

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-62

**ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБОВ УВЕЛИЧЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ СИГНАЛА
ОСНОВНЫХ ТИПОВ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК В ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ
ТЕСТ-СИСТЕМАХ НА ОСНОВЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ***

**INVESTIGATION OF WAYS TO INCREASE THE SIGNAL INTENSITY OF THE MAIN TYPES OF
CONTROL POINTS IN IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEMS BASED ON NUCLEIC ACIDS**

Е. А. Горбунова, А. В. Епанчинцева

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

E. A. Gorbunova, A. V. Epanchintseva

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ gorbunova-ekaterina@inbox.ru

Аннотация

Рассмотрены основные типы описанных в литературе контрольных точек в проточных тест-системах на основе нуклеиновых кислот: на контрольной точке иммобилизованы стрептавидин (1), ДНК с гетеро- (2) и гомопоследовательностями (3). Показано, что помимо Уотсон — Криковских взаимодействий, а также взаимодействий биотин — стрептавидин реализуются иные типы взаимодействий, которые вносят высокий негативный вклад в специфичность тестирования.

Abstract

The main types of control points described in the literature in flow test systems based on nucleic acids are considered: streptavidin (1), DNA with hetero- (2) and homo-sequences (3) are immobilised on the control point. It was shown that in addition to Watson-Crick interactions and biotin — streptavidin interactions, other types of interactions are realised, which make a high negative contribution to test specificity.

Типичная иммунохроматографическая тест-система состоит из трех основных частей: подложка для образца, детектирующая мембрана и адсорбирующая подложка. Мы проверили разные материалы для каждой из перечисленных частей тест-полоски.

Наилучшие результаты продемонстрировали: целлюлозное волокно толщиной 0,825 мм в качестве адсорбирующей подложки, нитроцеллюлозные мембраны (НЦМ) с размерами пор 5 и 8 мкм и подложка для образца из стекловолокна.

Тестирование выполняется путем нанесения анализируемого раствора на подложку для образца, раствор движется под действием капиллярных сил через поры мембраны, далее в течение 10–20 мин определяется положительный или отрицательный результат теста с соответствующим визуальным проявлением тестовой полосы (точки) и контрольной полосы (точки; проявляется как в присутствии, так и в отсутствие целевой мишени). Для визуализации полос чаще всего используются наночастицы золота (НЧЗ) благодаря их химической инертности, высокому молярному коэффициенту поглощения, обеспечивающему окрашивание полосы в красный цвет, а также возможностью модификации их поверхности, в частности ДНК-зондами.

Целью работы было исследование способов увеличения интенсивности сигнала основных типов контрольных точек в тест-системах на основе нуклеиновых кислот. Для этого были сконструированы три варианта ДНК-зондов обнаружения: биотинилированный ДНК-зонд, ДНК-зонд с гетеропоследовательностью, ДНК-зонд с гомопоследовательностью. Зонды адсорбировались на НЧЗ за счет флуоресцеина (FAM), который, как было показано ранее, служит якорем адсорбции на НЧЗ [1].

В первом типе тест-полосок на контрольную полосу был иммобилизован стрептавидин. Конъюгат НЧЗ с олигонуклеотидом 5'-FAM-T₂₀-биотин-3' формирует яркую красную контрольную точку на НЦМ, однако интенсивность контрольной точки определяется не только образованием комплекса биотин — стрептавидин, но и взаимодействием непокрытых участков поверхности НЧЗ в составе данного конъюгата со стрептавидином. Инкубация конъюгата НЧЗ- FAM-T₂₀-биотин в растворе бычьего сывороточного альбумина позволяет снизить неспецифические взаимодействия.

* Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ (№ 23-24-00505).

© Е. А. Горбунова, А. В. Епанчинцева, 2024

В следующем типе тест-полосок, с ДНК-зондом захвата на контрольной точке, окрашивание контрольной точки осуществляется за счет взаимодействия комплементарных нуклеиновых кислот на НЧЗ и НЦМ. В качестве промывочного раствора используется цитратно-солевой буфер, содержащий $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ и NaCl . Показано, что поверхность НЧЗ неспецифически взаимодействует со стрептавидином на НЦМ, при этом в присутствии поверхностно-активных веществ на НЦМ эти взаимодействия усиливаются.

Основной причиной неэффективного взаимодействия комплементарных ДНК-зондов на НЧЗ и НЦМ с низкой интенсивностью окрашивания контрольной точки, вероятно, является электростатическое отталкивание. Однако если промывочный раствор, помимо $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ и NaCl , содержит MgCl_2 , то наблюдается значительное усиление интенсивности окрашивания контрольной точки, по-видимому, из-за более эффективного формирования ДНК дуплекса на ней.

В случае взаимодействия гомопоследовательностей T_{26} на НЧЗ и $5'$ - A_{26} -биотин- $3'$ на НЦМ была показана высокая специфичность анализа при использовании цитратно-солевого буфера. Вероятно, это связано с возможностью реализации большего числа двуцепочечных состояний на контрольной линии, а также с низкой вероятностью формирования стабильных вторичных структур у A_{26} и T_{26} . В то же время при добавлении в промывочный раствор MgCl_2 интенсивность окрашивания контрольной точки снижается.

Литература

1. Epanchintseva A. V., Gorbunova E. A., Ryabchikova et al. Effect of Fluorescent Labels on DNA Affinity for Gold Nanoparticles // *Nanomaterials*. 2021. Vol. 11 (5). P. 1178.