



(51) МПК
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/543 (2020.08); *G01N 33/558* (2020.08); *C12Q 1/70* (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2020119110, 09.06.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.06.2020

Дата регистрации:
17.12.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 09.06.2020

(45) Опубликовано: 17.12.2020 Бюл. № 35

Адрес для переписки:

**119071, Москва, Ленинский пр-т, 33, корп. 2,
ФИЦ Биотехнологии РАН, 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: US 9739773 B1, 22.08.2017. US
 8709826 B2, 29.04.2014. EP 1250598 B1, 19.10.2005.
 RU 192778 U1, 01.10.2019.

(54) Устройство для мультиплексного иммунохроматографического анализа патогенов вирусной и бактериальной природы с дополнительной стадией усиления сигнала

(57) Реферат:

Заявленное устройство предназначено для мультиплексного иммунохроматографического анализа широко распространенных патогенов картофеля вирусной (X, Y, S, M вирусы картофеля) и бактериальной (*Dickeya solani*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Clavibacter michiganensis*) природы в экстрактах листьев и клубней картофеля. Устройство представляет собой мультимембранный композит с предварительно нанесенными и высушенными иммунореагентами (тест-полоску), для проведения анализа не требуется дополнительного оборудования и времязатратных стадий. В состав мультимембранных композитов входят пористая нитроцеллюлозная мембрана с предварительно нанесенными иммунореагентами, закрепленная на твердой полистироловой основе, приклеенная стекловолоконная мембрана, содержащая смесь коньюгатов наночастиц золота с кроличьими поликлональными антителами к десяти

фитопатогенам вирусной и бактериальной природы, мембрана для впитывания и сепарации компонентов исследуемой пробы и конечной адсорбирующей мембраны для впитывания избытка пробы и поддержания миграции жидкости по тест-полоске за счет капиллярных сил. Отличительной особенностью заявленного устройства является комбинация мультиплексного иммунохроматографического анализа десяти фитопатогенов вирусной и бактериальной природы, и подхода для снижения предела обнаружения, основанного на восстановлении солей серебра на наночастицах золота, включенных в состав иммунных комплексов в тестовых зонах. Предложенный подход позволяет выявлять десять основных патогенов картофеля в рамках одного анализа в низких концентрациях, соответствующих латентным инфекциям. Для проведения анализа не требуется дорогостоящего стационарного оборудования, качественный анализ проводится визуально по наличию

R U 2 0 1 4 8 7

U 1 4 8 7 2 0 1 4 8 7 U 1

окрашенных точечных тестовых зон. Продолжительность анализа составляет 15 минут, включая стадии экстракции растительного материала, проведение анализа с использованием одной тест-полоски, добавления раствора, содержащего нитрат серебра и гидрохинон, для повышения интенсивности регистрируемого колориметрического сигнала. Технической задачей заявленной полезной модели является повышение интенсивности регистрируемого

окрашивания в анализе проб с низким содержанием антигенов за счет реакции восстановления нитрата серебра, катализируемой наночастицами золота в составе иммунных комплексов. Технический результат заявленной полезной модели заключается в снижении предела обнаружения иммунохроматографического анализа десяти основных фитопатогенов вирусной и бактериальной природы. 3 табл., 1 ил.

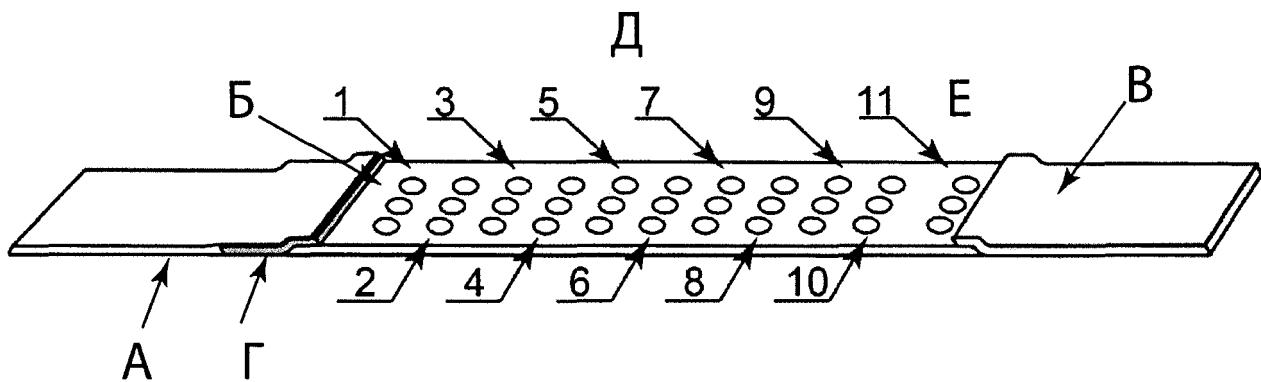


Схема мультиплексного иммунохроматографического анализа

Рис. 1

Полезная модель относится к мультиплексному иммунохроматографическому анализу широко распространенных патогенов картофеля вирусной (X, Y, S, M вирусы картофеля) и бактериальной (*Dickeya solani*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Clavibacter michiganensis*) природы, и может быть использована для

5 экспрессного и высокопроизводительного лабораторного и внелабораторного скрининга фитопатогенов в рамках фитосанитарного контроля специализированными службами, контроля зараженности посевного и сортового материала, мониторинга зараженности частными хозяйствами.

Патогены картофеля вирусной и бактериальной природы широко распространены 10 на территории Российской Федерации и часто встречаются в импортируемом материале. Заражение может происходить на всех стадиях выращивания, а также хранения картофеля. Заражение фитопатогенными микроорганизмами приводит к значительным 15 экономическим потерям (до 100% урожая), ухудшает хранимость, потребительские свойства (размер и форма клубня), пищевую ценность клубней. Заражение картофеля несколькими патогенами одновременно приводит к синергетическому эффекту - более 20 выраженным симптомам и увеличению потери урожая по сравнению с растениями, пораженными только одним видом патогена. Из-за отсутствия эффективных методов профилактики и лечения фитопатогенов в промышленных масштабах, своевременный контроль зараженности и отбраковка зараженного материала является единственным способом нивелирования негативных эффектов, вызванных поражением картофеля патогенами.

Детекция низких концентраций вирусов и бактерий, не вызывающих выраженных 25 симптомов (так называемая латентная инфекция), представляет особый интерес для практического использования. Использование посевного материала с латентной инфекцией приведет к накоплению патогена в процессе культивирования растения. Для 30 практических целей основной интерес представляют методы внелабораторной детекции фитопатогенов. Таким образом, разработка методов мультиплексной высокочувствительной детекции основных фитопатогенов вирусной и бактериальной природы актуальна и востребована для практического применения. Согласно 35 нормативной документации - ГОСТ 33996-2016 «Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества» - предел обнаружения для иммунохимических методов анализа составляет не менее 10^4 клеток/ см^3 для бактериальных и $10 \text{ нг}/\text{см}^3$ для вирусных фитопатогенов. Однако для диагностики латентных инфекций необходимо 40 достижение меньших пределов обнаружения. Предлагаемый в данной полезной модели мультиплексный иммунохроматографический анализ позволяет минимизировать время и трудозатраты по сравнению с моно-тестами при анализе большого количества проб, а за счет использования реакции восстановления солей серебра достигнуть пределов обнаружения, необходимых для диагностики латентных инфекций. Использование дополнительной стадии с реакцией восстановления серебра не приводит к существенному 45 увеличению времени и усложнению анализа. Простота подготовки проб, проведения анализа и интерпретации результатов позволяет использовать мультиплексный иммунохроматографический анализ неквалифицированными пользователями во внелабораторных условиях.

Для высокочувствительной детекции фитопатогенов в настоящее время широко 45 используются молекулярно-генетические (например, полимеразная цепная реакция) и иммунохимические (например, иммуноферментный анализ) методы анализа.

Молекулярно-генетические методы основаны на выявлении специфической последовательности нуклеиновой кислоты патогена. Молекулярно-генетические методы

характеризуются высокой специфичностью, низким пределом обнаружения и высокой достоверностью анализа. Однако основными факторами, ограничивающими применение данных методов для внелабораторной диагностики фитопатогенов являются особые требования к чистоте расходных материалов и помещений, наличие специальных навыков персонала для проведения анализа и интерпретации полученных результатов, использование дорогостоящего и стационарного оборудования. Таким образом, применение молекулярно-генетических методов остается ограниченным рамками лабораторного высокочувствительного анализа.

- Иммунохимические методы диагностики основаны на высокоспециальном взаимодействии антител с антигеном (патогеном) и последующей регистрацией иммунных комплексов. Иммунохимические методы диагностики широко используются как для лабораторного анализа фитопатогенов (иммуноферментный анализ), так и для внелабораторного определения (иммунохроматографический анализ). Достоинствами иммунохроматографического анализа являются простота подготовки проб и проведения анализа, малое время анализа и его низкая стоимость. Иммунохроматографический анализ является одностадийным методом и может выполняться без дополнительных стадий отмывок и инкубации. Благодаря простоте подготовки проб, проведения анализа и интерпретации результатов иммунохроматографический анализ может выполняться неподготовленным пользователем во внелабораторных условиях.
- Иммунохроматографический анализ позволяет проводить как качественный (наличие/отсутствие окрашенных зон.), так и количественный анализ (регистрация интенсивности колориметрического сигнала). Однако, несмотря на все преимущества иммунохроматографического анализа, недостаточно низкий предел обнаружения ограничивает его применение.

- Для снижения предела обнаружения иммунохроматографического анализа может быть использован подход, основанный на увеличении интенсивности регистрируемого колориметрического сигнала. Интенсивность регистрируемого колориметрического сигнала может быть увеличена за счет модификации оптических свойств наноразмерного маркера. Увеличение регистрируемой интенсивности окрашивания связано с формированием на тест-полоске частиц типа ядро@оболочка - Au@Ag при восстановлении солей серебра на затравочных наночастицах золота, выступающих в качестве катализатора в реакции восстановления серебра. Преимуществом данного подхода является его применимость для любых систем иммунохроматографического анализа, основанных на использовании наночастиц золота в качестве метки.
- Существенным ограничением данного подхода является быстрая скорость реакции восстановления солей серебра на наночастицах золота, что требует тщательного контроля за временем проведения реакции для своевременной визуальной детекции результатов на тест-полоске. Увеличение времени амплификации приводит к формированию неспецифичного фонового окрашивания. Нами разработан ряд решений, позволяющих останавливать реакцию восстановления солей серебра на тест-полоске, что позволяет проводить регистрацию интенсивности колориметрического сигнала по окончании анализа без временных ограничений. Совместное использование данных решений позволяет применять метод, основанный на восстановлении солей серебра, для снижения предела обнаружения иммунохроматографического анализа во внелабораторных условиях.

Мультиплексный иммунохроматографический анализ в точечном формате для детекции фитопатогенов семи патогенов вирусной и одного бактериальной природы был впервые реализован в работе Safenkova и соавт. (Multiarray on a test strip (MATS):

Rapid multiplex immunodetection of priority potato pathogens. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 408, No. 22, p. 6009-6017). Авторами представлена тест-полоска с нанесенным в виде точек массивом из тестовых зон с иммобилизованными антителами к вирусным и бактериальным патогенам картофеля, а также ряд контрольных зон для подтверждения валидности анализа. Смесь конъюгатов иммобилизирована в стекловолоконной мембране и вымывается при миграции анализируемой пробы. Реализованная тест-система основана на классическом формате иммунохроматографического анализа и включает в себя формирование «сэндвич» иммунных комплексов в тестовых зонах, что приводит к развитию окрашивания

10 Интенсивность окрашивания пропорциональна содержанию антигена в пробе. Достигнутые пределы обнаружения для некоторых патогенов (например, 1 нг/мл для X вируса картофеля) являются достаточно низкими для высокочувствительной диагностики. Однако пределы обнаружения ля ряда других патогенов (например, 100 и 300 нг/мл для S и A вирусов картофеля) ограничивают применение представленной

15 системы для выявления низких концентраций фитопатогенов, связанных с развитием латентных инфекций.

Недостатком указанной тест-системы является отсутствие возможности направленного действия на развитие оптического сигнала (окрашивания зон связывания). Поэтому существует потребность в преодолении указанных недостатков.

20 Технической задачей заявленной полезной модели является повышение интенсивности регистрируемого окрашивания массива точечных зон на тест-полоске за счет реакции восстановления солей серебра в присутствии гидрохинона, происходящей на поверхности нанодисперсных частиц золота, включенных в состав иммунных комплексов.

Технический результат заявленной полезной модели заключается в снижении пределов обнаружения десяти основных патогенов картофеля вирусной (X вирус картофеля, некротический штамм Y вируса картофеля, обыкновенный штамм Y вируса картофеля, S вирус картофеля M вирус картофеля, вирус скручивания листьев картофеля) и бактериальной (*Dickeya solani*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Clavibacter michiganensis*) за счет повышения интенсивности окрашивания тестовых зон, обусловленного формированием частиц Au@Ag, обладающих большим коэффициентом экстинкции, что позволяет регистрировать колориметрическую окраску от меньшего количества частиц по сравнению с нанодисперсным золотом.

Отличительной особенностью предлагаемой полезной модели является использование реакции восстановления солей серебра на поверхности наночастиц золота для снижения предела обнаружения мультиплексного иммунохроматографического анализа фитопатогенов вирусной и бактериальной природы. В основе анализа основан лежит миграция аликвоты жидкой пробы по тест-полоске. Миграция пробы происходит под действием капиллярных сил и не требует использования оборудования. При прохождении пробы через иммобилизованные на тест-полоске иммунные реагенты на разных участках мембранные происходит формирование специфических иммунных комплексов в тестовых зонах и связывания избытка свободных конъюгатов в контрольной зоне. Конъюгированные со специфическими антителами (десять поликлональных антител, специфичных к фитопатогенам вирусной и бактериальной природы) нанодисперсные частицы золота являются колориметрическим маркером, визуализирующими формирование иммунных комплексов в тестовых и контрольных зонах. Для снижения предела обнаружения по окончании анализа на тест-полоску наносится усиливающий раствор (20 мкл), состоящий из двух смешанных в равных объемах непосредственного перед использованием компонентов - 0,3% водного раствора

нитрата серебра и 3% гидрохинона в цитратном буфере ($\text{pH}=4,0$). Восстановление солей серебра под действием гидрохинона на затравочных наночастицах золота приводит к накоплению частиц ядро-оболочки Au@Ag , обладающих большим коэффициентом экстинкции, что позволяет достигнуть регистрируемого окрашивания на тест-полоске.

5 После двухминутной инкубации усиливающего раствора тест-полоску промывают водным раствором хлорида натрия (2 М). Хлорид ионы взаимодействуют с ионами серебра в составе усиливающего раствора с формированием нерастворимого хлорида серебра. Таким образом промывка тест-полоски раствором хлорида натрия останавливает реакция восстановления ионов серебра на тест-полоске.

10 Под действием каталитически-активных наночастиц Au@Pt происходит конверсия неокрашенного субстрата в нерастворимый продукт, накопление которого в тестовой и контрольной зонах существенно увеличивает интенсивность регистрируемого колориметрического сигнала. Использование иммунохроматографии для детекции фитопатогенных микроорганизмов обеспечивает достижение ряда преимуществ -

15 проведение эффективного параллельного скрининга большого количества проб во внелабораторных условиях, экспрессность проведения анализа (15-20 минут) при минимальной подготовке проб, простота детектирования и интерпретации результатов анализа. Предложенный подход является универсальным и может быть использован для снижения предела обнаружения любого формата иммунохроматографического

20 анализа, основанного на использовании наночастиц золота в качестве маркера. Предложенный способ остановки реакции восстановления серебра при добавлении хлорид-ионов, также является универсальным и расширяет возможности внелабораторного применения данного анализа.

Заявленная мультиплексная тест-система использует общий принцип

25 иммунохроматографического анализа, основанного на миграции компонентов пробы по пористой мемbrane, формировании специфических иммунных комплексов в различных частиц мембранны и детекции сформировавшихся комплексов. Тестовая зона представляет собой упорядоченный массив нанесенных в виде отдельных точек антител, специфичных к патогенам. Один ряд включает четыре тестовых зоны с антителами, 30 специфичными к одному патогену. Такая комплектация позволяет увеличить достоверность анализа по сравнению с классическим форматом анализа, поскольку колориметрический сигнал регистрируется не с одной окрашенной тестовой зоны-линии, а сразу с четырех точечных зон.

Предлагается устройство для иммунохроматографической внелабораторного

35 выявления основных патогенов картофеля вирусной и бактериальной природы в экстрактах листьев и клубней картофеля. Устройство состоит из нескольких соединенных между собой мембран и включает в себя нанесенные и высушенные иммунореагенты (тест-полоску). В состав тест-полоски входят рабочая нитроцеллюлозная мембрана с предварительно нанесенными в виде отдельных точечных зон с антителами тестовыми 40 и контрольными зонами, закрепленная на твердой полистироловой основе, стекловолоконная мембрана с нанесенной смесью десяти конъюгатов наночастиц золота со специфичными поликлональными антителами, мембрана для впитывания и сепарации компонентов исследуемой растительной пробы и конечной адсорбирующей мембраны для впитывания пробы и поддержания миграции жидкости по тест-полоске.

45 Указанный технический результат достигается тем, что:

- в контрольную зону (К.З.) нанесен иммуноглобулин-связывающий белок А;

- тестовая зона (Т. З.) представляет собой массив из отдельных точечных зон,

содержащих специфичные антитела к патогену. Одна тест-полоска включает в себя 40

тестовых зон, расположенных в виде массива из десяти рядов по четыре точки в ряду.

- на стекловолоконную мембрану нанесена смесь конъюгатов наночастиц золота с антителами, специфичными к патогенам вирусной (Х вирус картофеля, некротический штамм Y вируса картофеля, обыкновенный штамм Y вируса картофеля, S вирус

5 картофеля M вирус картофеля, вирус скручивания листьев картофеля) и бактериальной природы (*Dickeya solani*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Clavibacter michiganensis*)

- при погружении тест-полоски в анализируемую растительную пробы происходит миграция жидкости по тест-полоске под действием капиллярных сил. Про прохождении

10 пробы через стекловолоконную мембрану с высущенной смесью десяти конъюгатов наночастиц золота с антителами происходит их регидратация и формирование специфических двойных иммунных комплексов (антigen - антитела, иммобилизованные на наночастицах золота). При прохождении массива тестовых зон происходит формирование тройных иммунных комплексов (иммобилизованные на мемbrane

15 антитела - антigen - антитела, иммобилизованные на наночастицах золота), что приводит к накоплению наночастиц золота и развитию окраски. При отсутствии антигена в пробе конъюгаты наночастиц золота с антителами мигрируют мимо массива тестовых зон без формирования тройных иммунных комплексов. Не связавшиеся в тестовых зонах конъюгаты реагируют с иммобилизованным в контрольной зоне белком А. Развитие

20 окрашивания тестовых зон свидетельствует о присутствии антигена в пробе. Интенсивность окрашивания тем выше, чем больше концентрация антигена в пробе.

Для повышения интенсивности регистрируемого колориметрического сигнала при низких концентрациях антигена в пробе используется реакция восстановления солей

25 серебра в присутствии гидрохинона, протекающая на наночастицах золота, включенных в состав иммунных комплексов в массиве Т.З. и К.З. Для этого на тест-полоску наносится усиливающий раствор (20 мкл) содержащий смешанные в равных объемах растворы 0,3% нитрата серебра и 3% гидрохинона в цитратном буфере (pH=4,0). Усиливающий раствор инкубируется в течение двух минут. Для остановки реакции тест-полоску промывают раствором хлорида натрия (2 М). Формирование нерастворимого осадка

30 хлорида серебра удаляет из системы восстанавливающиеся на наночастицах золота ионы серебра. Формирование композитных частиц ядро@оболочка - Au@Ag приводит к существенному повышению интенсивности колориметрического сигнала и позволяет регистрировать окрашивание от меньшего количества частиц, включенных в состав иммунных комплексов.

35 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
Рабочая мембрана	6,0 x 26 мм	полимер нитроцеллюлоза	<ul style="list-style-type: none"> средний диаметр пор – 12 мкм; сорбционная емкость по белку – не менее 50 мг/см²; толщина – 100±15 мкм; скорость прохождения физиологического раствора через 4 см мембранны – 170±25 с;
Конечная адсорбирующая мембрана	6,0 x 27 мм	целлюлоза	<ul style="list-style-type: none"> цвет – белый; толщина – 280-480 мкм; адсорбционная емкость – 8,5-15,5 мг/см²; средний объем удержания воды – 37-47 мг/см²;
Мембрана для нанесения конъюгата антител с нанодисперсным маркером	6,0 x 6 мм	стеклянное микроволокно;	<ul style="list-style-type: none"> ширина – 6 мм; толщина – 400 мкм; адсорбционная емкость – 9,8 мг/см²; скорость прохождения воды через 4 см мембранны – 24 с;
Мембрана для впитывания и сепарации образца	6,0 x 27 мм	целлюлоза	<ul style="list-style-type: none"> цвет – белый; толщина – 280-380 мкм;
			<ul style="list-style-type: none"> адсорбционная емкость – 10,5-15,5 мг/см²; средний объем удержания воды – 30-40 мг/см²;

Анализ проводят следующим образом:

1. 100 мкл анализируемого растительного экстракта (экстракт листьев или клубней картофеля) вносят в пластиковую пробирку (вместимость 1-1,5 мл) или в лунку полистиролового планшета (вместимость 300 мкл)

2. Тест-полоску погружают вертикально нижним концом мембранны для впитывания образца в анализируемый экстракт и выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин.

3. Вынимают тест-полоску и помещают ее на сухую горизонтальную поверхность. Результат фиксируют визуально или с использованием детектора с видео-цифровой регистрацией.

4. Добавляют 20 мкл усиливающего раствора, состоящего из равных объемов 0,3% нитрата серебра и 3% гидрохинона в цитратном буфере (pH=4,0), смешанных непосредственно перед добавлением на тест-полоску, и выдерживают в течение двух минут. Результат фиксируют визуально или с использованием детектора с видео-цифровой регистрацией

Заявляемое устройство функционирует следующим образом (см. рис. 1). Если в образце присутствуют контролируемые патогены вирусной и бактериальной природы, то под действием капиллярных сил они с потоком жидкости перемещаются по

впитывающей мембране, доходят до стекловолоконной мембранны и вступают в высокоспецифичную реакцию с поликлональными антителами на поверхности конъюгатов наночастиц золота с образованием двойных иммунных комплексов (антigen - антитела, иммобилизованные на поверхности наночастиц золота). Образовавшиеся 5 двойные иммунные комплексы под действием капиллярных сил движутся вдоль рабочей нитроцеллюлозной мембранны и взаимодействуют с иммобилизованными в виде упорядоченного в Т.З. массива антител с образованием тройных комплексов (иммобилизованные на мембране в Т.З. антитела - антиген - антитела, иммобилизованные на наночастицах золота). Избыток не связавшихся в Т.З. конъюгатов 10 продолжает двигаться вдоль рабочей нитроцеллюлозной мембранны и взаимодействует с белком А, иммобилизованными в К.З., с образованием двойных комплексов.

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

1. Если через 10 мин на рабочей мембране тест-полоски не происходит развитие 15 колориметрического сигнала в К.З., наблюдается окрашивание только рядов в массиве Т.З. или окрашивание не всех точек в ряду массива Т.З., то результат анализа считается недействительным. В таком случае необходимо повторное тестирование с использованием новой тест-полоски.

2. Если через 10 мин на рабочей мембране тест-полоски появляются окрашенные 20 ряды в массиве Т.З. и окрашенная К.З., то результат анализа считается положительным, т.е. в растительной пробе присутствуют антигены. Для определения природы антигена пользователь определяет положение окрашенного ряда в массиве Т.З.

3. Если через 10 мин на рабочей мембране тест-полоски появляется одна окрашенная 25 К.З. при этом окрашивание массива Т.З. не наблюдается, то результат анализа считается или отрицательным, т.е. в растительной пробе не содержится определяемых антигенов, или их количество оказывается меньше предела обнаружения ИХА. В таком случае проводится дополнительная стадия усиления сигнала. Для этого на тест-полоску добавляют 20 мкл усиливающего раствора, после двухминутной инкубации тест-полоска промывается 2М раствором хлорида натрия. Наличие темноокрашенных рядов в 30 массиве Т.З. свидетельствует о присутствии антигена в анализируемой пробе, отсутствие окрашенных рядов в массиве Т.З. и наличие окрашенной К.З. свидетельствует об отсутствии антигенов в анализируемой пробе. Для определения природы антигена пользователь определяет положение окрашенного ряда в массиве Т.З.

Эффективность данного подхода подтверждается следующими примерами:

35 Пример 1 (мультиплексный иммунохроматографический анализ фитопатогенов вирусной и бактериальной природы без проведения дополнительной стадии амплификации сигнала)

Для определения пределов обнаружения тест-системы проводили анализ 40 искусственно-контаминированных экстрактов с известной концентрацией добавленных патогенов. В качестве отрицательного контроля использовали экстракт здоровых клубней картофеля. Анализ проводили в трех повторностях с использованием тест-систем из различных партий. Тест-полоску погружали в анализируемую пробу (100 мкл), выдерживали в течение 10 минут, после его размещали тест-полоску на горизонтальной поверхности и фиксировали результаты анализа.

45 Пределом обнаружения считали концентрацию антигена, обеспечивающую колориметрический сигнал в Т.З. превосходящий сумму среднего значения колориметрического сигнала и трех стандартных отклонений для отрицательной пробы (здоровый экстракт). Для ИХА без амплификации сигнала сумма среднего значения

колориметрического сигнала и трех стандартных отклонений для отрицательной пробы была равна 0,5. Стандартное отклонение среднего значения колориметрического сигнала, определенное для двенадцати точек, не превышало 30% (табл. 2).

Достигнутые пределы обнаружения (ХВК, МВК, СВК, некротический штамм YВК, вирус скручивания листьев картофеля - 32 нг/мл, обыкновенный штамм Y вируса картофеля - 64 нг/мл. *P. carotovorum*, *D. solani* - 10^6 клеток/мл, *P. atrosepticum*, *C. michiganensis* - 10^4 клеток/мл) являются недостаточными для выявления латентных инфекций.

Пример 2 (мультиплексный иммунохроматографический анализ фитопатогенов вирусной и бактериальной природы с дополнительной стадии амплификации сигнала)

Для определения пределов обнаружения мультиплексной иммунохроматографической тест-системы проводили анализ искусственно-контаминированных экстрактов с известной концентрацией добавленных патогенов. В качестве отрицательного контроля использовали экстракт здоровых клубней картофеля. Анализ проводили в трех повторностях с использованием тест-систем из различных партий. Тест-полоску погружали в анализируемую пробу (100 мкл), выдерживали в течение 10 минут. Тест-полоску размещали на горизонтальной поверхности, после чего добавляли 20 мкл свежеприготовленного усиливающего раствора. Усиливающий раствор состоял из смешанных в равных объемах 3% водного раствора нитрата серебра и 3% гидрохинона в цитратном буфере ($\text{pH}=4,0$). Спустя две минуты тест-полоски промывали 2 М хлоридом натрия и регистрировали интенсивность окрашивания Т.З. и К.З.

Пределом обнаружения ИХА считали концентрацию антигена, обеспечивающую 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 1,2. Стандартное отклонение среднего значения колориметрического сигнала, определенное для двенадцати точек, не превышало 30% (табл. 3).

Достигнутые пределы обнаружения (ХВК, ВСЛК - 2 нг/мл, МВК, СВК, некротический штамм YВК - 4 нг/мл, обыкновенный штамм Y вируса картофеля - 8 нг/мл. *P. carotovorum*, *D. solani* - 10^5 клеток/мл, *P. atrosepticum*, *C. michiganensis* - 10^3 клеток/мл) позволяют проводить высокочувствительную диагностику фитопатогенов во внелабораторных условиях.

Таблица 2

Средние значения колориметрического сигнала в массиве из Т.3. после анализа искусственно-контаминированных проб без проведения стадии амплификации сигнала

Патоген	Концентрация нг/мл					Концентрация, клеток/мл			
	500	250	125	64	32	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
XBK	9,2±1,6	4,8±0,2	3,0±0,4	2,2±0,2	1,7±0,2	-	-	-	-
MBK	5,9±0,4	3,1±0,1	2,7±0,2	2,2±0,4	1,3±0,2	-	-	-	-
SBK	6,3±0,1	3,8±0,5	2,8±0,3	2,5±0,2	1,1±0,1	-	-	-	-
Вирус скручивания листьев картофеля	4,7±0,1	2,5±0,2	2,1±0,2	1,3±0,3	0,7±0,2	-	-	-	-
Обыкновенный штамм YBK	4,5±0,2	2,1±0,3	1,3±0,2	0,8±0,2	-	-	-	-	-
Некротический штамм YBK	5,2±0,3	2,8±0,3	2,2±0,2	1,5±0,1	0,9±0,2	-	-	-	-
<i>P. carotovorum</i>	-	-	-	-	-	2,4±0,3	0,7±0,2	-	-
<i>P. atrosepticum</i>	-	-	-	-	-	6,8±0,4	5,7±0,2	2,4±0,4	1,1±0,3
<i>C. michiganensis</i>	-	-	-	-	-	22,4±1,2	13,5±2,3	4,2±0,5	1,5±0,1
<i>D. solani</i>	-	-	-	-	-	3,2±0,4	1,1±0,3	-	-

Таблица 3

Средние значения колориметрического сигнала в массиве из Т.3. после анализа искусственно-контаминированных проб с проведением стадии амплификации сигнала

Патоген	Концентрация нг/мл								Концентрация, клеток/мл					
	500	250	125	64	32	16	8	4	2	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³
XBK	23,4±1,0	23,8±3,0	21,7±1,4	12,5±2,2	9,0±1,1	7,3±0,9	6,4±0,7	3,9±0,3	2,3±0,4	-	-	-	-	-
MBK	17,6±2,2	13,1±1,3	9,4±1,2	8,3±0,8	4,3±0,2	4,1±0,5	3,7±0,1	1,9±0,3	-	-	-	-	-	-
SBK	17,7±1,4	14,5±0,2	12,1±0,4	9,2±1,3	7,1±0,4	5,3±0,5	3,7±0,4	2,1±0,2	-	-	-	-	-	-
Вирус скручивания листьев картофеля	23,7±0,9	17,4±3,3	12,4±1,3	8,3±1,0	6,1±1,2	4,0±0,9	3,7±0,2	3,0±0,4	2,4±0,5	-	-	-	-	-
Обыкновенный штамм YBK	12,4±0,9	19,3±1,1	8,4±0,5	4,8±0,2	2,9±0,4	2,5±0,3	1,9±0,3	-	--	-	-	-	-	-
Некротический штамм YBK	14,5±0,9	13,9±2,5	10,2±1,2	7,5±0,6	4,9±0,4	3,5±0,3	3,0±0,6	2,2±0,4	-	-	-	-	-	-
<i>P. carotovorum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,4±1,3	4,0±0,5	2,1±0,4	-	-
<i>P. atrosepticum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23,7±2,1	21,0±2,5	11,2±1,4	4,1±0,3	4,4±1,0
<i>C. michiganensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	51,6±4,2	47,5±3,3	26,2±2,5	7,1±0,6	3,9±0,8
<i>D. solani</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,7±1,1	7,3±0,5	3,1±0,9-	-	-

Краткое описание чертежей

На рис. 1 представлена схема мультиплексного иммунохроматографического анализа.

А - мембрана для впитывания и сепарации исследуемого образца, Б - рабочая нитроцеллюлозная мембрана с нанесенными и высушеными иммунореагентами, В - конечная адсорбирующая мембрана для впитывания компонентов образца после прохождения реакции, Г - стекловолоконная мембрана с нанесенной и высушенной смесью коньюгатов антител с наночастицами золота, Д - массив из точечных тестовых зон с нанесенными поликлональными кроличьими антителами, специфичными: 1 - ВСЛК; 2 - некротический штамм Y вируса картофеля; 3 - обыкновенный штамм Y вируса картофеля; 4 - SBK; 5 - MBK; 6 - XBK; 7 - *D. solani*; 8 - *C. michiganensis*; 9 - *P. carotovorum*; 10 - *P. atrosepticum*; Е - К.З. с нанесенным иммуноглобулин-связывающим белком А. 11 - белок А (контрольная зона).

40

(57) Формула полезной модели

Устройство для мультиплексного иммунохроматографического внелабораторного анализа патогенов картофеля вирусной природы, таких как X вирус картофеля, некротический штамм Y вируса картофеля, обыкновенный штамм Y вируса картофеля,

45 S вирус картофеля, M вирус картофеля, вирус скручивания листьев картофеля, и бактериальной природы, таких как *Dickeya solani*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Clavibacter michiganensis*, включающее тест-полоску, состоящую из полистироловой подложки, на которую закреплены нитроцеллюлозная

мембрана с предварительно нанесенными и высушенными иммунореагентами, стекловолоконная мембрана с нанесенной и высушенной смесью конъюгатов десяти поликлональных антител с наночастицами золота, мембрана для впитывания и сепарации неспецифических компонентов исследуемого растительного экстракта и конечная

5 адсорбирующая мембрана для впитывания компонентов пробы после прохождения реакции и поддержания потока мигрирующей пробы по тест-полоске, где на нитроцеллюлозную мембрану нанесены контрольная и тестовые зоны, в контрольную зону иммобилизован иммуноглобулинсвязывающий белок А, специфично связывающий антитела, адсорбированные на наночастицах золота, тестовая зона представляет собой

10 массив из тридцати пространственно-разнесенных и упорядоченных точек, включающий десять рядов, каждый из рядов состоит из трех зон, в виде точек, нанесения поликлональных антител одной специфичности, на стекловолоконную мембрану нанесена смесь десяти конъюгатов поликлональных кроличьих антител, специфичным к указанным патогенам вирусной и бактериальной природы, с наночастицами золота,

15 формирующих в результате миграции анализируемой пробы в тестовых зонах тройные иммунные комплексы, такие как антитела в тестовой зоне - патоген - конъюгат антител с наночастицами золота, что приводят к окрашиванию тестовых зон, где наличие окрашивания трех зон в одном ряду свидетельствует о присутствии антигена в пробе, а интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации антигена в пробе, при

20 этом тестовая полоска выполнена с возможностью внесения на нее смеси из двух смешенных в равных объемах компонентов, таких как 0,3 % водного раствора нитрата серебра и 3% гидрохинона в цитратном буфере с pH=4,0 для увеличения интенсивности окрашивания тестовых зон за счет восстановления нитрата серебра на поверхности наночастиц и формирования высококонтрастных частиц, состоящих из ядра,

25 представляющего собой наночастицу золота, и серебряной оболочки.

30

35

40

45

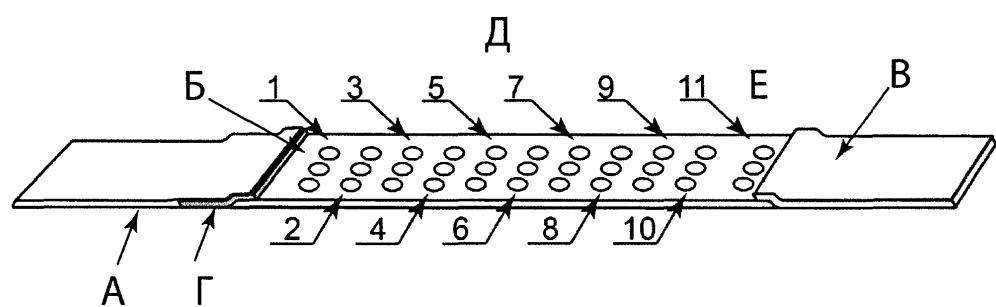


Рис. 1. Схема мультиплексного иммунохроматографического анализа