



(51) МПК  
*C12Q 1/06* (2006.01)  
*B82B 3/00* (2006.01)  
*C12M 1/26* (2006.01)  
*C12M 1/34* (2006.01)  
*G01N 33/543* (2006.01)  
*G01N 33/558* (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

*C12M 1/26 (2020.08); C12M 1/34 (2020.08); G01N 33/543 (2020.08); G01N 33/558 (2020.08)*

(21)(22) Заявка: 2020119108, 09.06.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
09.06.2020
 Дата регистрации:  
 05.02.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 09.06.2020

(45) Опубликовано: 05.02.2021 Бюл. № 4

Адрес для переписки:

 119071, Москва, Ленинский пр-кт, 33, корп. 2,  
 патентный отдел

(72) Автор(ы):

 Панфёров Василий Геннадьевич (RU),  
 Сафенкова Ирина Викторовна (RU),  
 Жердев Анатолий Виталиевич (RU),  
 Дзантиев Борис Борисович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

 Федеральное государственное учреждение  
 "Федеральный исследовательский центр  
 "Фундаментальные основы биотехнологии"  
 Российской академии наук" (ФИЦ  
 Биотехнологии РАН) (RU)

 (56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: RU 2523393 C1, 20.07.2014. RU  
 2642588 C1, 25.01.2018. RU 192778 U1, 01.10.2019.  
 US 9739773 B1, 22.08.2017.

(54) Устройство для иммунохроматографической высокочувствительной и внелабораторной детекции фитопатогенной бактерии *Clavibacter michiganensis*, основанное на повышении интенсивности регистрируемого колориметрического сигнала за счет каталитических свойств наномаркера

(57) Реферат:

Заявленное устройство предназначено для иммунохроматографической высокочувствительной, внелабораторной и экспрессной детекции фитопатогенной бактерии *Clavibacter michiganensis* в экстрактах листьев и клубней картофеля. Устройство представляет собой мультимембранный композит с предварительно нанесенными и высушенными иммунореагентами (тест-полоску). В состав мультимембранного композита входят рабочая нитроцеллюлозная мембрана с предварительно нанесенными иммунореагентами, закрепленная на твердой полистироловой основе, стекловолоконная мембрана с нанесенными конъюгатом пористых наночастиц типа ядро-оболочка - Au-Pt, стабилизированных поливинилпирролидоном с кроличьими поликлональными антителами, специфичными к бактериальным клеткам *S.michiganensis*, мембрана для впитывания и сепарации

компонентов исследуемой пробы и конечной адсорбирующей мембраны для впитывания компонентов пробы после прохождения реакции и поддержания миграции жидкости по тест-полоске за счет капиллярных сил. Отличительной особенностью заявленного устройства является то, что в качестве метки использован конъюгат пористых наночастиц ядро-оболочка - Au-Pt, стабилизированных поливинилпирролидоном с поликлональными антителами против *S.michiganensis*. Частицы Au-Pt обладают как оптическими, так и каталитическими (пероксидаза-подобными свойствами), что позволяет использовать их в иммунохроматографическом анализе (ИХА) как наноразмерную метку с собственным оптическим сигналом, так и для снижения предела обнаружения ИХА, основанного на повышении интенсивности окрашивания при низких концентрациях антигена в пробе за счет

пероксидаза-подобных свойств наночастиц, приводящих к накоплению окрашенных продуктов окисления субстрата. Высокая устойчивость частиц к химическим ингибиторам пероксидаз (азид натрия) и температуре (до 100°C) позволяет использовать наночастицы Au-Pt для амплификации сигнала даже в пробах с высокой эндогенной пероксидазной активностью после ее нивелирования. В контрольную зону (К.З.) нанесен иммуноглобулин-связывающий белок А. В тестовую зону (Т.З.) нанесены кроличьи поликлональные антитела, специфичные к бактериальным клеткам *S.michiganensis*. На стекловолоконную мембрану нанесен конъюгат поликлональных кроличьих антител, специфичных к детектируемым бактериальным клеткам, с пористыми наночастицами типа ядро-оболочка Au-Pt, стабилизированных поливинилпирролидоном. Для проведения анализа не требуется никаких дополнительных стационарных устройств. Продолжительность

анализа составляет 15 мин, включает в себя стадии подготовки анализируемой пробы, проведение иммунохроматографического анализа с использованием тест-полоски, добавления субстратного раствора для повышения интенсивности регистрируемого колориметрического сигнала. Технической задачей заявленной полезной модели является повышение интенсивности регистрируемого окрашивания Т.З. за счет реакции, катализируемой пористыми наночастицами типа ядро-оболочка Au-Pt непосредственно на тест-полоске. Технический результат заявленной полезной модели заключается в снижении предела обнаружения фитопатогенной бактерии *S.michiganensis* за счет использования простой одностадийной процедуры, обеспечиваемой за счет добавления на тест-полоску субстратного раствора, содержащего смесь 3,3'-диаминобензидина, пероксида водорода и ионов Ni<sup>2+</sup>. 4 табл., 3 пр., 2 ил.

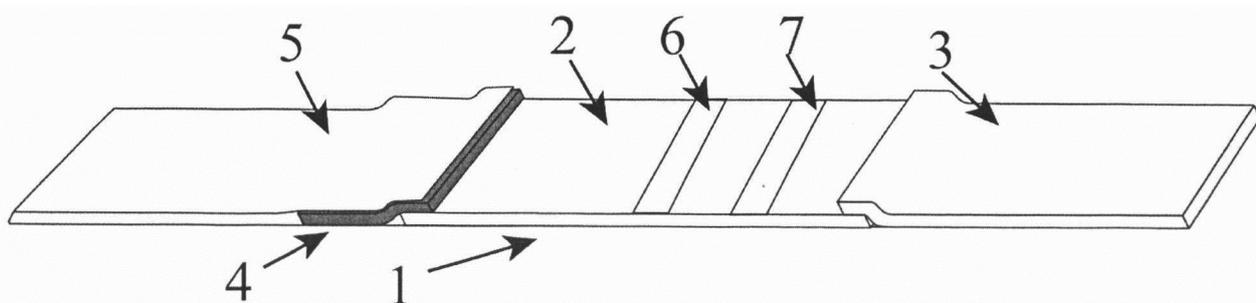


Схема заявляемого устройства для иммунохроматографической экспрессной лабораторной и внелабораторной детекции *S. michiganensis*

Рис.2

RU 202193 U1

RU 202193 U1

Полезная модель относится к детекции фитопатогенной бактерии *Clavibacter michiganensis* (*C. michiganensis*) и может быть использована как экспрессное лабораторное и внелабораторное средство для проведения фитосанитарного контроля специализированными службами, таможенного контроля посевного материала, мониторинга зараженности фермерскими хозяйствами.

Фитопатогенные микроорганизмы поражают широкий спектр сельскохозяйственных культур. Заражение фитопатогенными микроорганизмами приводит к существенным экономическим потерям за счет снижения урожайности растений (до 100%), ухудшению их хранимости и устойчивости к вредителям.

Широко распространенным на территории Российской Федерации является бактериальный фитопатоген *C. michiganensis*, аэробная, неспорообразующая грамположительная бактерия. Основным растением, поражаемым *C. michiganensis*, является картофель. Поражение картофеля приводит к загниванию его клубней (т.н. кольцевая гниль картофеля) и возникновению очагов ямчатой гнили. Заражение может происходить в период уборки урожая за счет проникновения бактерий через участки с поврежденной кожурой. Детекция низких концентраций бактерий, не вызывающих развития выраженных симптомов (латентная инфекция), представляет особый интерес для практического использования, поскольку при посадке клубней с низкой концентрацией бактерий развитие симптомов наблюдается только в процессе цветения. Таким образом, изолирование зараженных растений приведет к существенным экономическим потерям. Для предотвращения больших потерь урожая и существенных убытков необходимо диагностировать латентные инфекции в семенном материале. Согласно нормативной документации - ГОСТ 33996-2016 «Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества» - *C. michiganensis* входит в список контролируемых фитопатогенных микроорганизмов картофеля. Согласно рекомендациям нормативной документации предел обнаружения для иммунохимических методов анализа составляет  $10^4$  клеток/мл. Однако для диагностики латентных инфекций необходимо достижение меньших пределов обнаружения.

Для детекции *C. michiganensis* используются различные вариации метода полимеразной цепной реакции, иммуноферментный анализ, иммунохроматографический анализ. Несмотря на такие преимущества, как специфичность и низкий предел обнаружения, для применения методов, основанных на полимеразной цепной реакции, необходимо дорогостоящее стационарное оборудование, условия, обеспечивающие отсутствие контаминации, квалифицированный персонал. Продолжительность анализа (минимум один час без учета подготовки проб) также ограничивает применимость данных методов во внелабораторных условиях.

Для высокочувствительной детекции *C. michiganensis* могут быть также использованы активно развивающиеся методы иммунохимического анализа - иммуноферментный (ИФА) и иммунохроматографический (ИХА) анализ. Возможности иммуноанализа связаны с его методической простотой, а также высокой производительностью, обеспечивающей одновременное тестирование множества проб в течение 2-3 часов. Однако выполнение ИФА включает несколько дополнительных стадий (внесение реагентов и отмывка), сопряжено с необходимостью дополнительных расходных материалов (микропланшеты, наконечники пипеток, и др.) и оборудования для регистрации результатов анализа. ИХА, в отличие от ИФА, не требует дополнительного оборудования и позволяет проводить массовый скрининг в нестерильных внелабораторных условиях с использованием минимальной подготовки проб. В классическом формате ИХА является одностадийным анализом и позволяет проводить

качественный (наличие/отсутствие окрашенной Т.З.) и количественный анализ (регистрация интенсивности колориметрического сигнала в Т.З., определение количества бактерий путем сравнения интенсивности колориметрического сигнала пробы и образцов с известным количеством бактерий) по накоплению окрашенного маркера.

5 Однако предел обнаружения одностадийного ИХА зачастую оказывается недостаточным для высокочувствительной детекции. Один из подходов для снижения предела обнаружения ИХА основан на повышении интенсивности регистрируемого колориметрического сигнала за счет каталитической конверсии молекул субстрата в окрашенный продукт. Амплификация сигнала достигается за счет того, что единичная  
10 наночастица-катализатор приводит к конверсии большого количества молекул субстрата в регистрируемый продукт.

Увеличение регистрируемой интенсивности окрашивания связано с накоплением продукта ферментативной реакции на тест-полоске. В качестве каталитической метки могут быть использованы наночастицы металлов, поскольку они обладают уникальными  
15 оптическими свойствами, могут быть легко сконъюгированы с рецепторными молекулами, показывают высокую каталитическую активность и стабильность в присутствии ингибиторов ферментов. Наиболее широко в качестве каталитически активных нанометок используются частицы Au, Pt, Pd, Ir различной формы и морфологии. Однако высокая стоимость благородных металлов-катализаторов  
20 ограничивает их применение в аналитических тест-системах.

Особенностью катализа с использованием наночастиц является множество активных центров, расположенных на поверхности частиц. Таким образом, большая часть атомов благородных металлов оказывается экранированной (внутри частиц) и не участвует в катализе. Для снижения расхода благородных металлов при синтезе каталитически  
25 активных частиц предложен подход, основанный на формировании тонкого слоя каталитически-активного металла на наночастицах носителях, благодаря чему все поверхностно экспонированные атомы металла оказываются доступны для субстрата и каталитической конверсии. Данный подход был использован в ряде работ для получения каталитически активных наночастиц Au-Pt. Например, Zhang и соавторы  
30 использовали конъюгат наночастиц Au-Pt с антителами против IgG кролика для ИХА. Гао и соавторы использовали наночастицы, состоящие из золотого ядра и монослойного платинового покрытия в качестве метки в ИХА простатического специфического антигена.

Использованные протоколы синтеза основаны на формировании платинового  
35 покрытия на наночастицах золота, однако не позволяют достичь максимального экспонирования каталитически активного платинового покрытия. Формирование пористого платинового покрытия на затравочных наночастицах золота позволит увеличить площадь поверхности каталитически-активных частиц. В литературе описан синтез пористых наночастиц Au-Pt. Так, Loynachan и соавторы для формирования  
40 пористой платиновой оболочки в качестве затравочных частиц использовали наночастицы золота, стабилизированные поливинилпирролидоном. Для синтеза пористых использовали высокие концентрации платины (до 3 мМ), высокая стоимость частиц ограничивает их применение для рутинного скрининга. Jiang и соавторы для синтеза пористых платиновых частиц использовали реакцию совместного  
45 восстановления солей платины и золота в присутствии полимера Pluronic F127. Однако в данном случае также были использованы высокие концентрации солей благородных металлов (10 мМ), а совместное восстановление не позволяет достигнуть экспонирования каталитически активных платиновых частиц на поверхности.

Таким образом, известные разработки иммунохроматографических тест-систем сфокусированы на использовании неоптимальных с точки зрения катализа непористых частиц типа ядро-оболочка, а протоколы синтеза пористых частиц требуют высоких концентраций дорогостоящих солей благородных металлов, и также не позволяют достигнуть максимального экспонирования каталитически-активных платиновых частиц на поверхности.

Отличительной особенностью предлагаемой полезной модели является использование для ИХА наночастиц типа ядро-оболочка - Au-Pt, обладающих пористой структурой каталитически активной платиновой оболочки и требующих в 3-10 раз меньшего (1 мМ) количества дорогостоящей платины для синтеза. Поливинилпирролидон (молекулярная масса 10 кДа) формирует плотный адсорбционный слой вокруг наночастиц золота (20 нм) и приводит к формированию пористой платиновой оболочки при восстановлении соли платины ( $\text{Na}_2\text{PtCl}_6$ , 1 мМ) в присутствии аскорбата натрия (10 мМ). Полученные пористые наночастицы Au-Pt могут быть связаны с антителами за счет физической адсорбции.

ИХА основан на миграции жидкой пробы вдоль тест-полоски под действием капиллярных сил без использования дополнительного оборудования. При прохождении пробы через иммобилизованные на тест-полоске иммунореагенты на разных участках мембраны происходит формирование двойных иммунных комплексов при контакте пробы с конъюгатом (клетки *S.michiganensis* с конъюгатом антител с пористыми наночастицами Au-Pt), тройных иммунных комплексов при прохождении пробы через тестовую зону (Т.З.) (клетки *S.michiganensis* с конъюгатом антител с пористыми наночастицами Au-Pt - иммобилизованные в Т.З. антитела) и связывания избытка свободного конъюгата в контрольной зоне (К.З.) (конъюгат антител с пористыми наночастицами Au-Pt - иммуноглобулин-связывающий белок А в К.З.) Конъюгированный со специфическими антителами маркер (пористые наночастицы Au-Pt) распределяется по рабочей мембране за счет формирования иммунных комплексов, и его наличие или отсутствие в определенных участках мембраны приводит к возникновению окрашивания. Для снижения предела обнаружения ИХА на тест-полоску наносится субстратный раствор (10 мкл), состоящий из 0,05% 3,3'-диаминобензидина, 0,03% пероксида водорода и 0,05% сульфата никеля в 50 мМ фосфатном буфере (рН=7,2). После пятиминутной инкубации субстратного раствора и тест-полоски под действием наночастиц Au-Pt происходит конверсия неокрашенного субстрата в нерастворимый продукт, накопление которого в Т.З. и К.З. существенно увеличивает интенсивность колориметрического сигнала.

Использование ИХА для детекции фитопатогенных микроорганизмов обеспечивает достижение ряда преимуществ - проведение эффективного параллельного скрининга большого количества проб во внелабораторных условиях, экспрессность анализа (15-20 мин) при минимальной подготовке проб, простота детектирования и интерпретации результатов.

Несмотря на то, что ИХА активно разрабатывается и применяется для диагностики фитопатогенов и других токсичных контаминантов, разработка иммунохроматографических тест-систем для высокочувствительной детекции *S.michiganensis* с целью внелабораторного выявления латентных инфекций кольцевой гнили картофеля не описана.

Наиболее близкими аналогами заявляемой полезной модели являются иммунохроматографические тест-системы с использованием наночастиц ядро-оболочка Au-Pt, представленные в работах:

Jiang и соавторов « Sensitive detection of Escherichia coli 0157:H7 using Pt-Au bimetal nanoparticles with peroxidase-like amplification)), Biosensors and Bioelectronics, 2016, v. 77, p. 687-694.;

Loynachan и соавторов «Platinum nanocatalyst amplification: redefining the gold standard for lateral flow immunoassays with ultrabroad dynamic range)). ACS Nano, 2018, V. 12, p. 279-288.

Технической задачей заявленной полезной модели является повышение интенсивности окрашивания Т.З. посредством реакции, катализируемой пористыми наночастицами типа ядро-оболочка Au-Pt на тест-полоске.

Технический результат заявленной полезной модели заключается в снижении предела обнаружения фитопатогенной бактерии *S.michiganensis* за счет использованием простой одностадийной процедуры, обеспечиваемой добавлением на тест-полоску субстратного раствора, содержащего смесь 3,3'-диаминобензидина, пероксида водорода и ионов  $Ni^{2+}$ . Пористая структура наночастиц ядро-оболочка Au-Pt (Рис 1 А), отличающая их от стандартных частиц ядро-оболочка (Рис 1 Б), достигается за счет адсорбции поливинилпирролидона на поверхности затравочных наночастиц золота, что препятствует формированию монослоя плагина вокруг затравочных частиц. Пористая морфология обеспечивает большую площадь поверхности активных частиц, существенно увеличивая их удельную каталитическую активность по сравнению с непористыми частицами ядро-оболочка. Пористые наночастицы Au-Pt сохраняют до 80% пероксидазоподобной активности в присутствии азидата натрия - ингибитора пероксидаз, что позволяет использовать предложенную схему для повышения интенсивности колориметрического сигнала даже в растительных пробах с высокой эндогенной пероксидазной активностью.

Предлагается устройство для иммунохроматографической экспрессной лабораторной и внелабораторной высокочувствительной детекции *S.michiganensis* в экстрактах листьев и клубней картофеля. Устройство представляет собой мультимембранный композит с предварительно нанесенными и высушенными иммунореагентами (тест-полоску). В состав композита (рис. 2) входят рабочая нитроцеллюлозная мембрана с предварительно нанесенными иммунореагентами, закрепленная на твердой полистироловой основе, стекловолоконная мембрана с нанесенными конъюгатом пористых наночастиц типа ядро-оболочка - Au-Pt, стабилизированных поливинилпирролидоном с кроличьими поликлональными антителами специфичными к бактериальным клеткам *S.michiganensis*, мембрана для впитывания и сепарации компонентов исследуемой пробы и конечной адсорбирующей мембраны для впитывания компонентов пробы после прохождения реакции и поддержания миграции жидкости по тест-полоске за счет капиллярных сил.

Указанный технический результат достигается тем, что:

- в контрольную зону (К.З.) нанесен иммуноглобулин-связывающий белок А;
- в тестовую зону (Т.З.) нанесены кроличьи поликлональные антитела специфичные к клеткам *S.michiganensis*;
- на стекловолоконную мембрану нанесен конъюгат пористых наночастиц Au-Pt с поликлональными кроличьими антителами, специфичными к *S.michiganensis*
- при добавлении смеси субстратного раствора, содержащего смесь 3,3'-

диаминобензидина, пероксида водорода и ионов  $Ni^{2+}$  наночастицы Au-Pt катализируют реакцию окисления 3,3'-диаминобензидина пероксидом водорода, ионы никеля обеспечивают формирование нерастворимого темноокрашенного продукта реакции, преципитирующего на рабочей нитроцеллюлозной мембране.

В таблице 1 приведена характеристика материалов, из которых изготовлены элементы

заявляемого устройства.

Таблица 1

Характеристика материалов, из которых изготовлены элементы заявляемого устройства

№	Наименование элемента заявляемого устройства	Размер	Состав материала	Характеристика материала
1	Твердая основа рабочей мембраны	3,5 x 76 мм	полистироловый адгезивный материал	<ul style="list-style-type: none"> <li>цвет – белый</li> <li>толщина – 250±15 мкм</li> </ul>
2	Рабочая мембрана	3,5 x 26 мм	полимер нитроцеллюлоза	<ul style="list-style-type: none"> <li>средний диаметр пор – 12 мкм;</li> <li>сорбционная емкость по белку – не менее 50 мг/см<sup>2</sup>;</li> <li>толщина – 100±15 мкм;</li> <li>скорость прохождения физиологического раствора через 4 см мембраны – 170±25 с;</li> </ul>
3	Конечная адсорбирующая мембрана	3,5 x 27 мм	целлюлоза	<ul style="list-style-type: none"> <li>цвет – белый;</li> <li>толщина – 280-480 мкм;</li> <li>адсорбционная емкость – 8,5-15,5 мг/см<sup>2</sup>;</li> <li>средний объем удержания воды – 37-47 мг/см<sup>2</sup>;</li> </ul>
4	Мембрана для нанесения конъюгата антител с нанодисперсным маркером	3,5 x 6 мм	стеклянное микроволокно; или полиэфирное микроволокно	<ul style="list-style-type: none"> <li>ширина – 6 мм;</li> <li>толщина – 400 мкм;</li> <li>адсорбционная емкость – 9,8 мг/см<sup>2</sup>;</li> <li>скорость прохождения воды через 4 см мембраны – 24 с;</li> </ul>
5	Мембрана для впитывания и сепарации образца	3,5 x 27 мм	целлюлоза	<ul style="list-style-type: none"> <li>цвет – белый;</li> <li>толщина – 280-380 мкм;</li> <li>адсорбционная емкость – 10,5-15,5 мг/см<sup>2</sup>;</li> <li>средний объем удержания воды – 30-40 мг/см<sup>2</sup>;</li> </ul>

Анализ проводят следующим образом:

1. 100 мкл анализируемого растительного экстракта (экстракт листьев или клубней картофеля) вносят в пластиковую пробирку вместимостью 1,5 мл.

2. Тест-полоску погружают вертикально нижним концом мембраны для впитывания образца в анализируемый экстракт и выдерживают при комнатной температуре в течение 5 мин.

3. Вынимают тест-полоску и помещают ее на сухую горизонтальную поверхность на 5 мин.

4. Через 10 мин после начала движения жидкости по тест-полоске результат анализа фиксируют визуально или с использованием детектора с видеоцифровой регистрацией.

5. Добавляют 20 мкл субстратного раствора, и выдерживают в течение 3 мин. Результат анализа фиксируют визуально или с использованием детектора с видеоцифровой регистрацией.

Заявляемое устройство функционирует следующим образом (см. рис. 1). Если в

образце присутствуют клетки *S.michiganensis*, то под действием капиллярных сил они с потоком жидкости перемещаются по впитывающей мембране (5), доходят до стекловолоконной мембраны (4) и вступают в реакцию с поликлональными антителами на поверхности конъюгатов пористых наночастиц Au-Pt с образованием двойных иммунных комплексов (клетки *S.michiganensis* - антитела, меченные пористыми наночастицами Au-Pt). Образовавшиеся двойные иммунные комплексы под действием капиллярных сил движутся вдоль рабочей нитроцеллюлозной мембраны (2) и взаимодействуют с иммобилизованными в Т.З. поликлональными антителами к *S.michiganensis* с образованием тройных комплексов (иммобилизованные на мембране в Т.З. антитела - клетки *S.michiganensis* - антитела, меченные пористыми наночастицами Au-Pt). Избыток несвязавшихся в Т.З. конъюгатов пористых наночастиц с антителами продолжает двигаться вдоль рабочей нитроцеллюлозной мембраны (2) и взаимодействует с белком А, иммобилизованными в К.З. (А), с образованием двойных комплексов (иммобилизованные на мембране антивидовые антитела - антитела, меченные коллоидным золотом).

Интерпретация результатов анализа производится на основании наличия окрашенных Т.З. и К.З.:

1. Если через 10 мин на рабочей мембране тест-полоски появляются две темноокрашенные зоны (Т.З. и К.З.), то результат анализа считается положительным, т.е. в растительной пробе присутствуют клетки *S.michiganensis*. Проведения дополнительной стадии усиления сигнала в таком случае не требуется.

2. Если через 10 мин на рабочей мембране тест-полоски появляется одна темноокрашенная К.З. при этом окрашивание Т.З. не наблюдается, то результат анализа считается отрицательным, т.е. в растительной пробе не содержится клеток *S.michiganensis* или их количество оказывается меньше предела обнаружения ИХА. В таком случае проводится дополнительная стадия усиления сигнала. Для этого на тест-полоску добавляют 20 мкл субстратного раствора. После добавления субстрата полоска выдерживается в течение 3 мин в вертикальном положении. Наличие темноокрашенной Т.З. свидетельствует о присутствии бактериальных клеток *S.michiganensis* в анализируемой пробе, отсутствие окрашенной Т.З. и наличие окрашенной К.З. свидетельствует об отсутствии *S.michiganensis* в анализируемой пробе.

3. Если через 10 мин на рабочей мембране тест-полоски не образуется ни одной окрашенной линии или происходит окрашивание только Т.З. (без формирования окраски К.З.), то результат анализа считается недействительным (рис. 2д). В таком случае необходимо повторное тестирование с использованием новой тест-полоски.

Эффективность данного подхода подтверждается следующими примерами:

Пример 1 (влияние азида натрия на пероксидазную активность экстрактов клубней картофеля и конъюгата пористых наночастиц Au-Pt с поликлональными антителами против клеток *S.michiganensis*)

Выбор концентрации азида натрия, обеспечивающей ингибирование эндогенных пероксидаз в растительном экстракте с сохранением высокой пероксидаза-подобной активности пористых наночастиц Au-Pt, позволяет использовать данный наноразмерный маркер для ИХА без дополнительных отмывок. В течение 5 мин инкубировали различные концентрации азида натрия (0-0,15%) с 100 мкл экстракта клубней картофеля и 95 мкл фосфатного буфера, содержащего 5 мкл пористых наночастиц. Далее добавляли 100 мкл субстратного раствора, содержащего 50 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, 3 мМ пероксид водорода в 50 мМ цитратном буфере, pH=5,0, и выдерживали в течение 10 мин. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М серной кислоты.

Интенсивность окрашивания при длине волны 450 нм фиксировали с помощью фотометра в трех повторностях. Результаты представлены в таблице 2.

Наночастицы Au-Pt сохраняют до 82% пероксидаза-подобной активности в условиях, обеспечивающих полную инактивацию эндогенных пероксидаз. Таким образом, добавление 0,05% азид натрия позволяет проводить амплификацию сигнала с использованием каталитической активности пористых наночастиц даже при анализе проб с высокой эндогенной пероксидазной активностью.

Пример 2 (выявление клеток *S.michiganensis* в экстракте клубней картофеля без проведения стадии амплификации сигнала).

С использованием заявляемого устройства проводят анализ экстрактов клубней картофеля, с добавлением 103- 106 клеток/мл (кл/мл) *S.michiganensis* и экстракта клубней картофеля, не содержащего бактериальных клеток. Анализируемую аликвоту (100 мкл экстракта) вносят в пробирку, после чего тест-полоску погружают вертикально нижним концом мембраны для впитывания образца на глубину 0,5 см в образец и инкубируют при комнатной температуре в течение 5 мин. Вынимают тест-полоску и помещают ее на горизонтальную поверхность. Результат анализа оценивают через 5 мин с помощью программного обеспечения видеодигитального детектора. Анализ проводят в трех повторностях, используя тест-полоски разных серий. Результаты анализа приведены в таблице 3.

Пределом обнаружения ИХА считали количество клеток *S.michiganensis*, обеспечивающих колориметрический сигнал в Т.З. превосходящий сумму среднего значения колориметрического сигнала и трех стандартных отклонений для отрицательной пробы (здоровый экстракт). Для ИХА без проведения амплификации сигнала сумма среднего значения колориметрического сигнала и трех стандартных отклонений для отрицательной пробы была равна 0,85. Таким образом, предел обнаружения для данной системы составлял 104 кл/мл *S.michiganensis*. Из приведенных данных видно, что регистрируемая интенсивность колориметрического сигнала в тестовой зоне позволяет достоверно детектировать 104 кл/мл *S.michiganensis* в экстракте клубней картофеля в рамках заявленного времени анализа (10 мин).

Таблица 2

Относительная интенсивность сигнала (%) при длине волны 450 нм при инкубации экстракта клубней картофеля и пористых частиц Au-Pt с различными концентрациями азид натрия

Содержание азид натрия	Экстракт клубней картофеля				Частицы Au-Pt			
	Измерение №1	Измерение №2	Измерение №3	Среднее значение	Измерение №1	Измерение №2	Измерение №3	Среднее значение
0	100	96,3	98,3	98,2±1,9	100	98,1	98,4	98,8±1,0
0,015	37,1	34,3	34,7	35,4±1,5	91,5	93,9	89,6	91,7±2,2
0,025	2,0	0,6	0,8	1,1±0,8	87,1	88,3	86,2	87,2±1,1
0,05	0	0	0	0	84,9	80,7	81,1	82,2±2,3
0,1	0	0	0	0	77,2	80,1	79,6	78,9±1,6
0,15	0	0	0	0	69,1	72,3	74,3	71,9±2,6

Таблица 3

Интенсивность колориметрического сигнала в Т.З при различных концентрациях *S. michiganensis* для ИХА без амплификации сигнала

Кл/мл <i>S. michiganensis</i>	Интенсивность регистрируемого колориметрического сигнала в Т.З., отн.ед.			
	Тест-полоска №1	Тест-полоска №2	Тест-полоска №3	Среднее значение
10 <sup>6</sup>	12,32	10,87	11,10	11,43±0,77
10 <sup>5</sup>	7,13	7,85	8,35	7,77±0,61
5x10 <sup>4</sup>	8,77	6,54	7,21	7,51±1,14
10 <sup>4</sup>	5,10	3,88	3,01	3,99±1,04
5x10 <sup>3</sup>	1,21	0,64	0,55	0,80±0,36
10 <sup>3</sup>	1,17	0,57	0,44	0,72±0,39
0	0,51	0,34	0,16	0,34±0,17

Пример 3 (выявление клеток *S.michiganensis* в экстракте клубней картофеля без проведения стадии амплификации сигнала).

С использованием заявляемого устройства проводят анализ экстрактов клубней картофеля, с добавлением  $10^3$ - $10^6$  клеток/мл (кл/мл) *S.michiganensis* и экстракта клубней картофеля, не содержащего бактериальных клеток. Анализируемую аликвоту (100 мкл экстракта) вносят в пробирку, после чего тест-полоску погружают вертикально нижним концом мембраны для впитывания образца на глубину 0,5 см в образец и инкубируют при комнатной температуре в течение 5 мин. Вынимают тест-полоску и помещают ее на горизонтальную поверхность. Спустя 5 мин добавляют 20 мкл субстратного раствора. Результат анализа оценивают через 5 мин с помощью видеоцифрового детектора. Анализ проводят в трех повторностях, используя тест-полоски разных серий. Результаты анализа приведены в таблице 4.

Пределом обнаружения ИХА считали количество клеток *S.michiganensis*, обеспечивающих колориметрический сигнал в Т.З. превосходящий сумму среднего значения колориметрического сигнала и трех стандартных отклонений для отрицательной пробы (здоровый экстракт). Для ИХА без проведения амплификации сигнала сумма среднего значения колориметрического сигнала и трех стандартных отклонений для отрицательной пробы была равна 1,63. Таким образом, предел обнаружения для данной системы составлял 103 кл/мл *S.michiganensis*. Из приведенных экспериментальных данных видно, что регистрируемая интенсивность колориметрического сигнала в тестовой зоне позволяет достоверно детектировать  $10^3$  кл/мл *S.michiganensis* в экстракте клубней картофеля в рамках заявленного времени анализа (10 мин).

По сравнению с системой без амплификации сигнала получено десятикратное снижение предела обнаружения, достигаемое за короткое время (дополнительных 5 мин), и не требующее сложных методических решений (добавление капли готового к использованию субстратного раствора на тест-полоску).

Таблица 4

Интенсивность регистрируемого колориметрического сигнала в Т.З при различных концентрациях *S. michiganensis* для ИХА со стадией амплификации сигнала

Кл/мл <i>S. michiganensis</i>	Интенсивность регистрируемого колориметрического сигнала в Т.З., отн.ед.			
	Тест-полоска №1	Тест-полоска №2	Тест-полоска №3	Среднее значение
$10^6$	43,97	48,94	45,07	45,99±2,61
$10^5$	40,06	43,67	43,41	42,38±2,01
$5 \times 10^4$	42,488	38,45	40,03	40,32±2,03
$10^4$	28,82	26,84	28,02	27,89±0,99
$5 \times 10^3$	15,52	10,51	12,03	12,68±2,56
$10^3$	2,27	2,77	3,54	2,86±0,63
0	1,3	0,96	1,1	1,12±0,17

Краткое описание чертежей.

На рис. 1 представлены микрофотографии наночастиц, полученные методом просвечивающей электронной микроскопии. А - наночастицы типа ядро-оболочка Au-Pt. Б - пористые наночастицы типа ядро-оболочка Au-Pt, стабилизированные поливинилпирролидоном.

На рис. 2 изображена схема заявляемого устройства для иммунохроматографической экспрессной лабораторной и внелабораторной детекции *S.michiganensis*. 1 - твердая полистирольная основа рабочей нитроцеллюлозной мембраны; 2 - рабочая нитроцеллюлозная мембрана; 3 - конечная адсорбирующая мембрана для впитывания компонентов образца после прохождения реакции; 4 - стекловолоконная мембрана с нанесенным и высушенным конъюгатом пористых наночастиц Au-Pt с поликлональными кроличьими антителами, специфичными к *S.michiganensis*; 5 - мембрана для впитывания и сепарации исследуемого образца; 6 - Т.З. с нанесенными поликлональными кроличьими

антителами к *S.michiganensis*; 7 - К.З. с нанесенным иммуноглобулин-связывающим белком А.

(57) Формула полезной модели

5 Устройство для иммунохроматографической экспрессной внелабораторной детекции фитопатогенной бактерии - *Clavibacter michiganensis*, включающее в себя тест-полоску, состоящую из полистироловой подложки, на которую закреплены нитроцеллюлозная мембрана с предварительно нанесенными и высушенными антителами, стекловолоконная мембрана с нанесенными и высушенными конъюгатом антител с  
10 пористыми наночастицами ядро-оболочка - Au-Pt, стабилизированных поливинилпирролидоном, мембрана для впитывания и сепарации исследуемой пробы и конечная адсорбирующая мембрана для впитывания компонентов пробы после прохождения реакции и поддержания миграции жидкости по тест-полоске за счет капиллярных сил, на нитроцеллюлозную мембрану нанесены контрольная и тестовые  
15 зоны, в контрольную зону иммобилизован иммуноглобулин-связывающий белок А, в тестовую зону иммобилизованы поликлональные кроличьи антитела, специфичные к бактериальным клеткам *S.michiganensis*, на стекловолоконную мембрану нанесен конъюгат поликлональных кроличьих антител, специфичных к *S.michiganensis*, с пористыми наночастицами Au-Pt, формирующие в результате миграции пробы в тестовой  
20 зоне иммунные комплексы приводят к развитию окрашивания, и интенсивность которого пропорциональна количеству клеток *S.michiganensis* в пробе, повышение интенсивности окрашивания при низких концентрациях *S.michiganensis* основано на накоплении нерастворимого продукта каталитической реакции окисления 3,3'-диаминобензидина в присутствии пероксида водорода и ионов никеля и достигается за счет пероксидазо-  
25 подобных свойств пористых наночастиц Au-Pt, используемых в качестве каталитической и колориметрической метки.

30

35

40

45

1

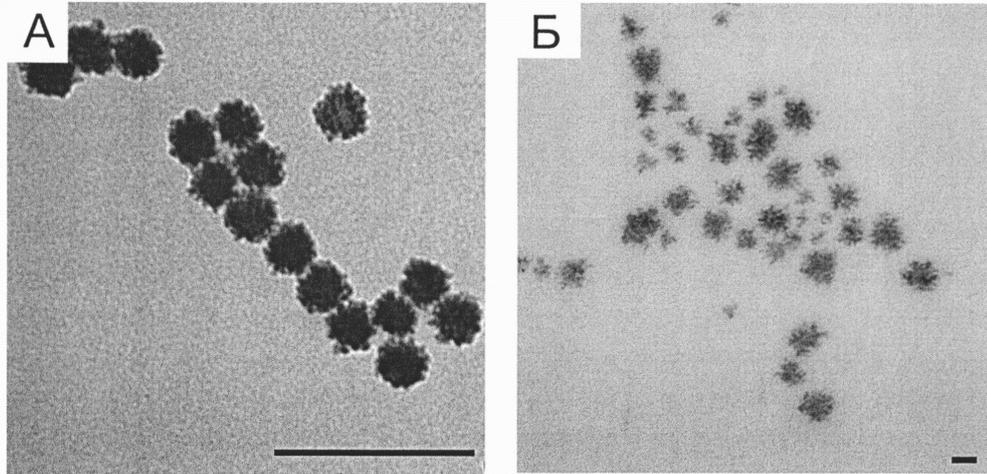


Рис. 1. Микрофотографии наночастиц, полученные методом просвечивающей электронной микроскопии

2

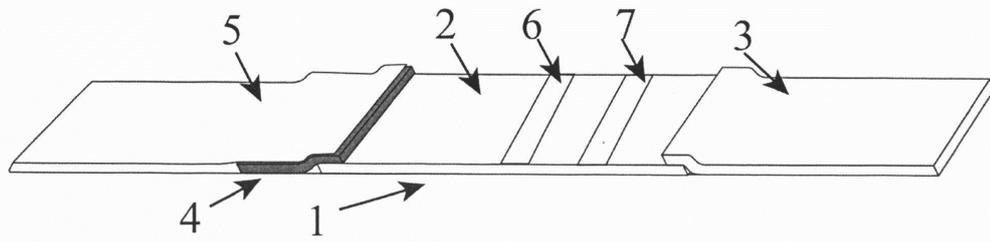


Схема заявляемого устройства для иммунохроматографической экспрессной лабораторной и внелабораторной детекции *C. michiganensis*

Рис.2