordon J, Michel G. Analytical Sensitivity Limits for Lateral Flow Immunoassays // *Clinical Chemistry*. — 2008. — №7. — P. 1250-1251.
17. Herold K.E. Biosensors and biodetection. — New York : Humana Press, 2009.
18. Paek S.-H., Lee S.-H., Cho J.-H., Kim Y.-S. Development of Rapid One-Step Immunochromatographic Assay // *Methods*. — 2000. — V. 22. — №1. — P. 53-60.
19. Ranjan S. et al. Lateral flow assay-based detection of long non-coding RNAs: A point-of-care platform for cancer diagnosis // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. — 2021. — V. 204. — P. 114285.
20. Sajid M., Kawde A.N., Daud M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review // *Journal of Saudi Chemical Society*. — 2015. — V. 19. — №6. — P. 689-705.
21. Hong L. et al. High performance immunochromatographic assay for simultaneous quantitative detection of multiplex cardiac markers based on magnetic nanobeads // *Theranostics*. — 2018. — V. 8. — №22. — P. 6121.
22. Yan W. et al. Machine Learning Approach to Enhance the Performance of MNP-Labeled Lateral Flow Immunoassay // *Nano-Micro Letters*. — 2019. — V. 11. — №1. — P. 7.
23. Oh K. et al. Immunochromatographic assay of hepatitis B surface antigen using magnetic nanoparticles as signal materials // *IEEE Transactions on Magnetics*. — 2014. — V. 50. — №11. — P. 1-4.
24. Huang W.C. et al. Magnetic nanoparticle-based lateral flow immunochromatographic strip as a reporter for rapid detection of melamine // *Journal of nanoscience and nanotechnology*. — 2018. — V. 18. — №10. — P. 7190-7196.
25. Осипов А. П., Самсонова Ж. В., Кондаков С. Э. Наночастицы металлов как новый класс меток в быстрых методах иммуноанализа // *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*. — 2015. — Т. 56. — №3.
26. Xin Y. et al. Novel, highly sensitive, and specific assay to monitor acute myocardial infarction (AMI) by the determination of cardiac Troponin I (cTnI) and heart-type fatty acid binding protein (H-FABP), by a colloidal gold-based immunochromatographic test strip // *Analytical Letters*. — 2021. — V. 54. — №8. — P. 1329-1350.
27. Ibrahim M.I.M. Immunochromatographic techniques for mycotoxin analysis // *Nanomycotoxicology*. — Academic Press, 2020. — P. 71-86.

28. He F. et al. A gold nanoparticle-based immunochromatographic assay for simultaneous detection of multiplex sildenafil adulterants in health food by only one antibody // *Analytica Chimica Acta*. — 2021. — V. 1141. — P. 1-12.
29. Zvereva E. A. et al. The use of gold nanoparticle-antibody conjugates in immune test for microcystin-LR detection // *NANOCON Conference Proceedings-International Conference on Nanomaterials*. — 2021. — P. 410-415.
30. Zeng L. et al. Gold nanoparticle-based immunochromatographic assay for detection *Pseudomonas aeruginosa* in water and food samples // *Food chemistry: X*. — 2021. — V. 9. — P. 100117.
31. Deng H. et al. Development of a colloidal gold immunochromatographic test strip for the rapid detection of iprodione // *Analytical Methods*. — 2022. — V. 14. — №43. — P. 4370-4376.
32. Haider A., Kang I.K. Preparation of silver nanoparticles and their industrial and biomedical applications: a comprehensive review // *Advances in materials science and engineering*. — 2015. — V. 2015. — P. 1-16.
33. Wu K. H., Huang W. C., Chang S. C., Kao C. H., Shyu R. H. Colloidal silver-based lateral flow immunoassay for rapid detection of melamine in milk and animal feed // *Materials Chemistry and Physics*. — 2019. — V. 231. — P. 121-130.
34. Song H.O. et al. Development of a novel fluorophore for real-time biomonitoring system // *PLoS One*. — 2012. — V. 7. — №11. — P. e48459.
35. Zhao X. X., Ge D. et al. A water-soluble pH fluorescence probe based on quaternary ammonium salt for bioanalytical applications // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. — 2015. — V. 151. — P. 218-224.
36. Wycisk V. et al. Heterobifunctional Dyes: highly fluorescent linkers based on cyanine dyes // *ChemistryOpen*. — 2017. — V. 6. — №3. — P. 437-446.
37. Chang X.H. et al. Research Progress of Near-Infrared Fluorescence Immunoassay // *Micromachines*. — 2019. — V. 10. — №6. — P. 422.
38. Zhu C., Zhao G., Dou W. Immunochromatographic assay using brightly colored silica nanoparticles as visible label for point-of-care detection of clenbuterol // *Sensors and Actuators B: Chemical*. — 2018. — V. 266. — P. 392-399.
39. Chen R. et al. Development of a lateral flow fluorescent microsphere immunoassay for the determination of sulfamethazine in milk // *Analytical and bioanalytical chemistry*. — 2013. — V. 405. — №21. — P. 6783-6789.
40. Cai Y. et al. Rapid and sensitive detection of cardiac troponin I for point-of-care tests based on red fluorescent microspheres // *Molecules*. — 2018. — V. 23. — №5. — P. 1102.

41. Liu Y. et al. Development of a two-step immunochromatographic assay for microcystin-LR based on fluorescent microspheres // *Food Control*. — 2019. — V. 95. — P. 34-40.
42. Wang J. et al. Development of a quantitative fluorescence-based lateral flow immunoassay for determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in milk // *Food and agricultural immunology*. — 2018. — V. 29. — №1. — P. 56-66.
43. Wang Y. et al. Microsphere-Based IgM and IgG Avidity Assays for Human Parvovirus B19, Human Cytomegalovirus, and *Toxoplasma gondii* // *mSphere*. — 2020. — V. 5. — №2. — P. 10.1128/msphere.00905-19.
44. Hall S.A. et al. Development and validation of a multiplex fluorescent microsphere immunoassay for detection of porcine cytokines // *MethodsX*. — 2019. — V. 6. — P. 1218-1227.
45. Yang L. Gao M. X. et al. An enzyme-induced Au@Ag core-shell nanostructure used for an ultrasensitive surface-enhanced Raman scattering immunoassay of cancer biomarkers // *Nanoscale*. — 2017. — V. 9. — №7. — P. 2640-2645.
46. Tripp R. A., Dluhy R. A., Zhao Y. Novel nanostructures for SERS biosensing // *Nano Today*. — 2008. — V. 3. — №3-4. — P. 31-37.
47. Zhang Y. Zhou H., Shen Q., Shao Z., Xu, L., Luo Z. Silver Nanostructures on Graphene Oxide as the Substrate for Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) // *Analytical Letters*. — 2019. — V. 52. — №9. — P. 1477-1486.
48. Rivolo P., Bianco S., Lamberti A., Chiadò A., Novara C., Giorgis F. Graphene-Metal Nanostructures as Surface Enhanced Raman Scattering Substrates for Biosensing // *Procedia technology*. — 2017. — V. 27. — P. 236-237.
49. Takalkar S., Baryeh K., Liu G. Fluorescent carbon nanoparticle-based lateral flow biosensor for ultrasensitive detection of DNA // *Biosensors and Bioelectronics*. — 2017. — V. 98. — P. 147-154.
50. Qiu W., Xu H. et al. Carbon nanotube-based lateral flow biosensor for sensitive and rapid detection of DNA sequence // *Biosensors and Bioelectronics*. — 2015. — V. 64. — P. 367-372.
51. Park K.M. et al. Fluorescent fullerene nanoparticle-based lateral flow immunochromatographic assay for rapid quantitative detection of C-reactive protein // *Nano convergence*. — 2019. — V. 6. — №1. — P. 1-6.
52. Zhang X. et al. Multiplex lateral flow immunoassays based on amorphous carbon nanoparticles for detecting three *Fusarium* mycotoxins in maize // *Journal of agricultural and food chemistry*. — 2017. — V. 65. — №36. — P. 8063-8071.

53. Edwards K.A., Korff R., Baeumner A.J. Liposome-enhanced lateral-flow assays for clinical analyses // *Biosensors and Biodetection*. — 2017. — P. 407-434.
54. Ho J.A.A., Wauchope R. D. A strip liposome immunoassay for aflatoxin B1 // *Analytical chemistry*. — 2002. — V. 74. — №7. — P. 1493-1496.
55. Leem H., Shukla S., Song X., Heu S., Kim M. An Efficient Liposome-Based Immunochromatographic Strip Assay for the Sensitive Detection of *Salmonella typhimurium* in Pure Culture // *Journal of food safety*. — 2014. — V. 34. — №3. — P. 239-248.
56. Wen H. W., Borejsza-Wysocki W. et al. A novel extraction method for peanut allergenic proteins in chocolate and their detection by a liposome-based lateral flow assay // *European Food Research and Technology*. — 2005. — V. 221. — №3-4. — P. 564-569.
57. Matsuda R., Rodriguez E., Suresh D., Hage D.S. Chromatographic immunoassays: strategies and recent developments in the analysis of drugs and biological agents // *Bioanalysis*. — 2015. — V. 7. — №22. — P. 2947-2966.
58. Zhu X., Sarwar M., Yue Q., Chen C., Li C. Z. Biosensing of DNA oxidative damage: a model of using glucose meter for non-glucose biomarker detection // *International journal of nanomedicine*. — 2017. — V. 12. — P. 979.
59. Bahadır E.B., Sezgintürk M.K. Lateral flow assays: Principles, designs and labels // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. — 2016. — V. 82. — P. 286-306.
60. Liu P., Fang X., Cao H., Gu M., Kong J., Deng A. Magnetic-bioluminescent-nanoliposomes for ultrasensitive and portable detection of protein biomarkers in blood // *Analytica chimica acta*. — 2018. — V. 1039. — P. 98-107.
61. Lv Y. et al. Thick-shell CdSe/ZnS/CdZnS/ZnS core/shell quantum dots for quantitative immunoassays // *ACS Applied Nano Materials*. — 2021. — V. 4. — №3. — P. 2855-2865.
62. Xie J. et al. A sandwich ELISA-like detection of C-reactive protein in blood by citicoline-bovine serum albumin conjugate and aptamer-functionalized gold nanoparticles nanozyme // *Talanta*. — 2020. — V. 217. — P. 121070.
63. Li X. et al. Rapid and quantitative detection of prostate specific antigen with a quantum dot nanobeads-based immunochromatography test strip // *ACS Applied Materials & Interfaces*. — 2014. — V. 6. — №9. — P. 6406-6414.
64. Karami P. et al. Colorimetric immunosensor for determination of prostate specific antigen using surface plasmon resonance band of colloidal triangular shape gold nanoparticles // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. — 2019. — V. 222. — P. 117218.

65. Wu C. C. et al. Evaluation of a rapid quantitative determination method of PSA concentration with gold immunochromatographic strips // *BMC urology*. — 2015. — V. 15. — №1. — P. 1-7.
66. Hu M. et al. A fluorescent lateral flow immunoassay based on CdSe/CdS/ZnS quantum dots for sensitive detection of olaquinox in feedstuff // *Food Chemistry*. — 2023. — V. 419. — P. 136025.
67. Song C. et al. Development of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the rapid detection of olaquinox residues // *Journal of agricultural and food chemistry*. — 2011. — V. 59. — №17. — P. 9319-9326.
68. Nguyen A.V.T. et al. Sensitive detection of influenza A virus based on a CdSe/CdS/ZnS quantum dot-linked rapid fluorescent immunochromatographic test // *Biosensors and Bioelectronics*. — 2020. — V. 155. — P. 112090.
69. Wu F. et al. Multiplexed detection of influenza A virus subtype H5 and H9 via quantum dot-based immunoassay // *Biosensors and Bioelectronics*. — 2016. — V. 77. — P. 464-470.
70. Liu Y. et al. Colorimetric detection of influenza A virus using antibody-functionalized gold nanoparticles // *Analyst*. — 2015. — V. 140. — №12. — P. 3989-3995.
71. Qie Z. et al. Ovalbumin antibody-based fluorometric immunochromatographic lateral flow assay using CdSe/ZnS quantum dot beads as label for determination of T-2 toxin // *Microchimica Acta*. — 2019. — V. 186. — P. 1-8.
72. Qie Z. et al. Universal and ultrasensitive immunochromatographic assay by using an antigen as a bifunctional element and antialbumin antibody on a test line // *Analytical chemistry*. — 2019. — V. 91. — №15. — P. 9530-9537.
73. Wang J. J. et al. Sensitive competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip for detecting aflatoxin M1 in milk // *Food Control*. — 2011. — V. 22. — №6. — P. 964-969.
74. Li J. et al. Amino-functionalized CdSe/ZnS quantum dot-based lateral flow immunoassay for sensitive detection of aflatoxin B1 // *Analytical Methods*. — 2018. — V. 10. — №29. — P. 3582-3588.
75. Sun Q. et al. A “green” method to detect aflatoxin B 1 residue in plant oil based on a colloidal gold immunochromatographic assay // *Analytical Methods*. — 2016. — V. 8. — №3. — P. 564-569.
76. Zhou C. et al. CdSe/ZnS quantum dots with multi-shell protection: synthesis and application in the detection of ractopamine residue in swine urine // *Science of Advanced Materials*. — 2013. — V. 5. — №3. — P. 285-294.

77. Zhang M. Z. et al. Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of clenbuterol and ractopamine in swine urine // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2009. — V. 395. — P. 2591-2599.
78. Liu D. et al. Multiplexed immunoassay biosensor for the detection of serum biomarkers— $\beta$ -HCG and AFP of Down Syndrome based on photoluminescent water-soluble CdSe/ZnS quantum dots // *Sensors and Actuators B: Chemical*. — 2013. — V. 186. — P. 235-243.
79. Zhang W. et al. Effect of different-sized gold nanoflowers on the detection performance of immunochromatographic assay for human chorionic gonadotropin detection // *Talanta*. — 2019. — V. 194. — P. 604-610.
80. García de Arquer F. P. et al. Semiconductor quantum dots: Technological progress and future challenges // *Science*. — 2021. — V. 373. — №6555. — P. eaaz8541.
81. Gidwani B. et al. Quantum dots: Prospectives, toxicity, advances and applications // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. — 2021. — V. 61. — P. 102308.
82. Kargozar S. et al. Quantum dots: a review from concept to clinic // *Biotechnology Journal*. — 2020. — V. 15. — №12. — P. 2000117.
83. Liu M. et al. Colloidal quantum dot electronics // *Nature Electronics*. — 2021. — V. 4. — №8. — P. 548-558.
84. Mohamed W. A. A. et al. Quantum dots synthetization and future prospect applications // *Nanotechnology Reviews*. — 2021. — V. 10. — №. 1. — P. 1926-1940.
85. Wise F. W. Lead salt quantum dots: the limit of strong quantum confinement // *Accounts of Chemical Research*. — 2000. — V. 33. — №11. — P. 773-780.
86. Bera D. et al. Quantum dots and their multimodal applications: a review // *Materials*. — 2010. — V. 3. — №4. — P. 2260-2345.
87. Kagan C.R. et al. Colloidal quantum dots as platforms for quantum information science // *Chemical reviews*. — 2020. — V. 121. — №5. — P. 3186-3233.
88. Soni U., Arora V., Sapra S. Wurtzite or zinc blende? Surface decides the crystal structure of nanocrystals // *CrystEngComm*. — 2013. — V. 15. — №27. — P. 5458-5463.
89. Bagher A.M. Quantum dots applications // *Sensors & Transducers*. — 2016. — V. 198. — №3. — P. 37.
90. Selopal G.S. et al. Core/shell quantum dots solar cells // *Advanced Functional Materials*. — 2020. — V. 30. — №13. — P. 1908762.
91. Li S. et al. The transparent SnO/ZnO quantum dots/SnO<sub>2</sub> pn junction towards the enhancement of photovoltaic conversion // *Chemical Engineering Journal*. — 2019. — V. 366. — P. 305-312.

92. Cotta M.A. Quantum dots and their applications: what lies ahead? // ACS applied nano materials. — 2020. — V. 3. — №6. — P. 4920-4924.
93. Resch-Genger U., Grabolle M., Cavaliere-Jaricot S., Nitschke R., Nann T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels // Nature methods. — 2008. — V. 5. — №9. — P. 763.
94. Sukhanova A., Venteo L. et al. Highly stable fluorescent nanocrystals as a novel class of labels for immunohistochemical analysis of paraffin-embedded tissue sections // Laboratory investigation. — 2002. — V.82. — №9. — P.1259-1261.
95. Bian F. et al. Quantum dots from microfluidics for nanomedical application // Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. — 2019. — V. 11. — №5. — P. e1567.
96. Васильев Р.Б., Дирин Д.Н. Квантовые точки: синтез, свойства, применение // Методическое пособие. Москва: МГУ. — 2007. — С. 5—34.
97. Gladyshev P.P., Tumanov Y.V., Ibragimova 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.
98. Lee S.H. et al. Synthesis of colloidal InAs/ZnSe quantum dots and their quantum dot sensitized solar cell (QDSSC) application // Optical Materials. — 2015. — V. 49. — P. 230-234.
99. Sedova I.V. et al. Coherent InAs/CdSe and InAs/ZnTe/CdSe heterovalent interfaces: electronic and chemical structure // Applied Surface Science. — 2018. — V. 448. — P. 455-464.
100. Enright M.J. et al. Role of Atomic Structure on Exciton Dynamics and Photoluminescence in NIR Emissive InAs/InP/ZnSe Quantum Dots // The Journal of Physical Chemistry C. — 2022. — V. 126. — №17. — P. 7576-7587.
101. Cornia S. et al. Calibration-Free and High-Sensitivity Microwave Detectors Based on InAs/InP Nanowire Double Quantum Dots // Advanced Functional Materials. — 2023. — V. 33. — №19. — P. 2212517.
102. Eagle F.W. et al. Enhanced Charge Transfer from Coinage Metal Doped InP Quantum Dots // ACS Nanoscience Au. — 2023.
103. Yan C., Tang F., Li L., Li H., Huang X., Chen D., Meng X., Ren, J. Synthesis of aqueous CdTe/CdS/ZnS core/shell/shell quantum dots by a chemical aerosol flow method // Nanoscale research letters. — 2010. — V. 5. — №1. — P. 189—194.

104. Lee D.U., Kim D.H., Choi D.H., Kim S.W., Lee H.S., Yoo K.H., Kim T.W. Microstructural and optical properties of CdSe/CdS/ZnS core-shell-shell quantum dots // *Optics Express*. — 2016. — V. 24. — №2. — P. A350-A357.
105. Troshkina N. N. et al. Investigation of the optical properties of quantum dots depending on the nature and number of additional semiconductor layers // *Научно-технические ведомости Санкт-Петербургского государственного политехнического университета. Физико-математические науки*. — 2022. — V. 15. — №S3. 3. — P. 106-110.
106. Bonilla C.A.M., Kouznetsov V.V. "Green" quantum dots: Basics, green synthesis and nanotechnological applications // *Green Nanotechnology-Overview and Further Prospects*. — 2016. — P. 174-192.
107. Матюшкин Л. Б., Александрова О. А., Максимов А. И., Мошников В. А., Мусихин С. Ф. Особенности синтез люминесцирующих полупроводниковых наночастиц в полярных и неполярных средах // *Биотехносфера*. — 2013. — №2 — С. 26.
108. 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. — P. 77-88.
109. Ahamefula U.C., Sulaiman M.Y., Ibarahim Z., Ibrahim N.B., Othman M.Y. Low-temperature synthesis and characterisation of ultra-small cadmium selenide quantum dots in octadecene solution // *Energy Procedia*. — 2012. — V. 25. — P. 62-69.
110. Fazaeli Y., Zare H., Karimi S., Rahighi R., Feizi S. Novel aspects of application of cadmium telluride quantum dots nanostructures in radiation oncology // *Applied Physics A*. — 2017. — V.123. — №8. — P. 507-514.
111. Ding L., Peng Z. et al. Microwave synthesis of CdTe/TGA quantum dots and their thermodynamic interaction with bovine serum albumin // *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.* — 2016. — V. 31. — №6. — P. 1408-1414.
112. Huang X., Jing L. et al. Narrowing the Photoluminescence of Aqueous CdTe Quantum Dots via Ostwald Ripening Suppression Realized by Programmed Dropwise Precursor Addition // *The Journal of Physical Chemistry C*. — 2018. — V. 122. — №20. — P. 11109-11118.
113. Liang Y., Tan J., Wang J., Chen J., Sun B., Shao, L. Synthesis and optimization of CdTe quantum dots with the help of erythorbic acid and ethanol // *RSC Advances*. — 2014. — V. 4. — №90. — P. 48967-48972.
114. Adegoke O., Park E.Y. Size-confined fixed-composition and composition-dependent engineered band gap alloying induces different internal structures in L-cysteine-capped alloyed quaternary CdZnTeS quantum dots // *Scientific reports*. — 2016. — V. 6. — P. 27288.

115. Chen X., Guo Z., Miao P. One-pot synthesis of GSH-Capped CdTe quantum dots with excellent biocompatibility for direct cell imaging // *Heliyon*. — 2018. — V. 4. — №3. — P. e00576.
116. Gao, J., Fei, X., Li, G., Jiang, Y., Li, S. The effects of QD stabilizer structures on pH dependence, fluorescence characteristics, and QD sizes // *Journal of Physics D: Applied Physics*. — 2018. — V. 51. — №28. — P. 285101-285121.
117. Arivarasan A., Bharathi S. et al. Evaluation of reaction parameters dependent optical properties and its photovoltaics performances of CdTe QDs // *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. — 2018. — P. 1-13.
118. Андреев Е.В. , Новикова С.А., Вертлина О.Р. , Попова А.А., Гладышев П.П. Водный синтез и свойства коллоидных квантовых точек // *Физическая и аналитическая химия природных и техногенных систем, новые технологии и материалы, – Ходаковские чтения : сборник трудов Всероссийской конференции с международным участием (Дубна, 18–19 апреля 2019) / под общ. ред. П. П. Гладышева. — Дубна : Гос. ун-т «Дубна», 2019. — С. 12-16.*
119. Li Y.Q., Wang H.Q. et al. A highly efficient capillary electrophoresis-based method for size determination of water-soluble CdSe/ZnS core-shell quantum dots // *Analytica chimica acta*. — 2009. — V. 647. — №2. — P. 219-225.
120. Kini S., Kulkarni S.D. et al. Dual functionalized, stable and water dispersible CdTe quantum dots: Facile, one-pot aqueous synthesis, optical tuning and energy transfer applications // *Materials Research Bulletin*. — 2019. — V. 110. — P. 57-66.
121. Sun J., Li Y., Pi F. et al. Using fluorescence immunochromatographic test strips based on quantum dots for the rapid and sensitive determination of microcystin-LR // *Analytical and bioanalytical chemistry*. — 2017. — V. 409. — №8. — P. 2213-2220.
122. Matos C.R., Souza Jr, H.O. et al. Spectroscopic and electrochemical study of CdTe nanocrystals capped with thiol mixtures // *Materials Research Express*. — 2016. — V. 3. — №6. — P. 065008.
123. Bullen C.R., Mulvaney P. Nucleation and growth kinetics of CdSe nanocrystals in octadecene // *Nano Letters*. — 2004. — V. 4. — №12. — P. 2303-2307.
124. Kiprotich S., Dejene B.F., Onani M.O. Structural, optical and luminescence properties of CdTe quantum dots: Investigation on the effect of capping ligand ratio // *Materials Research Express*. — 2018. — V. 5. — №6. — P. 1-22.
125. Новикова С. А. и др. Коллоидный синтез и характеристика гидрофильных CdTe квантовых точек для медицинской диагностики // *Вестник Международного*

университета природы, общества и человека «Дубна», Серия «Естественные и инженерные науки». — 2019. — Т.43. — № 2. — С. 42-52.

126. Schulze, A.S., Tavernaro I., Machka F., Dakischew O., Lips K.S., Wickleder M.S. Tuning optical properties of water-soluble CdTe quantum dots for biological applications // *Journal of Nanoparticle Research*. — 2017. — V. 19. — №2. — P. 70–86.

127. Ebrahim S., Labeб M., Abdel-Fattah T., Soliman M. CdTe quantum dots capped with different stabilizing agents for sensing of ochratoxin A // *Journal of Luminescence*. — 2017. — V. 182. — P. 154-159.

128. Xiang, X., Shao, H., Dai, B., Yu, J., Deng, J., Ying, Z., Jiang, Y. Dilution-induced rapid synthesis of aqueous semiconductor quantum dots // *Micro & Nano Letters*. — 2019. — V. 14. — №1. — P. 95-98.

129. Tang Y. et al. Aqueous synthesis of panchromatic luminescent CdTeSe alloyed quantum dots // *Optik*. — 2015. — V. 126. — №. 24. — P. 5694-5697.

130. Кировская И. А. и др. Поверхностно-активные и электрофизические свойства полупроводников системы CdTe-CdSe // *Динамика систем, механизмов и машин*. — 2017. — Т. 5. — № 2. — С. 243-248.

131. Hung L.X. et al. Near-infrared emitting CdTeSe alloyed quantum dots: Raman scattering, photoluminescence and single-emitter optical properties // *RSC advances*. — 2017. — V. 7. — №76. — P. 47966-47974.

132. Ramírez-Herrera D.E. et al. NIR-Emitting Alloyed CdTeSe QDs and Organic Dye Assemblies: A Nontoxic, Stable, and Efficient FRET System // *Nanomaterials*. — 2018. — V. 8. — №4. — P. 231.

133. Bursa B., Rytel K., Skrzypiec M., Prochaska K., Wróbel D. Thin film of CdTeSe/ZnS quantum dots on water subphase: Thermodynamics and morphology studies // *Dyes and Pigments*. — 2018. — V. 155. — P. 36-41.

134. Zhou H., Zhou G., Zhou J., Xu D., Zhang X., Kong P., Yang Z. Wide emission-tunable CdTeSe/ZnSe/ZnS core-shell quantum dots and their conjugation with E. coli O-157 // *Materials Research Bulletin*. — 2015. — V. 65. — P. 53-60.

135. Pons T., Lequeux N., Mahler B., Sasnouski S., Fragola A., Dubertret B. Synthesis of near-infrared-emitting, water-soluble CdTeSe/CdZnS core/shell quantum dots // *Chemistry of Materials*. — 2009. — V. 21. — №8. — P. 1418-1424.

136. Перепелица А.С. Оптические свойства локализованных состояний в коллоидных квантовых точках сульфидов кадмия и серебра: дисс. ... канд. физ.-мат. наук. Воронежский государственный университет, Воронеж, 2017. — 145 с.

137. Gao J., Chen X., Cheng Z. Near-infrared quantum dots as optical probes for tumor imaging // *Current topics in medicinal chemistry*. — 2010. — V. 10. — №12. — P. 1147-1157.
138. Zhao Y., Zhang Y., Qin G., Cheng J., Zeng W., Liu S., H. Kong, X. Wang, Q. Wang, Qu, H. In vivo biodistribution and behavior of CdTe/ZnS quantum dots // *International journal of nanomedicine*. — 2017. — V. 12. — P. 1927.
139. McBride J., Treadway J., Feldman L.C., Pennycook S.J., Rosenthal S. J. Structural basis for near unity quantum yield core/shell nanostructures // *Nano Letters*. — 2006. — V. 6. — №7. — P. 1496-1501.
140. Ma Q., Su X. Near-infrared quantum dots: synthesis, functionalization and analytical applications // *Analyst*. — 2010. — V. 135. — №8. — P. 1867-1877.
141. Liu Q. et al. Near infrared lanthanide-doped nanoparticles for low interference lateral flow immunoassay test // *ACS Applied Materials & Interfaces*. — 2020.
142. Shah K.G., Yager P. Wavelengths and lifetimes of paper autofluorescence: a simple substrate screening process to enhance the sensitivity of fluorescence-based assays in paper // *Analytical chemistry*. — 2017. — V. 89. — №22. — P. 12023-12029.
143. Schneider M., Marquez-Lagraulet A., Pasquesi R., Shultz M. Infrared detection decreases nitrocellulose autofluorescence and improves. URL: <https://gracebio.com/beating-background-fluorescence-on-nitrocellulose-film-slides/> (дата обращения: 20.04.2025).
144. Swanson C., D'Andrea A. Lateral flow assay with near-infrared dye for multiplex detection // *Clinical Chemistry*. — 2013. — V. 59. — №4. — P. 641-648.
145. Fan J. et al. A fluorescent probe for site I binding and sensitive discrimination of HSA from BSA // *Chemical Communications*. — 2014. — V. 50. — №67. — P. 9573-9576.
146. Schroeder Jr H.W., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. — 2010. — V. 125. — №2. — P. 41 – 52.
147. Mulvaney P. et al. Silica encapsulation of quantum dots and metal clusters // *Journal of Materials Chemistry*. — 2000. — V. 10. — №6. — P. 1259 – 1270.
148. Bruchez M. et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels // *Science*. — 1998. — V. 281. — №5385. — P. 2013 – 2016.
149. Chan W.C.W., Maxwell D.J. et al. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging // *Current opinion in biotechnology*. — 2002. — V. 13. — №1. — P. 40-46.
150. Delehanty J.B. et al. Active cellular sensing with quantum dots: transitioning from research tool to reality; a review // *Analytica Chimica Acta*. — 2012. — V. 750. — P. 63 – 81.
151. Augustus E. N. et al. A review of synthesis, characterization and applications of functionalized dendrimers // *Am. J. Polym. Sci.* – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 8-14.

152. Medintz I.L., Mattoussi H., Clapp A. R. Potential clinical applications of quantum dots // *International journal of nanomedicine*. — 2008. — V. 3. — №2. — P. 151.
153. Huang B., Tomalia D. A. Dendronization of gold and CdSe/CdS (core-shell) quantum dots with tomalia type, thiol core, functionalized poly (amidoamine)(PAMAM) dendrons // *Journal of luminescence*. — 2005. — V. 111. — № 4. — P. 215-223.
154. Zhao Y., Li Y., Song Y., Jiang W., Wu Z., Wang Y. A. Architecture of stable and water-soluble CdSe/ZnS core-shell dendron nanocrystals via ligand exchange // *Journal of colloid and interface science*. — 2009. — V. 339. — №2. — P. 336-343.
155. Gofman V.V., Pankratov V.A., Markin A.V., Ginstel D.V., De Saeger S., Goryacheva I.Y. Hydrophilic quantum dots stability against an external low-strength electric field // *Applied Surface Science*. — 2016. — V. 363. — P. 259-263.
156. Pellegrino T., Manna L., Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell: a general route to water soluble nanocrystals // *NanoLett.* — 2004. — V.4. — P. 703 – 707.
157. Welch N. G. et al. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays // *Biointerphases*. — 2017. — V. 12. — №2.
158. Lin X., O'Reilly Berings A., Lu X. Applications of nanoparticle-antibody conjugates in immunoassays and tumor imaging // *The AAPS journal*. — 2021. — V. 23. — P. 1-16.
159. Супотницкий М. В. и др. Иммуноглобулины для внутривенного введения в аспекте показателей качества, эффективности и безопасности // *Успехи современного естествознания*. — 2015. — №5. — С. 84-94.
160. Marques A.C. et al. Functionalizing nanoparticles with cancer-targeting antibodies: A comparison of strategies // *Journal of controlled release*. — 2020. — V. 320. — P. 180-200.
161. Kapingidza A.B., Kowal K., Chruszcz M. Antigen-antibody complexes // *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins*. — 2020. — P. 465-497.
162. Panferov V.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Post-assay chemical enhancement for highly sensitive lateral flow immunoassays: A critical review // *Biosensors*. — 2023. — V. 13. — №9. — P. 866.
163. Greenspan N.S., Cavacini L.A. Immunoglobulin function // *Clinical immunology*. — Elsevier, 2019. — P. 223-233. e1.
164. Heirene L.A. et al. Understanding Antibody-Target Antigen Interactions and the Avidity Effect Using Mathematical Modelling // *bioRxiv*. — 2024. — P. 2024.05. 10.593537.

165. Susini V. et al. Antibody-Antigen Binding Events: The Effects of Antibody Orientation and Antigen Properties on the Immunoassay Sensitivity // *Rapid Antigen Testing*. – IntechOpen, 2023.
166. Sanderson T. et al. Immunohistochemical and 19 immunofluorescent techniques // *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, 8th ed.; Suvarna, SK, Layton, C., Bancroft, JD, Eds. — 2019. — P. 337-394.
167. Шулешко О.О., Жолина Л.В. Болезнь Ауески у самки рыси. Клинический случай // *Науково-технічний бюлетень НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК*. — 2014. — №1. — С. 1-6.
168. Моренков О.С. Болезнь Ауески: Иммунологическая характеристика гликопротеинов gE и gV вируса и разработка методов серологической диагностики болезни и контроля «маркированных» вакцин: дисс.... д.б.н. — Пущино, 2000. — 282 с.
169. Lakowicz J. R. et al. Time-resolved spectral observations of cadmium-enriched cadmium sulfide nanoparticles and the effects of DNA oligomer binding // *Analytical biochemistry*. — 2000. — V. 280. — №1. — P. 128 – 136.
170. Pereira G., Monteiro C.A. et al. (Bio) conjugation Strategies Applied to Fluorescent Semiconductor Quantum Dots // *Journal of the Brazilian Chemical Society*. — 2019. — V. 30. — №12. — P. 2536-2561.
171. Wilkins M. D. et al. Quantum dot enabled lateral flow immunoassay for detection of cardiac biomarker NT-proBNP // *Sensing and bio-sensing research*. — 2018. — V. 21. — P. 46-53.
172. Veerananarayanan S. et al. Synthesis and application of luminescent single CdS quantum dot encapsulated silica nanoparticles directed for precision optical bioimaging // *International journal of nanomedicine*. — 2012. — V. 7. — P. 3769.
173. Han H.S. et al. Quantum dot/antibody conjugates for in vivo cytometric imaging in mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2015. — V. 112. — № 5. — P. 1350-1355.
174. Mattera L. Functionalization, bio-conjugation and toxicity studies of quantum dots : дис. — 2016.
175. Sahoo S.L., Liu C.H. et al. Biocompatible quantum dot-antibody conjugate for cell imaging, targeting and fluorometric immunoassay: crosslinking, characterization and applications // *RSC Advances*. — 2019. — V. 9. — №56. — P. 32791-32803.
176. Xu Y. et al. Assembly of zein–polyphenol conjugates via carbodiimide method: evaluation of physicochemical and functional properties // *Lwt*. — 2022. — V. 154. — P. 112708.

177. Wang J., Huang X., Zan F., Guo C.-G., Cao C., Ren J. Studies on bioconjugation of quantum dots using capillary electrophoresis and fluorescence correlation spectroscopy // *Electrophoresis*. — 2012. — V. 33. — P. 1987-1995.
178. Zhang L., Mazouzi Y., Salmain M., Liedberg B., Boujday S. Antibody-gold nanoparticle bioconjugates for biosensors: synthesis, characterization and selected applications // *Biosensors and Bioelectronics*. — 2020. — V. 165. — P. 112370.
179. Zhang Q., Liang J., Bongers A., Richardson J. J., Liang K., Gu Z. Site-Specific Antibody Assembly on Nanoparticles via a Versatile Coating Method for Improved Cell Targeting // *Advanced Science*. — 2023. — V. 10. — №9. — P. 2206546.
180. Lee N.K., Wang C.P.J., Lim J., Park W., Kwon H.K., Kim S.N., Park C.G. Impact of the conjugation of antibodies to the surfaces of polymer nanoparticles on the immune cell targeting abilities // *Nano convergence*. — 2021. — V. 8. — №1. — P. 1-11.
181. Pollok N.E., Rabin C., Smith L., Crooks R.M. Orientation-controlled bioconjugation of antibodies to silver nanoparticles // *Bioconjugate chemistry*. — 2019. — V. 30. — №12. — P. 3078-3086.
182. Lou D., Ji L., Fan L., Ji Y., Gu, N., Zhang Y. Antibody-oriented strategy and mechanism for the preparation of fluorescent nanoprobe for fast and sensitive immunodetection // *Langmuir*. — 2019. — V. 35. — №14. — P. 4860-4867.
183. Oliveira J.P., Prado A.R., Keijok W.J., Antunes P.W.P. Impact of conjugation strategies for targeting of antibodies in gold nanoparticles for ultrasensitive detection of 17 $\beta$ -estradiol // *Scientific reports*. — 2019. — V. 9. — №1. — P. 13859.
184. Trikeriotis M. et al. Analytical Workflows to Unlock Predictive Power in Biotherapeutic Developability // *Pharmaceutical Research*. — 2023. — V. 40. — №. 2. — P. 487-500.
185. Ngerpimai S. et al. Insight into the covalently oriented immobilization of antibodies on gold nanoparticle probes to improve sensitivity in the colorimetric detection of *listeria monocytogenes* // *Bioconjugate Chemistry*. — 2022. — V. 33. — №11. — P. 2103.
186. Gao S., Guisán J. M., Rocha-Martin J. Oriented immobilization of antibodies onto sensing platforms-A critical review // *Analytica chimica acta*. — 2022. — V. 1189. — P. 338907.
187. Набережных Г. А. и др. Биоконъюгирование коллоидных квантовых точек сульфидов кадмия и надмолекулярных структур белка-порина из бактерий рода *Yersinia*. Получение и характеристика // *Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2020*. — 2020. — С. 652-658.

188. Kulkarni N. S. et al. Tyrosine kinase inhibitor conjugated quantum dots for non-small cell lung cancer (NSCLC) treatment //European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2019. –V. 133. – P. 145-159.
189. Zhou L. et al. An fluorescent aptasensor for sensitive detection of tumor marker based on the FRET of a sandwich structured QDs-AFP-AuNPs // Talanta. – 2019. – V. 197. – P. 444-450.
190. Nifontova G. et al. Cancer cell targeting with functionalized quantum dot-encoded polyelectrolyte microcapsules // Frontiers in chemistry. — 2019. — V. 7. — P. 34.
191. Halloran D. et al. Bone Morphogenetic Protein-2 Conjugated to Quantum Dots is Biologically Functional // Nanomaterials. — 2020. — V. 10. — №6. — P. 1208.
192. Vo N. T. et al. Conjugation of E. coli O157: H7 antibody to CdSe/ZnS quantum dots //Journal of nanomaterials. – 2015. – T. 2015, Vo N. T. et al. Conjugation of E. coli O157: H7 antibody to CdSe/ZnS quantum dots //Journal of nanomaterials. — 2015. — V. 2015. — №1. — P. 265315.
193. Navarro D. A. et al. Partitioning of hydrophobic CdSe quantum dots into aqueous dispersions of humic substances: Influence of capping-group functionality on the phase-transfer mechanism // Journal of colloid and interface science. — 2010. — V. 348. — № 1. — P. 119–128.
194. Umakoshi T. et al. Quantum-dot antibody conjugation visualized at the single-molecule scale with high-speed atomic force microscopy // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. — 2018. — V. 167. — P. 267-274.
195. Марахова А. и др. Определение размеров наночастиц в коллоидных растворах методом динамического рассеяния света //Наноиндустрия. – 2016. – №. 1. – С. 88-93, Марахова А. и др. Определение размеров наночастиц в коллоидных растворах методом динамического рассеяния света //Наноиндустрия. — 2016. — №1. — С. 88-93.
196. Куликов К. Г., Кошлан Т. В. Определение размеров коллоидных частиц при помощи метода динамического рассеяния света //Журнал технической физики. – 2015. – Т. 85. – №. 12. – С. 26-32.
197. Ahmad S. A. A. et al. An electrochemical sandwich immunosensor for the detection of HER2 using antibody-conjugated PbS quantum dot as a label //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. — 2019. — V. 174. — P. 608-617.
198. Adam V., Vaculovicova M. Capillary electrophoresis and nanomaterials—Part I: Capillary electrophoresis of nanomaterials //Electrophoresis. – 2017. – V. 38. – №. 19. – P. 2389-2404.

199. Huang X. et al. Characterization of quantum dot bioconjugates by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescent detection // *Journal of Chromatography A*. — 2006. — V. 1113. — №1-2. — P. 251-254.
200. Пайелл У. Характеристика наночастиц методами капиллярного электромиграционного разделения // *Электрофорез*. — 2010. — Т. 31. — №5. — С. 814-831.
201. Klerárník K. et al. Capillary electrophoresis immunoassays with conjugated quantum dots // *Electrophoresis*. — 2011. — V. 32. — №10. — P. 1217-1223.
202. Janu L. et al. Electrophoretic study of peptide-mediated quantum dot-human immunoglobulin bioconjugation // *Electrophoresis*. — 2013. — V. 34. — №18. — P. 2725-2732.
203. Bucking W. et al. Isotachophoretic measurements of luminescent semiconductor nanocrystals // *International journal of nanotechnology*. — 2007. — V. 4. — №3. — P. 298-308.
204. Zhang Y. et al. The influence of ligands on the preparation and optical properties of water-soluble CdTe quantum dots // *Applied Surface Science*. — 2009. — V. 255. — №9. — P. 4747-4753.
205. Wei N. et al. Characterization of the ligand exchange reactions on CdSe/ZnS QDs by capillary electrophoresis // *Langmuir*. — 2019. — V. 35. — №14. — P. 4806-4812.
206. Li Y. Q. et al. A highly efficient capillary electrophoresis-based method for size determination of water-soluble CdSe/ZnS core-shell quantum dots // *Analytica chimica acta*. — 2009. — V. 647. — №2. — P. 219-225.
207. Wang J. et al. Studies on multivalent interactions of quantum dots-protein self-assemble using fluorescence coupled capillary electrophoresis // *Journal of nanoparticle research*. — 2014. — V. 16. — №7. — P. 1-7.
208. Vicente G., Colón L. A. Separation of bioconjugated quantum dots using capillary electrophoresis // *Analytical chemistry*. — 2008. — V. 80. — №. 6. — P. 1988-1994.
209. Tsuboi S. et al. Immunoglobulin binding (B1) domain mediated antibody conjugation to quantum dots for in vitro and in vivo molecular imaging // *Chemical Communications*. — 2017. — V. 53. — №. 68. — P. 9450-9453.
210. Pitkänen L., StriegeA. M. Size-exclusion chromatography of metal nanoparticles and quantum dots // *Trends Analyt Chem*. — 2016. — V. 80. — P. 311-320.
211. Banerjee A. et al. Fast, efficient, and stable conjugation of multiple DNA strands on colloidal quantum dots // *Bioconjugate chemistry*. — 2015. — V. 26. — №8. — P. 1582-1589.
212. Wu J. K. et al. Purification of quantum dot-based bioprobes via high-performance size exclusion chromatography // *Talanta*. — 2016. — V. 159. — P. 64-73.

213. Linkov P. et al. Selection of the optimal chromatography medium for purification of quantum dots and their bioconjugates // *Chemistry of Materials*. – 2020. – V. 32. – №21. – P. 9078-9089.
214. Wang M. et al. Preparative size-exclusion chromatography for purification and characterization of colloidal quantum dots bound by chromophore-labeled polymers and low-molecular-weight chromophores // *Journal of Chromatography A*. – 2009. – V. 1216. – №25. – P. 5011-5019.
215. Qian S., Bau H.H. A mathematical model of lateral flow bioreactions applied to sandwich assays // *Analytical Biochemistry*. — 2003. — V. 322. — №1. — P. 89-98.
216. Qian S., Bau H. H. Analysis of lateral flow biodetectors: competitive format // *Analytical biochemistry*. — 2004. — V. 326, № 2. — P. 211-224.
217. Zeng N., Li Y., Du M. Recent Advances on Modeling the Lateral Flow Immunoassay // *Journal of Advances in Biomedical Engineering and Technology*. — 2015. — V. 2. — №1. — P. 46-50.
218. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Mathematical model of serodiagnostic immunochromatographic assay // *Analytical chemistry*. — 2017. — V. 89. — № 8. — P. 4419-4427.
219. Leung W. et al. InfectCheck CRP barcode-style lateral flow assay for semi-quantitative detection of C-reactive protein in distinguishing between bacterial and viral infections // *Journal of immunological methods*. — 2008. — V. 336. — №1. — P. 30-36.
220. Rey E.G., O'Dell D., Mehta S., Erickson D. Mitigating the hook effect in lateral flow sandwich immunoassays using real-time reaction kinetics // *Analytical chemistry*. — 2017. — V. 89. — №9. — P. 5095-5100.
221. Oh J. et al. A hook effect-free immunochromatographic assay (HEF-ICA) for measuring the C-reactive protein concentration in one drop of human serum // *Theranostics*. — 2018. — V. 8. — №12. — P. 3189.
222. Dezhurov S. V., Trifonov A. Yu., Lovygin M. V., Rybakova A. V., Krylsky D. V. Synthesis of Highly Photostable NIR-Emitting Quantum Dots CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS / *Nanotechnologies in Russia*. – 2016. – V.11. – P. 337–343.
223. Vrublevskaya V. V., Afanasyev V. N. et al. 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.
224. Экспериандова Л. П. и др. Еще раз о пределах обнаружения и определения // *Журнал аналитической химии*. — 2010. — Т. 65. — №3. — С. 229-234.

225. Chen O. et al. Compact high-quality CdSe–CdS core–shell nanocrystals with narrow emission linewidths and suppressed blinking // *Nature materials*. — 2013. — V. 12. — №5. — P. 445-451.
226. Gladyshev P., Kouznetsov V., Martinez Bonilla C., Dezhurov S., Krilsky D., Vasiliev V., Morenkov O., Vrublevskaya V., Tsygankov P., Ibragimova S., Rybakova A. Colloidal quantum dots for fluorescent labels of proteins // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. – IOP Publishing, 2016. — V. 151. — №1. — P. 012042.
227. Dezhurov S.V., Krylsky D.V., Rybakova A.V., Ibragimova S.A., et al. 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.
228. Андреев Е.В., Новикова С.А., и др. Синтез и покрытие многослойных квантовых точек полимерами // *Физическая и аналитическая химия природных и техногенных систем: сборник трудов Всероссийской конференции с международным участием*, / под общ. ред. П. П. Гладышева. — Дубна: Гос. ун-т «Дубна», 2021. — С.3-9.
229. Сагдеев Д. О., Шамилов Р. Р., Воронкова В. К., Суханов А. А., Галяметдинов Ю. Г. Коллоидный синтез и характеристика парамагнитных квантовых точек Mn: CdSe в водной среде // *Вестник технологического университета*. — 2016. — Т.19. — №14. — С. 36-38.
230. Новикова С.А., Вертлина О.Р., Андреев Е.В., Гладышев П.П. Физико-химические основы иммунохроматографической диагностики заболеваний на основе квантовых точек в качестве маркеров белков // *Физическая и аналитическая химия природных и техногенных систем, новые технологии и материалы – Ходаковские чтения : сборник трудов Всероссийской конференции с международным участием (Дубна, 18–19 апреля 2019)* / под общ. ред. П. П. Гладышева. — Дубна : Гос. ун-т «Дубна», 2019. — С. 129-134.
231. Zaripov M. M., Morenkov O. S., Siklodi B., Barna-Vetro I., Gyíngyi-Horvath A., Fodor I. Glycoprotein B of Aujeszky's disease virus: topographical epitope mapping and epitope-specific antibody response // *Res. Virol.* — 1998. — V.149. — P. 29-41.
232. Juntunen E. Lateral flow immunoassays with fluorescent reporter technologies. Turku, Finland. — 2018. — 97 p.
233. Gao X., Yang L., Petros J. In vivo molecular imaging with quantum dots // *Current Opinion in Biotechnology*. — 2005. — V.16. — P.63–72.
234. Loginova Y.F., Dezhurov S.V. et al. Biodistribution and stability of CdSe core quantum dots in mouse digestive tract following per os administration: Advantages of double

polymer/silica coated nanocrystals, // Biochemical and Biophysical Research Communications. — 2012. — V. 419. — P.54–59.

235. Sidorov E. A. et al. Study of quantum dots conjugation with antibodies to be used in a lateral flow immunochromatographic assay, // Научно-технические ведомости Санкт-Петербургского государственного политехнического университета. Физико-математические науки. — 2022. — V. 15. — №33. 2. — P. 331-335.

236. Попова А.А., Новикова С.А., Насиров П.Д., Андреев Е.В., Грибова Е.Д., Дежуров С.В., Крыльский Д.В., Гладышев П.П. Исследование конъюгации квантовых точек с белками //, Физическая и аналитическая химия природных и техногенных систем: сборник трудов Всероссийской конференции с международным участием / под общ. ред. П. П. Гладышева. — Дубна: Гос. ун-т «Дубна», 2021. — С.134-142.

237. Богдан Т.В. Описание кристаллических структур металлов в терминах шаровых упаковок и кладок // Учебно-методическое пособие к общему курсу "Кристаллохимия": МГУ. Москва. — 2015. — 29 с.

238. Treuel L. et al. Impact of protein modification on the protein corona on nanoparticles and nanoparticle–cell interactions // ACS nano. — 2014. — V. 8. — №. 1. — P. 503-513.

239. Houde D.J., Berkowitz S.A. (ed.). Biophysical characterization of proteins in developing biopharmaceuticals. – Elsevier, 2019.

240. Foubert A. et al. Bioconjugation of quantum dots: Review & impact on future application // TrAC Trends in Analytical Chemistry. — 2016. — V. 83. — P. 31-48.

241. Грибова Е.Д., Андреев Е.В., Новикова С.А., и др. Определение квантовых точек и их конъюгатов методом эксклюзионной хроматографии// Физическая и аналитическая химия природных и техногенных систем: сборник трудов Всероссийской конференции, с международным участием / под общ. ред. П. П. Гладышева. — Дубна: Гос. ун-т «Дубна», 2021. — С.31-39.

242. Bouvier E.S.P., Koza S. M. Advances in size-exclusion separations of proteins and polymers by UHPLC // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2014. – V. 63. – P. 85-94.

243. Гладышев П.П., Васильев А.А., Моренков О.С. и др. Аналитическая платформа иммунохроматографической двухуровневой диагностики опасных и резистентных инфекций на основе протеомных технологий // Современная медицина: актуальные вопросы. — 2016. — №1 (45). — С. 22-49.

244. Ibragimova S. et al. Optimized immunochromatographic system for antigen determination based on monoclonal antibody conjugates with quantum dots // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, –IOP Publishing, 2019. — V. 498. — №1. – P. 01201.

245. Ремпель С.В., Подкорытова А.А., Ремпель А.А. Концентрационное тушение флуоресценции коллоидных квантовых точек сульфида кадмия // Физика твердого тела. — 2014. — Т.56. — вып. 3. — С. 549-552.
246. Купцов А.А., Мороз В.В., Ибрагимова С.А., Зеленьяк Т.Ю., Юлусова Д.В., Титова Т.В., Горшкова Р.М., Гладышев П.П. UV-VIS сканер планарных систем // В сборнике: Труды научного семинара памяти профессора, доктора химических наук Игоря Львовича Ходаковского: сборник материалов. 2017. — С. 110-114.
247. Новикова С.А., Шириков И.В., Насиров П.Д., Понкин Д.О., Люосев Д.А., Попова А.А., Гладышев П.П. Флуоресцентный ридер для иммунохроматографического анализа//, Физическая и аналитическая химия природных и техногенных систем: сборник трудов Всероссийской конференции с международным участием / под общ. ред. П. П. Гладышева. — Дубна: Гос. ун-т «Дубна», 2021. — С.113-120.
248. Ross G.M.S. et al. Unraveling the hook effect: a comprehensive study of high antigen concentration effects in sandwich lateral flow immunoassays // Analytical chemistry. — 2020. — V. 92. — №23. — P. 15587-15595.
249. Sathishkumar N., Toley B.J. Development of an experimental method to overcome the hook effect in sandwich-type lateral flow immunoassays guided by computational modelling // Sensors and Actuators B: Chemical. — 2020. — V. 324. — P. 128756.
250. 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.
251. 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.
252. [Электронный ресурс]. URL :<https://www.rapidlabs.co.uk/product/porcine-pseudorabies-gb-antibody-rapid-test/> (дата обращения: 25.02.2024).
253. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.jg-biotech.com/farm-animal/porcine-rapid-test/covid-ag-test-kit.html> (дата обращения: 26.02.2024).
254. Vrublevskaya V.V. at al. 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.
255. Патент на изобретение №2640120. «Устройство микродозирования опасных биологических жидкостей, исключающее контаминацию опасных инфекций» Авторы: Гладышев П.П., Крайнова Е.А., Ибрагимова С.А., Ковригин И.М., Моржухин А.М., Мороз

В.В., (Патентообладатель: Гладышев П.П.) Регистрационный № 2015153077, поступила 10.12.2015.

256. Патент на полезную модель «Одноразовая кассета-ротатор для микроцентрифугирования». Авторы: Гладышев П.П., Крайнова Е.А., Ибрагимова С.А., Ковригин И.М., Моржухин А.М., Мороз В.В. (Патентообладатель: Гладышев П.П.) Регистрационный № 2015153078, поступила 10.

## Приложение А

### Роботизированная техника второго уровня

Роботизированная техника второго уровня (Рисунок А1), включает блок пробоподготовки с использованием специализированной кассеты ротора микроцентрифуги (1); термостатируемого контейнера с исходными иммунохроматографическими кассетами с флуоресцентными метками (2); систему нанесения анализируемых проб на тест-полоски (автоматизированный диспенсер) (3) с кассеты-ротора микроцентрифуги (1); блок точного позиционирования кассет в конвейерной линии иммуноанализатора (4); термостатируемый контейнер иммунохроматографических кассет, выполняющий роль линии задержки на время реализации иммунохроматографического процесса (5); контейнер для утилизации кассет (6).

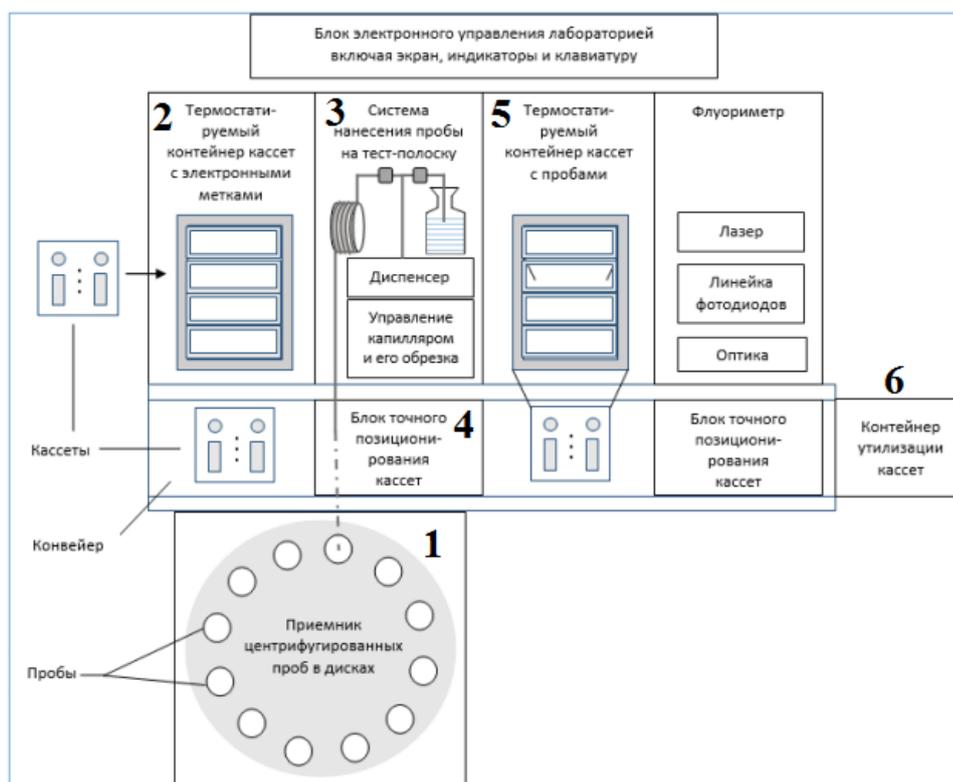


Рисунок А1 — Блок-схема роботизированной техники второго уровня

В качестве системы нанесения пробы на тест-полоску был предложен дозатор с внешним управлением для микродозирования опасных биологических жидкостей, состоящий из резервуара для растворов, электромагнитного клапана, микронасоса и одноразового стерильного гибкого шланга-капилляра [255]. Свободный конец одноразового стерильного гибкого шланга-капилляра зажимается и циклично

перемещается головкой автоматического манипулятора, при этом в зависимости от стадии цикла внутрь одноразового стерильного гибкого шланга-капилляра посредством микронасоса, соединенного с резервуаром для растворов через электромагнитный клапан, подается раствор или исследуемая жидкость в прямом или обратном направлении. На стадии отбора формируется последовательность микродозы исследуемой жидкости и пузырька воздуха. На стадии дозирования исследуемая жидкость путем изменения направления потока раствора, подаваемого из резервуара, сбрасывается в аналитическое устройство или на его функциональный элемент. В завершённом цикле отбора/дозирования отработанный участок гибкого шланга-капилляра перемещается к контейнеру для сбора опасных отходов, отрезается и сбрасывается в него. Далее дозатор готов для осуществления следующего цикла отбора/дозирования до тех пор, пока весь гибкий шланг-капилляр не будет израсходован и заменен на новый.

Для пробоподготовки и лабораторной диагностики жидкого биологического материала было разработано устройство [256], позволяющее разделять на фракции минимальные количества биологического материала, имеющее малый вес, минимальные габаритные размеры и предназначенный для одноразового применения. Такая система позволяет снизить вероятность инфицирования персонала во время лабораторной диагностики, в частности, при работе с особо опасными инфекциями; исключение взаимной контаминации анализируемых биологических проб; минимизация объема пробирки для размещения и микроцентрифугирования жидкой пробы биологического материала и сокращение объема опасных медицинских отходов.

## Приложение Б

### Метрологические характеристики флуоресцентного ридера

Флуоресцентный ридер был разработан с использованием цифрового микроскопа USB Digital Microscope EL-Micro-2, обеспечивающего регистрацию флуоресценции в области свыше 700 нм. Для исследования метрологических характеристик использовались конъюгаты CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВП-КТ700 с моноклональными антителами ADV 34/2 к гликопротеину гВ ВБА КТ при pH=7,8. Данные представлены в таблице Б1.

Таблица Б1 — Данные, полученные с ридера (конъюгат при pH=7,8)

Концентрации гВ ВБА (нг/мл)	Концентрации гВ ВБА (пмоль/л)	Площадь пика	
		Тест	Среднее
2	8,33	0,032	0,031
		0,031	
		0,031	
		0,040	
		0,022	
4	16,67	0,034	0,033
		0,030	
		0,034	
		0,032	
		0,032	
6,67	27,78	0,063	0,049
		0,046	
		0,047	
		0,046	
		0,045	
		0,046	0,053
		0,045	
		0,054	
		0,053	
		0,054	
		0,060	0,057
		0,060	
		0,056	
		0,056	
8,03	33,33	0,050	0,052
		0,051	

Концентрации гВ ВБА (нг/мл)	Концентрации гВ ВБА (пмоль/л)	Площадь пика	
		Тест	Среднее
		0,055	
		0,053	
		0,054	
10,03	41,67	0,036	0,033
		0,037	
		0,031	
		0,032	
		0,030	
13,33	55,55	0,111	0,113
		0,113	
		0,114	
		0,113	
		0,114	
		0,064	0,064
		0,064	
		0,064	
		0,063	
		0,064	
20	83,33	0,035	0,035
		0,033	
		0,035	
		0,036	
		0,035	
		0,076	0,074
		0,061	
		0,076	
		0,080	
		0,076	
		0,070	0,071
		0,071	
		0,071	
		0,071	
		0,071	
40	166,66	0,075	0,072
		0,075	
		0,060	
		0,076	
		0,076	
100	416,65	0,371	0,382
		0,374	

Концентрации гВ ВБА (нг/мл)	Концентрации гВ ВБА (пмоль/л)	Площадь пика	
		Тест	Среднее
		0,383	
		0,383	
		0,468	
		0,430	
		0,429	
		0,444	
200	833,33	0,444	0,173
		0,171	
		0,178	
		0,170	
		0,178	
		0,168	

### Оценка промахов (Q-критерий)

Таблица Б2 — Определение промахов

Концентрация (пмоль/л)	W <sub>n</sub>	тест	Q <sub>эсп</sub>
			тест
8,33	W1	0,0034	0,0666
16,67	W2	0,0037	0,0501
27,78	W3	0,0018	0,0489
	W4	0,0017	0,0364
	W5	0,0025	0,0488
33,33	W6	0,0232	0,0985
41,67	W7	0,0096	0,3247
55,55	W8	0,0026	0,2254
	W9	0,0003	0,0500
83,33	W10	0,0002	0,1278
	W11	0,0282	0,3698
	W12	0,0014	0,2584
166,66	W13	0,0007	0,2419
416,65	W14	0,0057	0,0369
833,30	W15	0,0001	0,0347
	W16	0,0008	0,0777

Вывод: Q<sub>табл</sub> при n = 5 (P = 90%) равно 0,56; Q<sub>табл</sub> > Q<sub>эсп</sub>; все значения не являются промахами.

### Случайная погрешность: численные характеристики воспроизводимости

Таблица Б3 — Экспериментальные данные: дисперсия, абсолютное и стандартное отклонение

Концентрация	$S^2(x)$ Тест	$S(x)$ Тест	$Sr$ (случайная погрешность) Тест
8,33	$6,05 \cdot 10^{-8}$	$7,77 \cdot 10^{-3}$	$1,22 \cdot 10^{-2}$
16,67	$4,68 \cdot 10^{-8}$	$2,16 \cdot 10^{-3}$	$4,02 \cdot 10^{-3}$
27,78	$3,96 \cdot 10^{-6}$	$1,99 \cdot 10^{-3}$	$3,46 \cdot 10^{-2}$
	$3,49 \cdot 10^{-6}$	$1,87 \cdot 10^{-3}$	$5,74 \cdot 10^{-2}$
	$4,27 \cdot 10^{-6}$	$2,06 \cdot 10^{-3}$	$3,91 \cdot 10^{-2}$
33,33	$2,41 \cdot 10^{-4}$	$1,55 \cdot 10^{-2}$	$3,50 \cdot 10^{-2}$
41,67	$2,16 \cdot 10^{-5}$	$4,65 \cdot 10^{-3}$	$2,69 \cdot 10^{-2}$
55,55	$3,94 \cdot 10^{-5}$	$6,28 \cdot 10^{-3}$	$2,01 \cdot 10^{-2}$
	$2,09 \cdot 10^{-6}$	$1,44 \cdot 10^{-3}$	$1,27 \cdot 10^{-2}$
83,33	$1,75 \cdot 10^{-7}$	$4,19 \cdot 10^{-3}$	$6,56 \cdot 10^{-2}$
	$1,23 \cdot 10^{-4}$	$1,11 \cdot 10^{-2}$	$2,90 \cdot 10^{-2}$
	$4,86 \cdot 10^{-5}$	$6,97 \cdot 10^{-2}$	$9,64 \cdot 10^{-2}$
166,66	$9,89 \cdot 10^{-6}$	$3,14 \cdot 10^{-3}$	$9,50 \cdot 10^{-2}$
416,65	$1,69 \cdot 10^{-6}$	$1,30 \cdot 10^{-3}$	$3,71 \cdot 10^{-2}$
833,30	$5,08 \cdot 10^{-5}$	$7,13 \cdot 10^{-3}$	$9,66 \cdot 10^{-2}$
	$1,21 \cdot 10^{-7}$	$3,49 \cdot 10^{-4}$	$4,92 \cdot 10^{-2}$

Вывод: из таблицы Б3 видно, что разброс для тестовой зоны составляет от  $1,22 \cdot 10^{-2}$  до  $9,66 \cdot 10^{-2}$ . Видно, что порядок соблюдается, но такой разброс достаточно велик и нельзя сказать, что результаты являются точными.

### Случайная погрешность: интервальная оценка

Таблица Б4 — Доверительный интервал, критерий Стьюдента

Концентрация пмоль/л	Площадь пика (тест) $\pm \Delta$
8,33	$0,031 \pm 0,008$
16,67	$0,033 \pm 0,002$
27,78	$0,050 \pm 0,010$
	$0,054 \pm 0,012$
	$0,057 \pm 0,003$
33,33	$0,053 \pm 0,003$
41,67	$0,033 \pm 0,004$
55,55	$0,113 \pm 0,002$
	$0,064 \pm 0,001$
83,33	$0,035 \pm 0,002$
	$0,074 \pm 0,009$

<b>Концентрация пмоль/л</b>	<b>Площадь пика (тест) ± Δ</b>
	0,071 ± 0,0004
166,66	0,072 ± 0,0086
416,65	0,382 ± 0,0138
833,33	0,173 ± 0,0057