

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ»

ИНСТИТУТА БИОХИМИИ ИМ. А.Н. БАХА ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ
БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» (ФИЦ
БИОТЕХНОЛОГИИ РАН).

На правах рукописи

Разо Шиатеса

**РАЗРАБОТКА НОВЫХ СИСТЕМ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ
ДИАГНОСТИКИ ФИТОПАТОГЕНОВ НА ОСНОВЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ
ФОРМИРОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ АНТИТЕЛ И НАНОЧАСТИЦ**

Специальности

4.1.3 Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений
1.5.6 Биотехнология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

Пакина Елена Николаевна доктор
сельскохозяйственных наук, доцент

Сафенкова Ирина Викторовна
кандидат биологических наук,
с.н.с.

Москва - 2022

Оглавление

Введение	5
Глава 1. Обзор литературы	10
1.1. Фитопатогены и их характеристики	10
1.1.1. Бактерии	10
1.1.2. Вирусы	17
1.2. Методы детекции фитопатогенов	20
1.2.1. Молекулярно-генетические методы	20
1.2.2. Иммунохимические методы	23
1.3. Конъюгаты нанодисперсных маркеров с антителами	31
1.3.1. Конъюгаты с магнитными частицами	31
1.3.2. Конъюгаты с наночастицами золота	32
1.3.3. Конъюгаты с наночастицами Au-Pt (нанозим)	32
1.4. Системы усиления в ИХА	33
1.4.1. Иммуномагнитное концентрирование	33
1.4.2. Применение системы биотин – стрептавидин	33
1.4.3. Ферментативное усиление сигнала	34
1.4.4. Восстановление солей серебра, катализируемое наночастицами золота	34
1.4.5. Использование каталитических свойств Pt-содержащего нанозима	35
Глава 2. Материалы и методы	37
2.1. Материалы	37
2.1.1. Антитела	37
2.1.2. Бактериальные изоляты	37
2.1.3. Вирусы	38
2.1.4. Реагенты	38
2.2. Методы	39
2.2.1. Получение антисыворотки и выделение антител	39
2.2.2. Биотинилирование антител	40

2.2.3. Определение концентраций антител и биотинилированных антител	40
2.2.4. Синтез наночастиц золота (НЧЗ)	41
2.2.5. Синтез наночастиц Au-Pt	41
2.2.6. Синтез конъюгатов	41
2.2.7. Методы характеристики наночастиц и конъюгатов	44
2.2.8. Метод поверхностного плазмонного резонанса	45
2.2.9. Иммуноферментный анализ	46
2.2.10. Приготовление тест-полосок для ИХА	47
2.2.11. Подготовка растительных экстрактов	49
2.2.12. Стандартный ИХА без усиления	49
2.2.13. ИХА с модификациями для снижения предела определения	50
Глава 3. Результаты и обсуждение	53
3.1. Получение и характеристика сывороток	53
3.2. Характеристика моноклональных антител, специфичных к ХВК, методом непрямого ИФА	55
3.3. Характеристики поликлональных антител, специфичных к фитопатогенам	57
3.4. Характеристика взаимодействия антител и антигенов методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР)	60
3.5. Синтез и характеристика наночастиц	61
3.6. Синтез конъюгатов наночастиц с биомолекулами	64
3.6.1. Характеристика конъюгатов МЧ – биотинилированные антитела и НЧЗ-стрептавидин методом ПЭМ	65
3.6.2. Функциональная характеристика конъюгатов НЧЗ–антитела	66
3.7. Разработка тест-систем для детекции фитопатогенов	67
3.7.1. Разработка сэндвич формат ИХА для детекции <i>Dickeya</i> spp.	68
3.7.2. Разработка ИХА для детекции <i>Erwinia amylovora</i>	72
3.7.3. Разработка ИХА с предварительным смешиванием	

для детекции YBK	80
3.7.4. Разработка сэндвич ИХА ХВК с двойным усилением	84
3.7.5. Разработка сэндвич ИХА <i>R. solanacearum</i> с усилением, основанным на увеличении размера маркера после анализа	90
3.7.6. Разработка сэндвич ИХА <i>E. amylovora</i> с Au-Pt-нанозимным усилением	96
Заключение	100
Список сокращений и условных обозначений	101
Список литературы	103
Приложения	124

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Выращивание сельскохозяйственных растений сопряжено с высокими рисками бактериального и вирусного инфицирования. Пораженность патогенами, начиная с семенного материала, значительно снижает качество возделываемой продукции. Возбудители накапливаются в латентной форме в течение нескольких поколений, что вызывает последующие серьезные потери урожая. В частности, болезни картофеля уносят ежегодно от 10 до 25% урожая, а в годы эпифитотий потери урожая могут достигать 80%. Одним из основных направлений защиты растений является постоянный контроль и диагностика инфекций на разных стадиях выращивания культур. В соответствии с этим приоритетная задача борьбы с экономически значимыми фитопатогенами состоит в массовой диагностике с использованием инструментов, обладающих высокой специфичностью и чувствительностью и пригодных к применению как в лабораториях, так и во внелабораторных условиях. Иммунохроматографические тест-системы удовлетворяют перечисленным выше требованиям. Однако чувствительность иммунохроматографического анализа (ИХА) часто недостаточна для выявления инфекций на ранних этапах заражения. В связи с этим востребовано повышение чувствительности иммунохроматографического определения фитопатогенов.

Объектами исследования выбраны экономически значимые фитопатогены вирусной (Х-вирус картофеля (ХВК), Y-вирус картофеля (YBK)) и бактериальной (возбудители черной ножки картофеля (*Dickeya* spp.), бактериального ожога (*Erwinia amylovora*) и бурой гнили картофеля (*Ralstonia solanacearum*)) природы – приоритетные возбудители болезней растений семейств Solanaceae и Rosaceae. Высокочувствительные системы для определения перечисленных выше фитопатогенов позволят эффективно контролировать качество посадочного материала, а также своевременно выявлять возникновение инфекционных очагов.

Степень разработанности темы. Востребованность иммунохроматографических тест-систем как средств диагностики болезней растений вирусной и бактериальной этиологии определяется их методической простотой, экспрессностью, специфичностью, отсутствием необходимости в оборудовании и высококвалифицированных специалистах для проведения анализа. Для большинства фитопатогенов разработаны и доступны коммерческие тест-полоски. Однако важной задачей остается разработка новых тест-систем для повышения чувствительности анализа и выявления латентных инфекций.

Цель и задачи работы. Цель работы – разработка новых иммунохроматографических систем для детекции фитопатогенов в низких концентрациях.

Достижение поставленной цели включало решение нескольких задач:

1. Получение поликлональных антител, специфичных к выбранным фитопатогенам;
2. Характеристика специфичных антител;
3. Синтез и характеристика наночастиц;
4. Изучение формирования комплексов наночастиц с антителами и синтез конъюгатов антител, специфичных к фитопатогенам;
5. Разработка иммунохроматографических тест-систем для детекции фитопатогенов вирусной и бактериальной природы;
6. Апробация разработанных тест-систем.

Научная новизна. Показано, что предварительное формирование комплексов вирусов с конъюгатом (антитела – наночастица золота) приводит к снижению предела обнаружения иммунохроматографической тест-системы в сэндвич формате.

Определены условия (схема введения и соотношения конъюгатов), при которых формирование комплексов конъюгатов наночастиц золота и магнитных

частиц вызывает снижение предела обнаружения иммунохроматографического анализа.

Разработана иммунохроматографическая система для детекции *Ralstonia solanacearum*, высокая чувствительность которой обеспечивается благодаря увеличению размера маркера после формирования иммунных комплексов на тест-полоске.

Разработана высокочувствительная иммунохроматографическая система для детекции *Erwinia amylovora* с использованием в качестве метки биметаллических наночастиц (Au-Pt), обладающих каталитическими пероксидазо-подобными свойствами.

Показано, что использование нескольких проб от одного растения значительно увеличивает достоверность иммунохроматографического анализа.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработаны и апробированы иммунохроматографические тест-системы для детекции трех бактериальных фитопатогенов – возбудителей экономически значимых заболеваний: черной ножки картофеля, бурой гнили картофеля и бактериального ожога плодовых культур. Разработаны и апробированы иммунохроматографические тест-системы для высокочувствительной детекции X- и Y- вирусов картофеля. Подходы, предложенные для разработки высокочувствительных тест-систем, могут быть использованы для других фитопатогенов. Проведенная апробация тест-систем свидетельствует об их эффективности для внелабораторного скрининга и выявления латентных инфекций.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Условия получения поликлональных антител, специфичных к фитопатогенам.
2. Закономерности формирования иммунных комплексов с участием конъюгатов магнитных и золотых наночастиц в условиях иммунохроматографии.

3. Способы снижения пределов обнаружения иммунохроматографических тест-систем для детекции вирусных и бактериальных фитопатогенов.

4. Условия пробоотбора для иммунохроматографического анализа, повышающие достоверность выявления фитопатогенов.

Апробация результатов работы. Результаты диссертационной работы были представлены на следующих мероприятиях: международная конференция «Biocatalysis: Fundamentals and Applications» (25-30 июня 2017 г., Московская обл.); Третий съезд аналитиков России (8-13 октября 2017 г., Москва); научно-практическая конференция «Инновационные процессы в сельском хозяйстве» (25-27 апреля 2019 г., Москва); международная конференция «16th International Symposium on Soil and Plant Analysis» (17-20 июня 2019 г., Вагенинген, Нидерланды); международная конференция «44th FEBS Congress» (6-11 июля 2019, Краков, Польша); IV Всероссийский Съезд по защите растений «Фитосанитарные технологии в обеспечении независимости и конкурентоспособности АПК России» (9-11 сентября 2019 г., Санкт-Петербург); международная конференция «Mendeleev 2019 – XI International Conference on Chemistry for Young Scientists» (9-13 сентября 2019 г., Санкт-Петербург); международная конференция IUBMB «International Union of Biochemistry and Molecular Biology» Education Conference 2019 and 46th PSBMB «Philippine Society of Biochemistry and Molecular Biology» Annual Convention (13-15 ноября 2019 г., Манила, Филиппины); Первая Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Геномика и современные биотехнологии в размножении, селекции и сохранении растений» (27-31 октября 2020 г., Ялта); IV Международная научно-практическая конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (MOSM 2020) (16-20 ноября 2020 г., Екатеринбург); XVI Международная научно-практическая конференция «Аграрная наука – сельскому хозяйству» (9-10 февраля 2021 г., Барнаул).

Публикации. По результатам диссертационного исследования опубликовано 17 работ, из них 4 статьи в научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, 2 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК, и 11 тезисов конференций.

Личный вклад автора заключается в проведении экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных, подготовке материалов научных публикаций и написании диссертационной работы.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 150 страницах; состоит из введения, основной части, содержащей 42 рисунка, 6 таблиц, заключения, списка литературы, включающего 195 источников, и приложения.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Фитопатогены и их характеристики

Фитопатогены приводят к значительному снижению урожая и экономическим потерям. При поражении сельскохозяйственных культур вирусными и бактериальными фитопатогенами потери могут составлять от 10 до 25% в зависимости от специфики региона, особенностей окружающей среды и прочих факторов, влияющих на развитие инфекции; при возникновении эпифитотий потери достигают 80% [1].

В ряд наиболее значимых для Российской Федерации фитопатогенов входят выбранные для настоящей работы объекты: ХВК, УВК, *E. amylovora* (возбудитель бактериального ожога), *R. solanacearum* (возбудитель бурой гнили картофеля) и *Dickeya* spp. (возбудитель черной ножки). Ниже представлена характеристика каждого из выбранных фитопатогенов.

1.1.1. Бактерии

Dickeya spp (возбудитель черной ножки и мягкой гнили клубней)

Виды *Dickeya* представляют собой грамотрицательные палочковидные бактерии. На сегодняшний день род *Dickeya* включает 10 видов [2]. *Dickeya* spp. поражает широкий спектр растений-хозяев, в частности, банан, кукурузу, картофель и помидоры [3].

Фитопатогенная энтеробактерия *Dickeya* spp. распространена во многих странах [4] и является возбудителем черной ножки картофеля – одного из опаснейших и агрессивно развивающихся заболеваний картофеля [5]. Данная болезнь может приводить к задержке роста, увяданию, хлорозу листьев, некрозу нескольких тканей, снижению урожайности, а иногда и к гибели растений [6]. Существует несколько факторов, которые вызывают рост распространенности болезней картофеля данной этиологии [7-9]. Прежде всего это климатический

фактор – повышение температуры как следствие глобального потепления положительно влияет на рост и развитие бактерий *Dickeya* spp. Вторым фактором является популяционная устойчивость бактерий *Dickeya* spp. относительно других видов патогенов. Часто выявляются смешанные инфекции, включающие *Dickeya* spp. как один из компонентов комплексного бактериоза. И третий важнейший фактор – способность бактерий *Dickeya* spp. долгое время находиться в виде латентной инфекции, проявляясь лишь в определенных условиях. Скрытое инфицирование семенного картофеля является частой причиной распространения черной ножки во всем мире [4].

С 1992 г. в некоторых странах Европы была зафиксирована заболеваемость черной ножкой картофеля на уровне 25%. На территории РФ заболевание обнаружено сравнительно недавно – первые упоминания относятся к 2009 г. [10], однако уже к 2013 г. на *Dickeya* spp. приходилось до 28% зараженного семенного материала при ПЦР-тестировании [11] и до 24% – при скрининге иммуноферментными системами [12]. С течением времени зараженность семенных клубней некоторых сортов и картофеля значительно увеличилась [4].

Dickeya spp. распространяется на большие расстояния и через национальные границы в зараженном посадочном растительном материале. Основной вклад в распространение бактериальных патогенов картофеля вносят перемещения латентно инфицированных семенных клубней [13-15]. Фитопатоген может переноситься на поверхности клубня и в глазках и обнаруживаться в сосудистой системе клубня, в которую он попадает системно – через столон инфицированного растения или через корневую инфекцию.

Симптомы мягкой гнили на клубнях картофеля, описанные в работе [16], по-видимому, схожи независимо от того, вызваны ли они *Dickeya* или *Pectobacterium* spp. Выраженность заболевания варьирует от легкого обесцвечивания сосудов до полного разложения. Пораженная ткань клубня имеет цвет от кремового до коричневого, по структуре мягкая и зернистая. На краях разложившихся тканей

часто появляется пигментация – от коричневой до черной. Поражение обычно сначала развивается в глазках, в местах прикрепления столонов или в ранах.

Симптоматические изменения листвы, традиционно связанные с *D. dianthicola*, возникают в теплых и засушливых условиях выращивания [14, 17]. Первый симптом – увядание верхних листьев с усыханием сначала краев, а затем и всего листа. Увядание проявляется на нижних листьях, а в крайних случаях высыхает все растение или стебель. Часто поражается только один стебель растения. Развитие симптомов обычно сопровождается мягким гниением материнского клубня, но симптомы мягкой гнили не всегда распространяются вверх по столону или стеблю, как это происходит в случае черной ножки, вызванной *P. atrosepticum*. Сосудистые ткани окрашиваются в коричневый цвет от основания стебля, прогрессируя вверх и иногда достигая состояния некроза и полого стебля. Внешне стебли обычно остаются зелеными до полного высыхания листьев. В теплых и сухих условиях симптомы обычно появляются, когда температура воздуха превышает 25 °С [17].

Другие виды *Dickeya* spp. (*D. dadantii* и *D. zeaе*), обычно встречающиеся на картофеле в более теплых, влажных тропических и субтропических средах, вызывают симптомы, неотличимые от симптомов болезни черной ножки, вызываемой *P. atrosepticum* в более прохладных условиях [18, 19]. Пораженные растения демонстрируют увядание, задержку роста и хлороз, коричневую или черную мягкую гниль основания стебля. Заболевание, возникающее до или сразу после появления всходов, приводит к гибели растений. В регионах с низкой температурой заражение часто начинается с потемнения верхних листьев, за которым следуют хлороз и увядание. По мере прогрессирования заболевания увядают стебли или проявляются симптомы черной ножки. Загрязнение листвы и последующее повреждение урожая, вызванное сильными дождями, градом или насекомыми, может привести к воздушной гнили стебля [20].

На сегодняшний день выбраковка растений на ранних этапах болезни – наиболее эффективный способ предотвратить или минимизировать урон от черной

ножки. Для этого необходим постоянный мониторинг инфицирования семенного материала. Среди диагностических инструментов, решающих эту задачу, выделяют две группы методов. Первая группа основана на распознавании и дальнейшей амплификации ДНК фрагмента бактерии. Это прежде всего ПЦР-методы [21-23]. Вторую группу составляют иммунохимические методы [24], основанные на распознавании антигенных детерминант на поверхности бактериальных клеток. В этой категории наиболее распространенными являются иммуноферментный анализ (ИФА) и иммунохроматографический анализ (ИХА). Для детекции *Dickeya* spp. доступны коммерческие ИФА-наборы зарубежных производителей Loewe и Agdia и ИФА-набор, производимый Федеральным исследовательским центром картофеля имени А. Г. Лорха. Среди коммерчески доступных иммунохроматографических тест-полосок доминируют те же зарубежные компании; имеется единственный отечественный производитель (www.тест-картофель.рф), работающий в тесном научном сотрудничестве с ФИЦ Биотехнологии РАН и ФИЦ картофеля имени А. Г. Лорха. На сегодняшний день производство отечественных иммуноаналитических тест-систем уступает по объему зарубежным конкурентам, что не позволяет проводить мониторинг инфицирования на регулярной основе на всех этапах производства картофеля. Одним из препятствий на пути к выпуску новых иммунодиагностических систем является ограниченность иммунореагентов. Расширение реagentной базы за счет получения новых специфичных антител будет способствовать появлению новых иммуноаналитических тест-систем.

***Erwinia amylovora* (возбудитель бактериального ожога плодовых культур)**

E. amylovora (Burrill) Winslow et al. является возбудителем карантинного заболевания, называемого бактериальным ожогом плодовых культур. Регионом происхождения считается Северная Америка, из которой в 1950–1960-х годах инфекция попала в Европу [25].

E. amylovora – грамотрицательные, подвижные, аэробные и факультативно-анаэробные, бесспорные бактерии, принадлежащие к семейству

Enterobacteriaceae, порядку Enteriobacterales [26, 27]. Бактерии *E. amylovora* имеют клетки размером 1,1-1,6 × 0,6-0,9 мкм, палочковидную форму с закругленными концами, их подвижность обеспечивается многочисленными жгутиками [28]. Основные и наиболее восприимчивые хозяева *E. amylovora* относятся к подсемейству Pomoideae семейства Rosaceae [28]. Данный возбудитель входит в число 10 основных бактериальных патогенов растений [29, 30]. Среди растений, поражаемых бактериальным ожогом плодовых культур, большое количество экономически значимых объектов: яблоня (*Malus* spp.), груша (*Pyrus* spp.), малина (*Rubus* spp.), айва (*Cydonia* spp.) и другие культурные растения семейства Rosaceae [31, 32].

Бактерии проникают в растения через естественные отверстия или поврежденные части, включая корневища, побеги, листья, цветы и плоды, вызывая первоначальную инфекцию. Затем они могут распространяться через сосуды ксилемы, заражая все растение [25, 33]. Местное распространение *E. amylovora* осуществляется посредством насекомых и дождей. Переносчиками являются и перелетные птицы, распространяющие заражение на большие расстояния [25].

Максимальная вероятность заражения отмечена для цветков в первые дни после распускания [34]. Выделяют несколько фаз болезни, включая гниение цветков, гниение побегов и гниение подвоя [33]. Наиболее распространенные симптомы бактериального ожога плодовых культур: 1) увядание и гибель цветочных кластеров – мертвые цветы становятся сухими, а их цвет – темно-коричневым или черным; 2) увядание и гибель побегов и веточек; 3) пятнистость листьев – некротические пятна, которые начинаются от края листовой пластинки, или почернение черешка и средней жилки листа; 4) гниль плодов – плоды меняют цвет на коричневый и черный, высыхают, оставаясь прикрепленными к ветке и приобретая мумифицированный вид; 5) гниль ветвей – гниль ствола, образование некроза плодовых деревьев на крупных ветках [25]. Иногда симптомы, сходные с поражением *E. amylovora*, могут вызываться другими патогенными организмами [35].

Для выявления бактериального ожога плодовых культур необходимо проводить осмотры в период вегетации, когда симптомы заметны. Время проверки зависит от типа проверяемого объекта и от географического положения. Желательно проводить осмотр после цветения до конца лета, когда симптомы становятся более очевидными. Зимой на находящихся в покое растениях выявить болезнь довольно сложно, поскольку язвы не всегда видны. Сообщалось о скрытой инфекции в древесных тканях, которая считается важным фактором развития болезни [36].

Таким образом, актуальна задача раннего выявления пораженных растений, что позволит принять меры для изоляции растений во избежание дальнейшего распространения заболевания. Для такого выявления востребованы высокочувствительные методы быстрой диагностики, позволяющие анализировать большое количество образцов и не требующие специальных условий анализа (стерильности, дорогостоящего оборудования и т. д.).

Наиболее распространенными методами обнаружения возбудителя бактериального ожога являются молекулярно-генетические методы, прежде всего основанные на ПЦР, и иммунохимические методы (ИФА и ИХА) [30, 37].

В настоящее время доступно несколько коммерческих наборов зарубежных производителей для детекции *E. amylovora*: для ИФА – Agdia (США), Loewe (Германия) и Bioreba (Швейцария); для ИХА – Agdia (США), Pocket Diagnostic (Великобритания) и Bioreba (Швейцария); для ПЦР – Loewe (Германия), Bioreba (Швейцария), BioinGentech (Чили) и Norgen Biotek Corp. (Канада).

***Ralstonia solanacearum* (возбудитель бурой гнили картофеля)**

Ralstonia solanacearum (Smith 1896) Yabuuchi et al. [38] – это всемирно распространенный почвенный фитопатоген, поражающий более 450 видов и более 50 ботанических семейств [39], в том числе декоративные растения, такие как *Pelargonium* и *Anthurium* [40-43]. *R. solanacearum* занимают второе место среди наиболее опасных фитопатогенных бактерий [29]. *R. solanacearum* –

грамотрицательные бактерии с палочковидными клетками длиной 0,5-1,5 мкм и одним полярным жгутиком [44]. Штаммы *R. solanacearum* подразделяются на четыре фило типа и далее делятся на секевары. Штаммы в секеваре 1 фило типа II и секеваре 2 фило типа II (исторически известные как расовый биовар 2 или R3bv2) ответственны за бактериальное увядание картофеля [45]. Потери урожая варьируют в зависимости от хозяина и сорта: например, они составляют 33–90% для картофеля, 0–91% для томатов, 10–30% для табака, 80–100% для бананов и до 20% для арахиса [45].

Бактерии *R. solanacearum* из-за значительного генетического разнообразия считаются видовым комплексом. В новой иерархической классификации видовой комплекс *R. solanacearum* включает виды, фило типы, секевары и клоны [46]. Исходя из диапазона хозяев, *R. solanacearum* разделен на пять рас: раса 1 (овощи пасленовые), раса 2 (банан), раса 3 (картофель и томат из регионов с умеренным климатом), раса 4 (имбирь) и раса 5 (шелковица) [47].

Бактерии *R. solanacearum* имеют разные симптоматические проявления на растениях картофеля. Первый видимый симптом – увядание листьев на концах ветвей. По мере развития болезни может изменяться цвет стебля примерно на 2,5 см выше уровня земли, листья могут приобретать бронзовый оттенок. Впоследствии растения не могут восстановиться и погибают. При разрезании из сосудистых пучков выделяется белая слизистая масса бактерий [48]. В клубнях внешние симптомы могут быть видимыми или нет, в зависимости от стадии развития заболевания. Бактериальная слизь часто выходит из глазков и столонной части зараженного клубня. Вырезание пораженного клубня позволяет выявить потемнение и некроз сосудистого кольца и соседних тканей. Кремообразный жидкий экссудат обычно появляется на сосудистом кольце поверхности разреза [48].

Когда *R. solanacearum* поражают томат, первыми приобретают вялый вид самые молодые листья. Увядание всего растения может происходить быстро, если условия окружающей среды благоприятны для возбудителя. При менее благоприятных условиях заболевание развивается медленно, может произойти

задержка роста, отмечается большое количество случайных корней на стебле. Сосудистые ткани имеют коричневую окраску; при разрезании стебля могут высвобождаться капли белой или желтоватой бактериальной слизи [49].

Для детекции *R. solanacearum* широко используются ИФА [50, 51] и методы молекулярной диагностики [52-54]. На основе ПЦР разработаны методы для выявления некоторых подвидов *R. solanacearum* [55-57].

Хотя молекулярная диагностика очень специфична, ее невозможно применять в полевых условиях. Поэтому разработаны способы диагностики, основанные на иммунохроматографическом анализе [58] и изотермических амплификациях [59-61].

В настоящее время для детекции *R. solanacearum* доступно несколько коммерческих наборов зарубежных производителей: для ИФА – Loewe (Германия) и Bioreba (Швейцария); для ИХА – Loewe (Германия), Agdia (США) и Bioreba (Швейцария); для ПЦР – Loewe (Германия) и Bioreba (Швейцария).

1.1.2. Вирусы

Вирусы растений, как правило, состоят из двух основных частей: внутренней (генома) и наружной (белковой защитной оболочки). Для большинства растительных вирусов геном – это положительная одноцепочечная РНК-последовательность [62].

Вирусы могут передаваться либо (i) от зараженного растения потомству, т. е. посредством размножения (от семян или органов хранения, таких как клубни), и, следовательно, могут присутствовать в следующем поколении (вертикальная передача), либо (ii) механически или посредством переносчиков, таких как животные, насекомые, грибки или бактерии (горизонтальная передача). Тли являются наиболее распространенными переносчиками вирусов растений, на их долю приходится более 60% вирусов, передаваемых беспозвоночными [63].

X-вирус картофеля (ХВК)

ХВК относится к роду *Potexvirus* семейства Flexiviridae, содержащего около 40 видов. Вирионы *Potexvirus* представляют собой изогнутые частицы длиной от 470 до 580 нм и диаметром около 13 нм [64]. Детальный анализ структурной организации частиц ХВК приведен в работе Tollin и Wilson [65]. ХВК имеет положительную РНК-цепь из 6435 нуклеотидов, переходящую в поли (А) последовательность на 3'-конце [66-69]. Около 1300 идентичных белковых субъединиц (белок оболочки) в вирионе ХВК образуют спиральную матрицу (шаг 3,6 нм) с вирусной РНК, упакованной между витками спирали [64].

ХВК может передаваться путем механической инокуляции и контакта между растениями [70]. Инфицирование растений ХВК происходит контактным путем от растения к растению или при механическом повреждении [71]. Как правило, с поражением ХВК ассоциируется легкая мозаика; однако умеренно выраженные симптомы мозаики вызывают и другие вирусы, в частности А-вирус картофеля и штаммы Y-вируса картофеля. На растениях, пораженных легкой мозаикой, наблюдается крапчатость различной степени (светло- и темно-зеленый мозаичный рисунок на листочках). Листья не деформируются. Ботва некоторых сортов лишь бледнеет, мозаика отсутствует, и это затрудняет диагностику. На некоторых сортах инфекция не вызывает симптомов [71]. Это повсеместно распространенное заболевание, которое снижает урожай клубней, как правило, на 10–15%, но отмечены случаи потери урожая до 40%.

Доступны различные методы выявления ХВК в клубнях и листьях растений, включая иммунологические, такие как ИФА [72, 73] и ИХА [74, 75], и молекулярные методы [76-78].

Для диагностики ХВК существуют коммерческие системы ИФА и ИХА (Bioreba, Швейцария; Agdia, США; Loewe, Германия), однако пределы обнаружения этих систем не позволяют выявлять ХВК при латентной инфекции. В связи с этим разработка средств высокочувствительной детекции ХВК является востребованной, активно решаемой задачей [79, 80].

Y-вирус картофеля (YBK)

YBK относится к роду *Potyvirus* семейства *Potyviridae* [81]. Это один из самых опасных и повсеместно распространенных вирусов в семействе *Solanaceae* [82]. YBK поражает выращиваемый картофель [83]. YBK распространяется вегетативно размножаемым материалом, в частности клубнями картофеля, а также тлями – более 50 видов тли признаны потенциальными переносчиками [84]. Наиболее распространенный способ передачи – посредством персиковой тли (*Myzus persicae* Sulz.) [85].

Вирион YBK с массой более 60×10^3 кДа имеют нитевидную структуру. Длина вириона составляет 680–900 нм, а диаметр – 11–20 нм [63, 86]. Вирусная РНК кодирует один большой полипептид, который расщепляется тремя кодируемыми вирусом протеазами на девять продуктов [87]. Вирион состоит примерно из 2000 копий белка массой 33 кДа и РНК, заключенной в белковый капсид [63]. У картофеля YBK может вызывать ряд симптомов, начиная от легкой до тяжелой мозаики, часто связанной с некрозом листьев, задержкой роста и опаданием листьев [88]. Но вирус может вызвать и более серьезные последствия, являясь возбудителем некротической кольцевой пятнистости клубня картофеля [82, 89]. Зараженное растение с легкими симптомами инфекции обычно содержит около $2,4 \times 10^9$ копий РНК YBK на 1 мг сухого веса листьев картофеля [90], что составляет примерно 100 нг.

YBK представляет собой комплекс как минимум девяти групп штаммов, включая родительские нерекомбинантные штаммы YBK^O и YBK^N и несколько рекомбинантных штаммов [91].

Обычный штамм YBK^O вызывает мозаику от легкой до тяжелой, часто ассоциирующуюся у картофеля с скручиванием, пожелтением, некрозом и опаданием листьев, а у табака – также с просветлением прожилок листьев и пятнистостью [92].

YBK^N отличается от YBK^O способностью вызывать некроз прожилок листьев у табака; у большинства сортов картофеля он вызывает более слабые симптомы, но

быстрое перемещение из листвы в клубни [93]. Группа табачного некроза прожилок листьев (YBK^N) вызывает у картофеля более мягкую пятнистость, чем YBK^O, а у табака – тяжелый некроз прожилок листьев и черешков (*Nicotiana tabacum*) [92].

Основные методы выявления YBK – иммунохимические, ИФА [94, 95] и ИХА [96], и молекулярно-генетические [78, 97-99].

На сегодняшний день доступно несколько коммерческих наборов зарубежных производителей для детекции ХБК: для ИФА и ИХА – Agdia (США), Loewe (Германия) и Bioreba (Швейцария); для ПЦР – Loewe (Германия) и Bioreba (Швейцария).

1.2. Методы детекции фитопатогенов

Инфекционные болезни растений до сих пор не искоренены, несмотря на все достижения науки и техники. Однако достигнут несомненный прогресс в методах детекции фитопатогенов. В зависимости от принципа диагностики методы разделяются на молекулярно-генетические и иммунохимические [58].

1.2.1. Молекулярно-генетические методы

Полимеразная цепная реакция

В основе молекулярно-генетических методов анализа лежит принцип комплементарности последовательностей нуклеиновых кислот [100].

Наиболее известным и широко применяемым методом из этой группы является полимеразная цепная реакция (ПЦР), изобретенная Кэри Маллисом в начале 1980-х гг. [101]. ПЦР в реальном времени представляет собой лабораторный метод, основанный на ПЦР, который используется для амплификации и одновременного количественного определения целевой молекулы ДНК [102]. Основные компоненты для проведения ПЦР – матрица ДНК, праймеры, нуклеотиды, ДНК-полимераза и буфер [101]. При необходимости выявить РНК-содержащий патоген проводят ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), в состав

реагентов для которой входит обратная транскриптаза. Амплификация нуклеиновых кислот с помощью ПЦР – эффективный инструмент для высокочувствительной детекции и идентификации культивируемых и некультивируемых бактерий [103, 104], а также вирусов и виридов [105-107]. Молекулярные методы, основанные на различных типах ПЦР-амплификации, приводят к высокопроизводительному, быстрому и точному обнаружению патогенов растений, что дает важные преимущества для сельского хозяйства [102]. В настоящее время предложено много вариантов проведения ПЦР и детектирования результатов: ПЦР в реальном времени, цифровой ПЦР, вложенная полимеразная цепная реакция, количественно-обратная транскрипция-ПЦР, мультиплексная ПЦР с обратной транскрипцией [107-110]. Однако такие методы анализа требуют продолжительного времени, сложной подготовки проб, использования специального оборудования (как минимум, термоциклера), а также привлечения высококвалифицированного оператора. Кроме того, особое внимание должно уделяться чистоте помещений и расходных материалов. Все эти факторы делают невозможным на сегодняшний день использование ПЦР для рутинного анализа большого количества образцов во внелабораторных условиях.

Методы изотермической амплификации

Изотермическая амплификация стала прорывом в области молекулярной диагностики, устранив необходимость в термоциклере для амплификации.

При диагностике растений применялись многие изотермические методы.

Петлевая изотермическая амплификация (анг. *loop-mediated isothermal amplification, LAMP*) – это метод целевой амплификации при 60 °С, который использует шесть праймеров, высокоспецифичных к различным целевым сайтам в целевой последовательности [111]. Модификация LAMP с помощью флуоресцентного зонда превращает его в метод изотермической амплификации в реальном времени, который обеспечивает быстрое и простое количественное определение патогенной ДНК [112, 113].

В работах последних лет показана эффективность использования LAMP для проведения диагностики в питомниках растений с высокой чувствительностью, достигающей 5–6 копий целевой ДНК [114], LAMP использовали для обнаружения *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *E. amylovora* и *Phytophthora ramorum*. LAMP в сочетании с ИХА был использован для обнаружения *Xylella fastidiosa* в оливках. Существуют коммерческие наборы для детекции, но отсутствие информации о чувствительности и специфичности этих дорогостоящих наборов ограничивает их использование для рутинной диагностики фитопатогенов.

Рекомбиназная полимеразная амплификация (анг. *recombinase polymerase amplification, RPA*) является новейшим изотермическим методом, приближенным к комнатной температуре, максимальный выход достигается при 37–42 °С. РПА проходит при участии нескольких белков: рекомбиназы, оцДНК-связывающего белка (анг. *single-stranded DNA binding protein, SSB*) и полимеразы с вытесняющей активностью и двух праймеров с длиной 28–36 нуклеотидов [115, 116].

Благодаря совместимости РПА с обратной транскриптазой объектом анализа может быть не только ДНК, но и РНК (ОТ-РПА). Для детекции и визуализации ампликонов могут быть использованы экспрессные мембранные тесты, позволяющие выявить продукты РПА в течение 10 минут (РПА-ИХА). Системы РПА-ИХА были успешно разработаны для обнаружения таких фитопатогенов, как *D. solani*, *R. solanacearum*, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, вирус шарки сливы, вириод веретеновидности клубней картофеля [117-121].

Электрохимический биосенсор на основе РПА при интеграции с наночастицами золота оказался в 10000 раз более чувствительным, чем обычная ПЦР, при обнаружении *Pseudomonas syringae* в бессимптомно инфицированной растительной ткани [122]. Разработка РПА для детекции фитопатогенов имеет большой потенциал, особенно для выявления инфекции в растениях без симптомов [123].

Кроме того, существуют другие изотермические методы такие как репликация по типу катящегося кольца (анг. *rolling circle replication, RCA*),

амплификация на основе последовательности нуклеиновой кислоты (анг. *nucleic acid sequence-based amplification*, NASBA) и геликаз-зависимая амплификация (анг. *helicase dependent amplification*) [124].

1.2.2. Иммунохимические методы

Иммунохимические методы анализа основаны на использовании антител, обладающих специфичностью к определенному патогену [125]. Суть иммунохимических методов заключается в образовании специфических комплексов (антиген – антитело) вследствие проведения иммунохимической реакции и последующей визуализации образовавшихся комплексов. Визуализация иммунных комплексов может отличаться в разных форматах иммуноанализа: ферментативная метка (пероксидаза из корней хрена, щелочная фосфатаза), детекция флуоресценции, коллоидные маркеры (наночастицы золота, магнитные частицы, частицы латекса, квантовые точки). В практической фитопатологии наибольшее распространение получили методы ИФА и ИХА.

В отличие от молекулярно-генетических методов, иммунохимические методы (в особенности ИХА) не требуют дорогостоящего оборудования и реагентов, тестирования могут проводиться неквалифицированным персоналом за короткое время.

Свойства антител и их взаимодействие с антигеном

Все иммунохимические методы основаны на высокоспецифичной и чувствительной реакции между антигеном и антителом. Антиген – это вещество, которое индуцирует продукцию антител, которые вырабатываются в иммунной системе в результате защитной реакции (иммунитета) к этому чужеродному веществу [126, 127].

Антитела (иммуноглобулины, Ig) представляют собой особый класс гликопротеинов, присутствующих на поверхности В-лимфоцитов в виде

мембраносвязанных рецепторов, а также в сыворотке крови и тканевой жидкости в виде растворимых молекул, и обладающих способностью очень избирательно связываться с конкретными антигенами. У млекопитающих выделяют пять классов антител (иммуноглобулинов) – IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, различающихся по строению и аминокислотному составу и по выполняемым функциям [128].

Для целей иммуноанализа в основном используют IgG, что обусловлено как их функциональными характеристиками, так и преобладанием фракции IgG (70–75%) в общем пуле вырабатываемых антител. Структурно IgG часто визуализируют как Y-образные молекулы (рисунок 1), каждая из которых содержит 4 полипептида – 2 одинаковых полипептидных единицы, называемых тяжелыми цепями, и еще 2 легкие цепи [126].

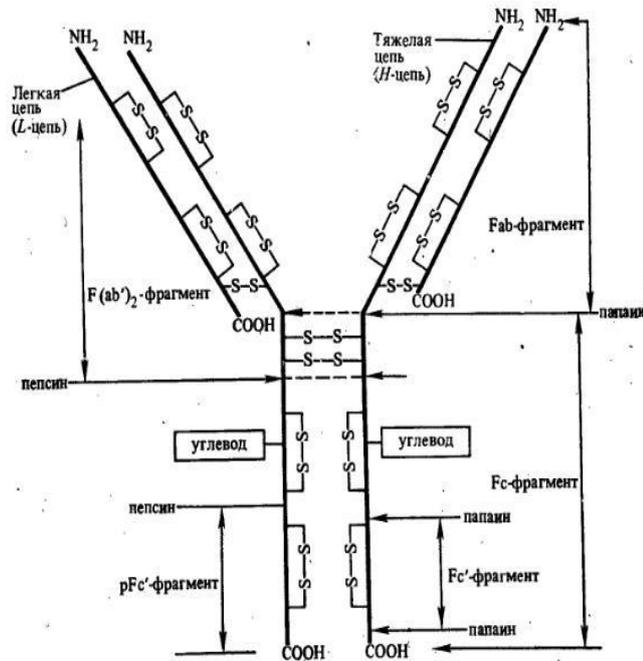


Рисунок 1. – Схематическое изображение строения молекулы иммуноглобулина G [129]

Область антигена, которая взаимодействует с антителом, называется эпитопом или антигенной детерминантой, а контактирующая с антигеном область антитела – паратопом. Связывание антитела с антигеном зависит от обратимых нековалентных взаимодействий, и комплекс находится в равновесии со

свободными компонентами [126]. Поэтому высокоаффинные антитела обычно предпочтительнее в иммуноаналитических методах.

Высокоаффинные антитела связывают больше антигена за более короткий период времени и образуют более стабильные комплексы. Равновесная константа взаимодействия «антитело – антиген» называется аффинностью. Аффинность, выраженная как равновесная константа ассоциации, у антител варьирует от микро до пиколярных величин [126].

Когда антиген связывается с мембраносвязанным антителом, В-лимфоцит активируется либо для деления на дочерние клетки, либо для созревания в плазматическую клетку, способную секретировать антитела. Дочерние клетки следуют той же схеме, когда антиген связывается с их поверхностным антителом. Антитела, продуцируемые данным В-лимфоцитом и всем его потомством, имеют идентичные паратопы и, следовательно, являются моноклональными. Антитела от разных родительских В-лимфоцитов являются поликлональными [127].

Поликлональные антитела (пАт) представляют собой смесь сходных, но не идентичных антител, продуцируемых множеством лимфоцитов. Доля антител, специфичных к определенному антигену, составляет не более 1–3% от общего числа иммуноглобулинов, а их аффинность может изменяться от партии к партии [128]. Поликлональные антитела широко используют для иммунодиагностики фитопатогенных вирусов, бактерий и грибов [65, 130]. Однако специфичность пАт не всегда оказывается достаточно высокой, что приводит к перекрёстному взаимодействию с нецелевыми антигенами (например, с близкородственными бактериями со сходными поверхностными антигенными детерминантами). Этот недостаток отчасти ограничивает применение пАт для обнаружения некоторых фитопатогенов.

Поликлональные антитела выделяют из сыворотки иммунизированных животных, обычно кроликов, получая комбинацию многочисленных антител с различной специфичностью и аффинностью [126].

Моноклональные антитела (мАт) представляют собой популяцию антител, специфичных к одному эпитопу. Моноклональные антитела образуются гибридами – гибридными клетками В-лимфоцитов и опухолевых клеток миеломы. Эту технологию предложили в 1975 г. Жорж Келер и Цезарь Мильштейн [131]. Клеточная линия гибридом способна производить антитела, а также быстро размножаться *in vitro*. Получаемые таким методом моноклональные антитела не просто однородны по специфичности, а имеют идентичный аминокислотный состав [128].

В фитопатологии мАт прежде всего стали применять для иммунодиагностики вирусов. Сейчас их используют также в ИФА других фитопатогенов: бактерий, грибов, фитоплазм и оомицетов [132].

Во многих случаях дифференциация вирусных штаммов, бактериальных серотипов, а также рас и изолятов грибов с помощью мАт успешнее, чем при участии пАт [128].

Иммуноферментный анализ (ИФА)

ИФА основан на использовании антител, связанных с ферментом. Для синтеза конъюгатов наиболее часто используют пероксидазу хрена или щелочную фосфатазу [128]. ИФА был предложен в 1970 г. и до сих пор является одним из самых распространенных способов диагностики вирусных и бактериальных инфекций растений. Метод демонстрирует высокую чувствительность, специфичность и производительность. Диагностика фитопатогенов методом ИФА в сэндвич-формате хорошо зарекомендовала себя в широкомасштабных рутинных тестированиях растительного материала [128].

Сэндвич формат ИФА используется для количественной оценки содержания высокомолекулярных поливалентных соединений. Первые антитела предварительно иммобилизуются на фазу и служат для захвата целевого антигена из раствора (рисунок 2, I). Добавление вторых антител, меченных ферментом, используется для визуализации результатов анализа (рисунок 2, II). Добавление хромогенного субстрата приводит к формированию окраски (рисунок 2, III),

интенсивность которой пропорциональна концентрации целевого анализата (рисунок 2, IV) [133].

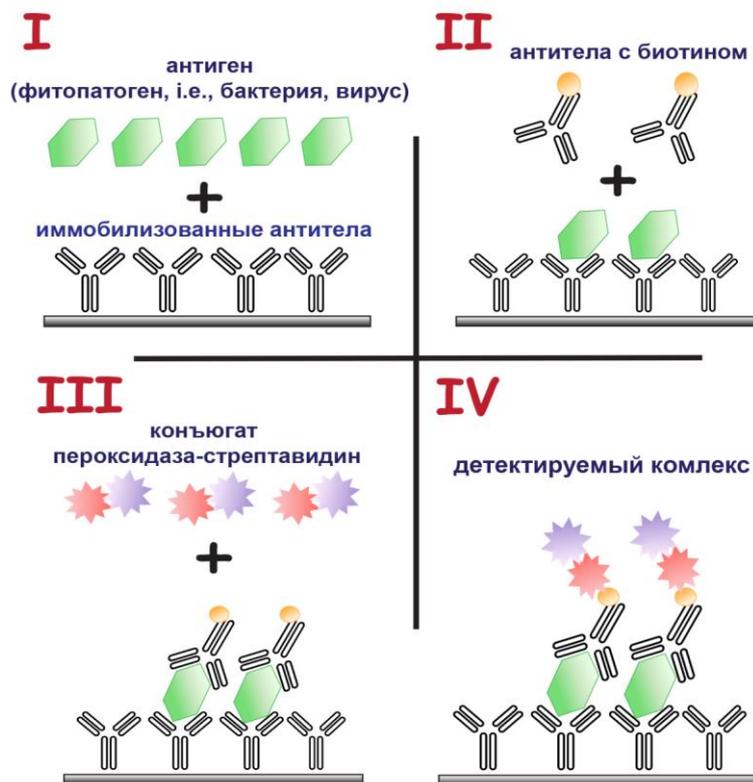


Рисунок 2. – Схема сэндвич-формата ИФА. Цифры I-IV обозначают последовательные этапы проведения ИФА

В некоторых случаях чувствительность ИФА может быть недостаточна для выявления антигена с низким содержанием в пробе. Одним из перспективных направлений повышения чувствительности ИФА является магнитное концентрирование. Для этого используют конъюгаты магнитных частиц со специфичными антителами. Инкубация таких конъюгатов с пробой, содержащей целевой антиген, приводит к формированию иммунных комплексов (связыванию антигена с частицами), которые в дальнейшем могут быть сконцентрированы с помощью магнита и перерастворены в меньшем объеме жидкости, что приводит к снижению предела обнаружения [133].

Иммунохроматографический анализ

Появление иммунохроматографических диагностических систем датируется 1980-ми годами [134, 135]. В основе метода ИХА лежат реакция «антиген – антитело» и разделение реагентов на мембране. Оценка результатов может быть проведена как визуально, так и с помощью специальных устройств.

Иммунохроматографическая тест-полоска, как правило, состоит из четырех частей: мембраны под образец, которая служит для впитывания образца и отделения компонентов матрикса; мембраны, на которой находятся конъюгаты нанодисперсных маркеров с биорецепторными молекулами; рабочей мембраны, содержащей тестовую линию с иммобилизованными специфическими антителами и контрольную линию с антивидовыми антителами; и адсорбирующей мембраны, которая впитывает избыток реагентов и способствует поддержанию потока жидкости вдоль рабочей мембраны.

Под действием капиллярных сил происходит миграция образца вдоль тест-полоски. При наличии в пробе антигена происходит его связывание с антителами, иммобилизованными на частицах нанодисперсного носителя, и формирование иммунных комплексов. В сэндвич-формате ИХА, характерном для детекции фитопатогенов, при прохождении тестовой зоны происходит связывание иммунных комплексов «антиген – конъюгат» с антителами, иммобилизованными на мембране, и формирование тройных иммунных комплексов (рисунок 3). Избыток несвязавшегося с антигеном конъюгата проходит через тестовую зону и связывается с антивидовыми антителами в контрольной. Концентрирование конъюгатов в тестовой и контрольной зонах приводит к образованию окраски, ее интенсивность в тестовой зоне зависит от концентрации антигена. Наличие окрашенной полосы в контрольной зоне подтверждает, что анализ был проведен успешно. Отсутствие окрашенной полосы в тестовой зоне указывает на отсутствие детектируемого антигена в тестируемом образце или на то, что его концентрация находится ниже порогового уровня (предела обнаружения). В сэндвич-формате

ИХА наличие двух окрашенных полос (как в контрольной, так и в тестовой зонах) свидетельствует о наличии антигена в пробе.

Идеальная метка в ИХА должна быть стабильной, иметь низкое неспецифическое связывание и легко конъюгироваться с рецепторными биомолекулами. Наиболее широко используются окрашенные метки, детекция которых возможна невооруженным глазом: наночастицы золота (НЧЗ), магнитные частицы (МЧ), цветные латексные частицы, углеродные наночастицы, квантовые точки и др. [136, 137]. Интересным решением являются углеродные наночастицы, обладающие низкой себестоимостью и высокой интенсивностью сигнала. Благодаря высокой контрастности сигнала (черный маркер на белой мембране) углеродные наночастицы эффективны для визуального обнаружения в ИХА [138, 139]. Однако наибольшее распространение получили НЧЗ благодаря уникальным оптическим свойствам (поверхностный плазмонный резонанс) и МЧ – благодаря магнитным характеристикам, используемым как на этапе пробоподготовки, так и на этапе детекции сигнала [132]. Иммуобилизация антител на поверхность маркера посредством образования ковалентных связей или физической адсорбции приводит к образованию конъюгата – ключевого компонента ИХА. Более подробно особенности конъюгатов описаны в разделе 1.3.

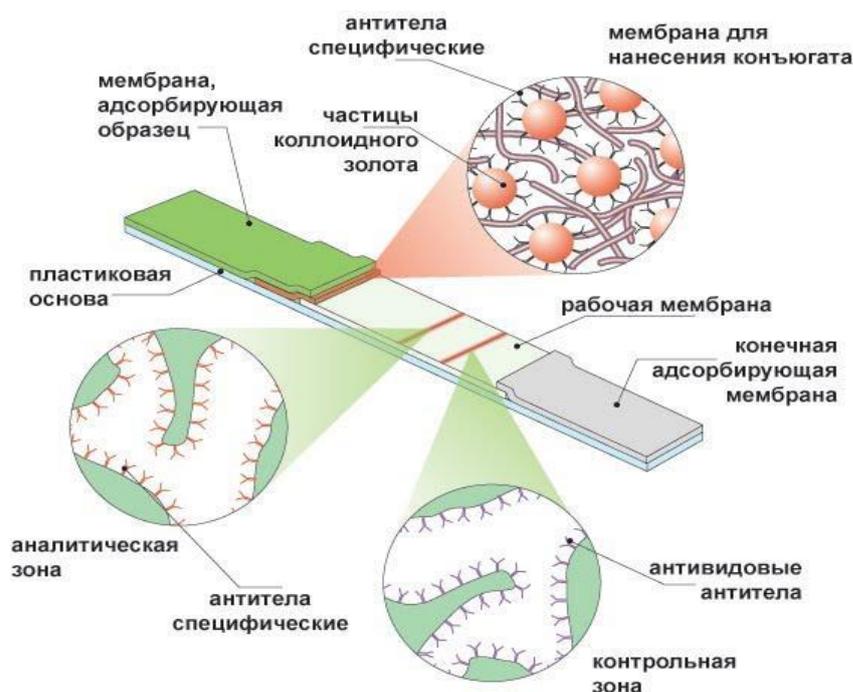


Рисунок 3. – Принцип сэндвич-формата иммунохроматографического анализа [140]

Метод ИХА может быть использован в лабораторных и во внелабораторных условиях как специалистами, так и лицами без профессиональной подготовки. К недостаткам метода следует отнести недостаточную чувствительность при использовании для детекции скрытой зараженности растений фитопатогенами. Для преодоления этого ограничения существуют подходы по модификации ИХА, включающие способы усиления сигнала (см. раздел 1.4).

ИХА активно развивается в отношении самых разных фитопатогенов. Ряд зарубежных фирм производит тест-полоски для диагностики вирусов и бактерий растений: Spot Check LF (Adgen, Великобритания), Pocket Diagnostic (Forsite Diagnostics, Великобритания), Immunostrips (Agdia, США), Bioreba (Швеция) и Loewe (Германия).

В России технология производства тест-полосок для детекции вирусов растений, основанная на использовании поликлональных антител к вирусам и НЧЗ, впервые была разработана в лаборатории иммунобиохимии Института биохимии имени А. Н. Баха РАН [24, 141-143]. Тест-полоски за 10 минут надежно выявляют в зараженных растениях такие разные вирусы, как X- и Y-вирусы картофеля, вирус табачной мозаики, вирус мягкой мозаики фасоли и вирус крапчатости гвоздики,

бактерии *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* и *Dickeya* spp. После этого были разработаны отечественные иммунохроматографические тест-системы на основе моноклональных антител [79, 143], а также иммунохроматографическая тест-система для одновременной детекции 5-8 фитопатогенов картофеля [79, 96].

1.3. Конъюгаты нанодисперсных маркеров с антителами

1.3.1. Конъюгаты с магнитными частицами

Магнитные частицы (МЧ) представляют собой класс частиц, которыми можно управлять, используя магнитное поле. Такие частицы обычно состоят из двух компонентов: магнитного материала (чаще всего это железо, никель и кобальт) и функционального химического компонента. Кластеры МЧ образуются несколькими МЧ диаметром 50–200 нм [144]. Магнитные свойства позволяют легко манипулировать наночастицами с помощью внешнего магнитного поля, что находит широкое применение в различных отраслях – биомедицине, биотехнологии и аналитической химии [144]. В ИХА магнитные частицы также нашли широкое применение для анализа различных антигенов: токсинов [145], вирусов [146] и бактерий [147]. Помимо визуальной детекции, МЧ можно детектировать с помощью специальных приборов – магнетометров, что в ряде случаев позволяет существенно увеличить чувствительность анализа [148].

Wang и соавт. разработали суперпарамагнитный ИХА для обнаружения спор *Bacillus anthracis*. Специфичные мАт конъюгировали с суперпарамагнитными частицами для концентрирования спор и их дальнейшего определения [147]. Yan и соавт. исследовали влияние характеристик МЧ (включая размер частиц, распределение по размерам, поверхностную модификацию, магнитные свойства и коллоидную стабильность) на предел обнаружения *Vibrio parahaemolyticus* в ИХА [149]. Для повышения чувствительности и уменьшения ложноположительной реакции в качестве детектируемой метки были выбраны частицы, имевшие средний диаметр 200 нм и высокую стабильность.

1.3.2. Конъюгаты с наночастицами золота

НЧЗ являются традиционным маркером в ИХА [37, 75, 132, 150]. Их выбор для ИХА обусловлен уникальными оптическими свойствами, обеспечиваемыми поверхностным плазмонным резонансом и позволяющими визуально детектировать низкие концентрации иммунных комплексов [151]. Для получения НЧЗ существует два основных подхода: первый основан на дезинтеграции металлического золота, второй – на синтезе наночастиц из галогенидов золота с использованием химических и биологических восстановителей или облучения [152-155]. Как правило, в ИХА используют сферические НЧЗ небольшого размера (20–40 нм) [132, 156]. В ряде работ показано, что размер НЧЗ существенно влияет на предел обнаружения ИХА [151].

Использование в ИХА предъявляет ряд требований к размерам, форме и гомогенности НЧЗ [153-155, 157], так как оптические свойства определяются геометрическими характеристиками НЧЗ [158]. Отмечается также, что использование несферических НЧЗ (наноцветы, наностержни) позволяет снизить предел обнаружения ИХА [159, 160].

1.3.3. Конъюгаты с наночастицами Au-Pt (нанозим)

Биметаллические наночастицы обычно проявляют необычные физико-химические свойства, отличные от свойств их компонентов, и имеют ряд интересных потенциальных применений в таких областях, как катализ и топливные элементы [161]. Уникальные свойства биметаллических наночастиц определяются их размерами, формой, составом и структурой поверхности [162]. Как одна из наиболее многообещающих биметаллических систем, наночастицы Au-Pt были изучены для различных каталитических применений [163].

Комбинация Au и Pt для синтеза наноразмерных меток обеспечивает образование частиц, имитирующих пероксидазу, с высокой экстинкцией [164]. Наночастицы использовали в качестве меток для ИХА *Clavibacter michiganensis*

[165], капсидного белка вируса иммунодефицита человека [166], клеток *Escherichia coli* [167], IgG кролика [168] и простатспецифического антигена [169].

1.4. Системы усиления в ИХА

Снижение предела обнаружения является одним из основных направлений развития ИХА. Для этого используют ряд подходов: замена маркера, изменение формата ИХА, объединение с другими методами и др. [132, 170-172]. Ниже рассмотрены основные из этих подходов.

1.4.1. Иммуномагнитное концентрирование

Иммуномагнитное концентрирование (ИМК) играет важную роль в выделении и концентрировании патогенов при тестировании пищевых продуктов [173-175]. Аналогичный подход может быть использован и для высокочувствительного детектирования фитопатогенов. Объединение ИМК и ИХА может значительно улучшить чувствительность, уменьшить время тестирования и нивелировать негативный эффект компонентов матрикса на аналитические характеристики [176-178]. Суи и соавт. использовали ИМК *E. coli* O157:H7 с последующим ИХА [179]. В результате предел обнаружения составил $7,6 \times 10^3$ КОЕ/мл – в 10 раз ниже, чем при обычном ИХА. Проведение ИМК не требует дорогостоящего оборудования, специальных навыков оператора и занимает мало времени. Таким образом, ИМК может быть использовано для снижения предела обнаружения ИХА с сохранением основных достоинств анализа (быстрота, легкость выполнения).

1.4.2. Применение системы биотин – стрептавидин

Взаимодействия биотин – стрептавидин широко используются в ИХА для усиления специфического и снижения фонового сигнала [180, 181] [182]. Так, Zhao и соавт. применили это взаимодействие в ИХА *E. coli* O157:H7. НЧЗ

конъюгировали с МАТ к *E. coli* O157 и наносили на мембрану для конъюгата, биотинилированные ПАТ к *E. coli* O157 наносили на мембрану для образца [183]. Стрептавидин и козьи антитела против мыши были иммобилизованы в тестовой и контрольной зонах рабочей мембраны соответственно. При проведении анализа *E. coli* O157 связывается с биотинилированным антителом и антителом, меченным НЧЗ, с образованием комплекса «антитело – аналит – НЧЗ». Авторы показывают, что стрептавидин, иммобилизованный в тестовой зоне, уменьшает фоновый сигнал благодаря высокоаффинному специфическому взаимодействию с биотином. Этот метод позволяет обнаружить *E. coli* O157 в концентрации до $2,3 \times 10^3$ КОЕ/мл, что почти в 100 раз превосходит предел обнаружения традиционного ИХА [183].

1.4.3. Ферментативное усиление сигнала

Ферменты также используются для усиления сигнала в ИХА. В основе амплификации лежит активность ферментов, катализирующих превращение субстрата в детектируемый продукт. Одна молекула фермента катализирует множество реакций в единицу времени (число оборотов фермента), что приводит к накоплению большого количества продукта. Наибольшее распространение в иммуноанализе в качестве ферментативных меток нашли пероксидаза из корней хрена, щелочная фосфатаза и β -галактозидаза. Cho и соавт. показали использование комплекса «антитело – фермент – МЧ» в качестве метки для определения *Listeria monocytogenes* методом ИХА [184]. В результате усиления сигнала предел обнаружения составил 95 КОЕ/мл.

1.4.4. Восстановление солей серебра, катализируемое наночастицами золота

Восстановление солей серебра, катализируемое НЧЗ, является простым методом амплификации сигнала в ИХА [185-188]. В работе Panferov и соавт. этот подход был использован для обнаружения фитопатогенной бактерии *R. solanacearum* [58]. Показано, что ИХА с усилением серебра в 10 раз более

чувствителен (предел обнаружения 2×10^2 КОЕ/мл) по сравнению с обычным анализом (предел обнаружения 2×10^3 КОЕ/мл).

1.4.5. Использование каталитических свойств Pt-содержащего нанозима

Благодаря нанозимным свойствам биметаллических наночастиц, таких как Au-Pt, они используются в качестве меток не только из-за оптических характеристик, но и в силу каталитических свойств. Применение наночастиц Au-Pt в качестве меток в ИХА описано для обнаружения капсидного белка вируса иммунодефицита человека [189], клеток *Escherichia coli* O157:H7 [190], IgG кролика [191] и простатспецифического антигена [169]. В этих исследованиях показаны значительно (в 100-1000 раз) более низкие пределы обнаружения после каталитической реакции. В работе Panferov и соавт. [165] предел обнаружения *Clavibacter michiganensis* снизился в 300 раз по сравнению со стандартным ИХА с использованием НЧЗ в качестве меток.

Проведенный анализ литературных данных позволяет сделать вывод об актуальности разработки методов иммуноанализа для высокочувствительной детекции фитопатогенов, особенно приоритетных по влиянию на объемы сельскохозяйственной продукции.

Целесообразность использования ИХА в качестве метода диагностики фитопатогенов обусловлена высокой специфичностью, простотой проведения, а также экспрессностью. Применение современных подходов позволит снизить пределы обнаружения разрабатываемых иммуноаналитических систем. Для детекции вирусных и бактериальных фитопатогенов в качестве средств амплификации наиболее перспективны иммуномагнитное концентрирование, использование высокоаффинных модулей (биотин/стрептавидин), увеличение размера маркера после анализа, нанозимное усиление. Перечисленные подходы будут использованы при разработке иммунохроматографических тест-систем.

С практической точки зрения представляется обоснованной разработка высокочувствительных тест-систем для выявления трех экономически значимых бактериальных фитопатогенов: *Dickeya* spp. (возбудитель черной ножки и мягкой гнили клубней), *E. amylovora* (возбудитель бактериального ожога плодовых культур) и *R. solanacearum* (возбудитель бурой гнили картофеля), а также для детекции двух вирусных фитопатогенов: ХВК и УВК.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Антитела

Моноклональные антитела (мАт) (3G4), специфичные к ХВК, получены в ФИЦ Биотехнологии РАН (Москва). Поликлональные антитела получены в результате работ по иммунизации кроликов и очистке иммуноглобулинов G (IgG) в ФИЦ Биотехнологии РАН совместно с Ю. А. Варицевым (Федеральный исследовательский центр картофеля имени А. Г. Лорха (Московская обл., Россия). Антитела козы к иммуноглобулинам мыши получены от Arista Biologicals (США). Антитела против IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена, приобретены у Имтек (Россия). Антитела против IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена, приобретены у Jackson ImmunoResearch (США).

2.1.2. Бактериальные изоляты

Dickeya solani (DSM 28711), *D. dianthicola* (DSM 18054), *D. zea* (DSM 18068), *D. dadantii* subsp. *dadantii* (DSM 18020), *D. paradisiaca* (DSM 18069), *D. fangzhongdai* (DSM 101947), *D. chrysanthemi* (DSM 4610), *Pectobacterium atrosepticum* (DSM 18077) и *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (DSM 30168) из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ, Германия) были предоставлены Всероссийским центром карантина растений (ВНИИКР) (Московская обл., Россия). Изоляты *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms 204, Cms M1, Cms M2) получены из ВНИИКР.

Штамм *Ralstonia solanacearum* (NCPPB № 2316) был получен из Национальной коллекции патогенных бактерий растений (Великобритания). Штаммы других фитопатогенных бактерий (*C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. carotovorum*, *Arthrobacter castelli*) и *Pseudomonas syringae* предоставлены ВНИИКР.

Для работы с бактериями *Erwinia amylovora* в большинстве экспериментов использовался эталонный штамм CFBR 1430 (*Crataegus* sp., Lille, France, 1972). Восемь дополнительных штаммов *E. amylovora*, выделенных в России (ВНИИКР RCE 1, ВНИИКР RCE 6, ВНИИКР VRE 33, ВНИИКР RCE 7, ВНИИКР ККЕ 3, ВНИИКР SE 56, и ВНИИКР KE 37), и два штамма *Rubus* из США (IL 5, ME 1) были использованы для проверки специфичности [192]. В работе также были проверены близкородственные виды *Erwinia* (*E. tasmaniensis*, *E. piriflorinigrans*, *E. billingiae*), *Rahnella aquatilis* и *P. syringae* pv. *syringae*, широко распространенная у растений-хозяев *E. amylovora*. Все перечисленные штаммы предоставлены ВНИИКР.

2.1.3. Вирусы

Обычные и некротические штаммы Y-вируса картофеля (YBK^N, YBK^O), X-, M-, S-, A-вирусы картофеля (ХВК, МВК, СВК, АВК) и вирус скручивания листьев картофеля (ВСЛК) получены из Федерального исследовательского центра картофеля имени А. Г. Лорха (Московская обл., Россия).

2.1.4. Реагенты

Использовались карбоксилированные магнитные частицы (МЧ), приобретенные у Magsphere (США), золотохлористоводородная кислота (HAuCl₄), гексахлороплатинат (IV) натрия (Na₂PtCl₆), сульфат никеля (II), сульфат аммония, диметилсульфоксид, аскорбат натрия, цитрат натрия, азид натрия, этаноламин гидрохлорид, сахароза, бычий сывороточный альбумин (БСА), N-гидроксисукцинимид (NHS), биотинамидогексаноил-6-аминогексановой кислоты N-гидроксисукцинимидный эфир биотина, диметилсульфоксид (ДМСО), стрептавидин-полипероксидаза, 3,3'-диаминобензидин (ДАБ), приобретенные у Sigma-Aldrich (США). 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC) получен от ThermoFisher (США). Однокомпонентный субстратный раствор для пероксидазы, содержащий тетраметилбензидин (ТМБ), приобретен у НВО Иммунотех (Россия). Тритон X-100, Твин-20, трис (гидроксиметил) аминметан,

глицерин, серная кислота, хлорид натрия, гидроксид калия, фосфат калия и пероксид водорода приобретены у Химмед (Россия). Белок А *Staphylococcus aureus* приобретен у Имтек (Россия). Адъювант Фрейнда (полный и неполный) для иммунизации приобретен у Becton, Dickinson and Company (США). Все соли, кислоты, щелочи и органические растворители были химической чистоты.

Для проведения ИФА использовали 96-луночные прозрачные микропланшеты Costar Plate Assay (Corning Incorporated, США).

Для подготовки тест-полосок ИХА использовали мембраны, приобретенные у Advanced Microdevices (Индия): нитроцеллюлозные мембраны CNPC-12μ, стекловолоконные мембраны для конъюгата (PT-R5), впитывающие мембраны для проб (GFB-R4) и конечные адсорбирующие мембраны (AP045), а также нитроцеллюлозные мембраны Hi-Flow Plus HF075 (Millipore, США).

Для отделения белковых молекул от низкомолекулярных соединений использовали диализную мембрану Sigma-Aldrich (США). Все растворы готовили с использованием деионизированной воды, полученной с помощью системы MilliQ (Millipore, США).

2.2. Методы

2.2.1. Получение антисыворотки и выделение антител

Для получения антисывороток проводили иммунизацию кроликов породы шиншилла культурой бактерий (*D. solani*, *E. amylovora*, и *R. solanacearum*) из расчета 10^9 клеток на инъекцию и культурой вирусов (ХВК и YBK) из расчета 50 мкг на инъекцию. При иммунизации с недельными интервалами использовали неполный адъювант Фрейнда, 1-я и 6-я инъекции – подкожные, со 2-й по 5-ю инъекции – внутримышечные для культуры бактерий. Для культуры вирусов использовали полный адъювант Фрейнда (1-я и последняя инъекция), неполный (остальные инъекции) – все инъекции подкожные. Забор крови проводили через 7–14 дней после последней инъекции. Иммуноглобулины G выделяли из

антисыворотки осаждением насыщенным раствором сульфата аммония с последующей аффинной хроматографией на колонке с белком А-Сефароза CL-4В (Sigma-Aldrich, США).

2.2.2. Биотинилирование антител

Антитела диализовали для удаления консервирующих компонентов, потом биотинилировали согласно протоколу Германсона [157]. Биотинамидогексанол-6-аминогексановой кислоты N-гидроксисукцинимидный эфир (биотин) добавляли к антителам для присоединения аминогрупп в мольном соотношении 15:1. Смесь инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре и постоянном перемешивании. После инкубации смесь еще раз диализовали для удаления несвязанных компонентов. Диализ проводили в 50 мМ фосфатном буфере солевом, рН 7,4 (ФБС) в течение 4 ч с двукратной сменой буфера.

2.2.3. Определение концентраций антител и биотинилированных антител

Концентрации нативных и биотинилированных антител определяли спектрофотометрическим методом. Поглощение на длине волны 280 нм (A_{280}) измеряли с помощью спектрофотометра Libra S60 (Biochrom, Великобритания) в кювете с длиной оптического пути 1 мм. Концентрацию препаратов определяли из закона Бугера-Ламберта-Бера:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c,$$

где A – оптическая плотность образца на данной длине волны, ε – коэффициент молярной экстинкции, l – длина оптического пути, c – концентрация образца. Для расчета использовали коэффициент экстинкции иммуноглобулинов G, равный $1,4 \text{ мл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

2.2.4. Синтез наночастиц золота (НЧЗ)

НЧЗ синтезировали по методу Френса [155] с модификацией (см. схему в рисунке 4). Один миллилитр 1% HAuCl_4 добавляли к 95 мл деионизированной воды и нагревали до кипения. Далее добавляли 4 мл 1% цитрата натрия. Раствор НЧЗ нагревали в течение 30 мин, потом охлаждали до комнатной температуры и хранили при 4 °С.

2.2.5. Синтез наночастиц Au-Pt

Синтез наночастиц Au-Pt (см. рисунок 4) проводили по протоколу, описанному в работе Panferov и соавт. [165]. Смешивали 20 мл 1 нМ раствора НЧЗ (см. раздел 2.2.4), 4 мл 10 мМ раствора Na_2PtCl_6 и 5,3 мл H_2O в течение 1 мин при 80 ± 2 °С. Затем с помощью перистальтического насоса добавляли 4 мл 50 мМ аскорбата натрия со скоростью 400 мкл/мин. Смесь перемешивали 30 мин при 80 ± 2 °С и хранили при 4 °С.

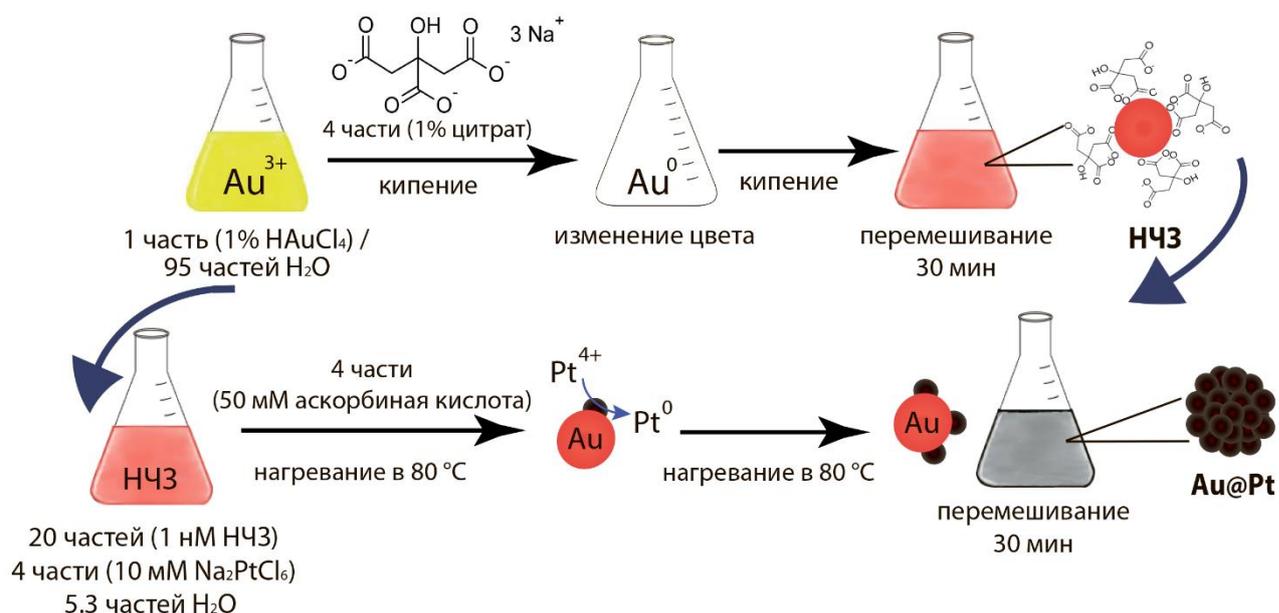


Рисунок 4. – Схема синтезов НЧЗ и Au-Pt

2.2.6. Синтез конъюгатов

Синтез конъюгатов проводили двумя методами: 1) физическая адсорбция – для конъюгатов НЧЗ и Au-Pt и 2) ковалентная иммобилизация – для конъюгатов

МЧ. На рисунке 5 представлены схемы конъюгирования наночастиц на примере антител.

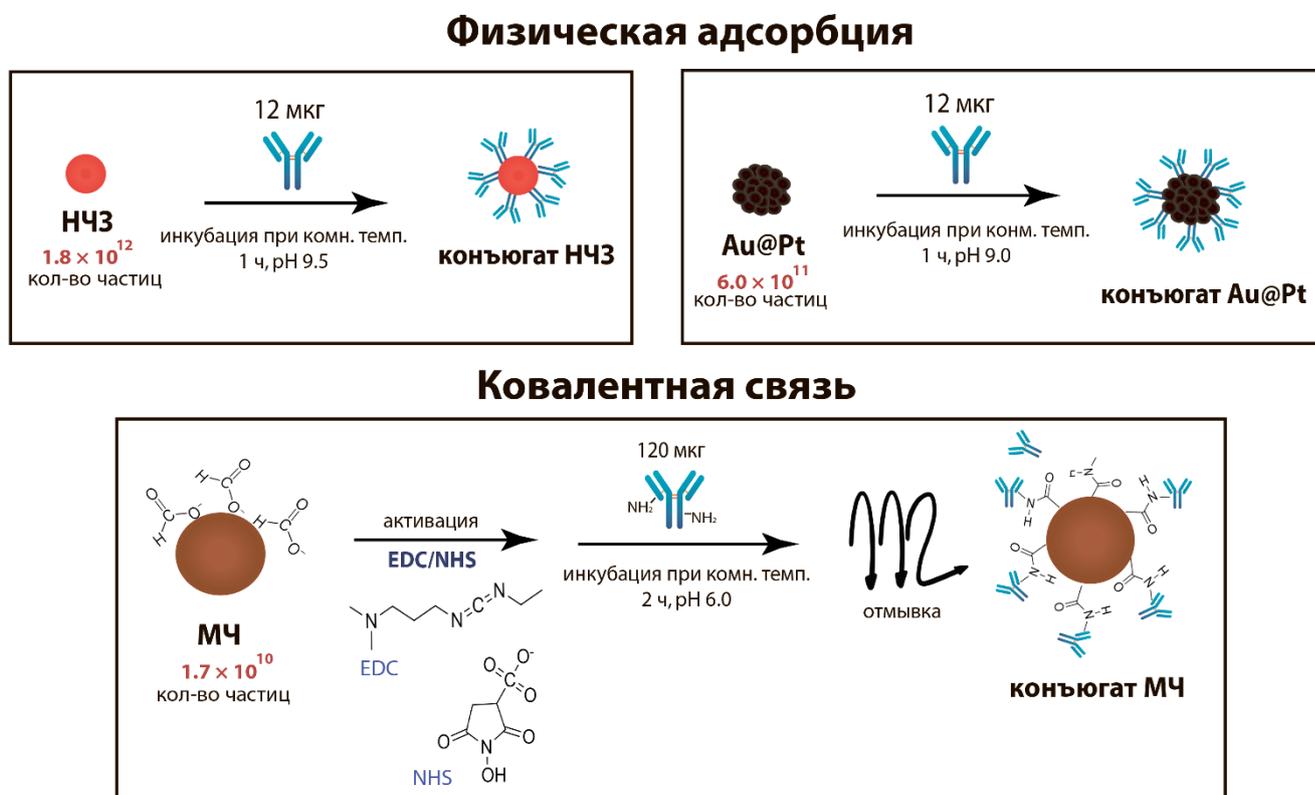


Рисунок 5. – Синтезы конъюгатов наночастиц НЧЗ, Au-Pt и МЧ

Получение конъюгатов магнитных наночастиц с антителами

Синтез проводили в соответствии с карбодиимидным методом, описанным в работе [80]. Коммерческие магнитные частицы (МЧ) (80 мкл, концентрация 2,5% w/v) промывали ФБС 2 раза. К МЧ добавляли по 500 мкл 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (EDC) (40 мМ) и N-гидроксисукцинимида (NHS) (20 мМ) для активации карбоксильных групп на поверхности МЧ и инкубировали 25 мин при комнатной температуре, перемешивая с помощью шейкера. После инкубации убирали супернатант с помощью магнита и дважды промывали МЧ. Далее добавляли 400 мкл биотинилированных мАт (300 мкг/мл). Смесь инкубировали 2 ч при комнатной температуре с постоянным перемешиванием, а затем промывали ФБС. Для блокировки активированных

карбокисльных групп добавляли 1 мл 0,5 М этаноламина и инкубировали 15 мин при комнатной температуре с использованием шейкера. Полученные конъюгаты МЧ ресуспендировали в буфере, содержащем 10 мМ трис (рН 7,4), 0,25% БСА, 0,25% Твин-20 и 1% сахарозы (тБСА), хранили при +4 °С.

Получение конъюгатов наночастиц золота с антителами

Конъюгаты НЧЗ с антителами синтезированы в соответствии с протоколом Сафенковой и др. [151]. Антитела предварительно диализовали против 10 мМ трис-НСl (рН 9,5). Раствор НЧЗ ($ОП_{520} = 1,0$) доводили до рН 9,5, добавляя 0,2 М K_2CO_3 . К НЧЗ добавляли диализированные антитела (12 мкг/мл, в соответствии с флокуляционной кривой). Смесь инкубировали 1 ч при комнатной температуре с использованием шейкера. БСА добавляли до конечной концентрации 0,25% и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Конъюгат НЧЗ – антитела и несвязанные антитела разделяли с помощью центрифуги Eppendorf (Германия), режим: 18000 g, 30 мин. Полученный конъюгат ресуспендировали в тБСА и хранили при +4 °С. Спектры НЧЗ и их конъюгатов измеряли с помощью спектрофотометра Libra S60 (Biochrom, Великобритания).

Получение конъюгатов наночастиц золота со стрептавидином

Для синтеза использовали метод, описанный в разделе 2.2.6.2, с небольшими изменениями. Стрептавидин добавляли к НЧЗ в концентрации 10 мкг/мл, выбранной по флокуляционной кривой. Для удаления навязавших компонентов центрифугировали по режиму 15000 g, и 30 мин.

Получение конъюгатов наночастиц Au-Pt с антителами

Наночастицы Au-Pt конъюгировали с пАт, специфичными к *E. amylovora*, согласно протоколу, описанному в работе Panferov и соавт. [165]. Раствор наночастиц Au-Pt доводили до рН 9,0 с помощью 0,2 М K_2CO_3 . К каждому 1 мл раствора Au-Pt (1 нМ) добавляли 12 мкг пАт. Синтез проводили при комнатной

температуре в течение 1 ч с постоянным перемешиванием. После этого добавляли БСА до конечной концентрации 0,25%. Смесь центрифугировали при 15000 g в течение 30 мин для удаления антител, не связавшихся с наночастицами Au-Pt. Синтезированные конъюгаты ресуспендировали в ттБСА.

2.2.7. Методы характеристики наночастиц и конъюгатов

Просвечивающая электронная микроскопия

Для характеристики формы и размера наночастиц и их конъюгатов использовали метод просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ).

НЧЗ, МЧ и Au-Pt и их конъюгаты адсорбировали на поверхностях сеток размером 300 меш (PELCO Grids, США), покрытых поливиниловым формалем. Для визуализации иммунных комплексов, содержащих низко контрастный ХВК, применяли дополнительное негативное окрашивание с помощью фосфорновольфрамовой кислоты [193]. Микрофотографии получали, используя просвечивающий электронный микроскоп JEM CX-100 (JEOL, Япония), работающий при 80 кВ. Изображения ПЭМ анализировали с помощью программы Image Tool (Научно-медицинский центр Техасского университета в Сан-Антонио, США).

Сканирующая электронная микроскопия

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) с использованием микроскопа JSM-6510LV (JEOL, Япония) была применена для характеристики поверхности нитроцеллюлозных мембран после ИХА. После анализа мембраны промывали водой, сушили и покрывали золотом с использованием устройства для нанесения покрытия IB-3 (EIKO, Япония). Цифровые изображения анализировали с использованием программы Image Tool (США).

Динамическое лазерное светорассеяние

Гидродинамический размер и дзета-потенциал наночастиц (НЧЗ, МЧ и Au-Pt) и их конъюгатов измеряли с использованием прибора Zetasizer Nano (Malvern Panalytical, Великобритания). Поддерживаемая температура равнялась +25 °С, а угол рассеяния составлял 173°. Статистический анализ выполняли с использованием программы Malvern вер. 7.11.

2.2.8. Метод поверхностного плазмонного резонанса

Для определения равновесных и кинетических констант взаимодействия антител с вирусным антигеном использовали метод поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с применением прибора BIAcore X (GE Healthcare, США), как описано в работе Safenkova и соавт. [79]. Иммунные комплексы, состоящие из ковалентно иммобилизованного захватывающего антитела, YBK и антител, были сформированы на поверхности чипа. Карбоксильные группы на поверхности чипа CM5 активировали добавлением 0,4 М EDC и 0,1 М NHS. Антитела к YBK были ковалентно иммобилизованы из концентрации 50 мкг/мл при pH 4,5 на чипе в течение 7 мин (скорость нанесения в ячейку с чипом – 5 мкл/мин). Непрореагировавшие группы дезактивировали этаноламином (1 М, pH 8,8) в течение 7 мин. После этого вводили YBK (10 мкг/мл) со скоростью 10 мкл/мин в течение 6 мин. Затем вводили антитела к YBK в концентрациях от 50 нМ до 330 нМ в 10 мМ HEPES буфере (pH 7,4), содержавшем 150 мМ NaCl и 0,005% Твин-20. После каждой инъекции антител чип регенерировали глицин-HCl буфером (10 мМ, pH 2,0) в течение одной минуты для удаления YBK. Константы определяли на стадии взаимодействия между YBK и введенным антителом.

Полученные данные обрабатывали с использованием программы BIAevaluation ver. 4.1 (GE Healthcare, США). При аппроксимации кинетических для всех измерений использовали отклики сенсора, регистрируемые для ассоциации от 10 до 150 сек, а для диссоциации – от 265 до 340 сек. Близость экспериментальных данных к теоретической аппроксимации описывали

статистическим параметром χ^2 . Для всех измерений значения χ^2 были ниже 10. Средние значения и ошибки для каждой кинетической константы были получены из анализа экспериментальных серий с разными концентрациями УВК.

2.2.9. Иммуноферментный анализ

ИФА в сэндвич-формате

Поликлональные антитела, специфичные к фитопатогенам, сорбировали в лунках микропланшета по 100 мкл (концентрация 1-2 мкг/мл в ФБС) при +37 °С в течение 2-4 часов либо при +4 °С в течение ночи. После каждой стадии проводили четырехкратную промывку микропланшета с помощью автоматического вошера Anthos – Fluido 2 (Biochrom, Великобритания). Далее в лунки вносили по 100 мкл антигена в ФБС-Т (концентрация бактерий – от 0 до 1×10^8 КОЕ/мл; концентрация вирусов – от 0 до 1 мкг/мл) и инкубировали 1 ч при +37 °С. Затем еще раз делали промывку, добавляли по 100 мкл биотинилированных антител (2–4 мкг/мл) в ФБС-Т и инкубировали при +37 °С в течение 1 ч. После промывки добавляли по 100 мкл раствора стрептавидин – полипероксидаза в разведении 1:3000 в ФБС-Т, инкубировали 1 ч при +37 °С. В промытый микропланшет добавляли по 100 мкл готового субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) для определения каталитической активности связавшейся метки. Через 15 минут останавливали реакцию добавлением в каждую лунку 50 мкл 1 М H₂SO₄ и измеряли оптическую плотность продуктов ферментативной реакции при 450 нм (ОП₄₅₀) с помощью микропланшетного спектрофотометра Multimode Plate Reader – Enspire (PerkinElmer, Великобритания). Полученные результаты обрабатывали с использованием программы OriginPro 9.0 (OriginLab, США).

Непрямой ИФА для характеристики антител

Моноклональные антитела сорбировали в лунках микропланшета по 100 мкл при +37 °С в течение 2 ч в концентрациях от 0,2 до 1 мкг/мл. Микропланшет промывали, как описано в разделе 2.2.8.1, вносили по 100 мкл антигена (ХВК) с концентрацией 1 мкг/мл в ФБС-Т, титровали его в лунках с шагом 2 и инкубировали 1 ч при +37 °С. Антимышьиные антитела с пероксидазой добавляли по 100 мкл (разведение 1:3000) и инкубировали 1 ч при +37 °С. Последующие действия проводили, как описано в разделе 2.2.8.

2.2.10. Приготовление тест-полосок для ИХА

Тест-полоски собирали по пяти схемам, выбор которых зависел от разрабатываемой тест-системы.

Стандартная тест-полоска (рисунок б-а). Использовали нитроцеллюлозные мембраны (CNPC-12μ), стекловолоконные мембраны для конъюгата (PT-R5), впитывающие мембраны (GFB-R4) и абсорбирующие мембраны (AP045) (Advanced Microdevices, Индия). Для равномерного диспергирования реагенты наносили на мембраны с помощью дозатора IsoFlow (Imagene Technology, США). В тестовой зоне адсорбировали антитела (1 мг/мл), специфичные к фитопатогенам, в контрольной зоне – антивидовые антитела или белок А (0,4–0,5 мг/мл). Все реагенты наносили по 0,15 мкл/мм в ФБС, содержащем 5% глицерина [142], а затем сушили мембраны в течение ночи при комнатной температуре или в течение 2 ч при +37 °С. Конъюгаты НЧЗ (ОП₅₂₀ = 3) наносили на стекловолоконные мембраны из расчета 1,6 мкл на 1 мм ширины.

После высыхания мембраны прикрепляли к пластиковым подложкам с нитроцеллюлозной мембраной. Мультикомпонитные мембранные листы разрезали на тест-полоски шириной 3,5 мм, используя автоматическую гильотину Index Cutter-1 (A-Point Technologies, США). Полученные тест-полоски хранили в закрытых пакетах при комнатной температуре.

Тест-полоска для ИХА с предварительным смешиванием изготавливалась из двух мембран – нитроцеллюлозной CNPC-12 μ и абсорбирующей AP045 (см. рисунок 6-б). В тестовую зону адсорбировали поликлональные антитела (1 мг/мл), в контрольную зону – белок А (0,5 мг/мл).

Тест-полоски для оптимизации сигнала. Стандартную тест-полоску модифицировали для оптимизации сигналов на тестовых зонах, собирая либо тест-полоску с впитывающей мембраной, но без стекловолоконной мембраны (рисунок 6-в), либо тест-полоску с длинной (10 мм) стекловолоконной мембраной (рисунок 6-г).

Тест-полоски для МЧ (рисунок 6-б) собирали из двух мембран – нитроцеллюлозной Hi-Flow Plus HF075 (Millipore, США) и абсорбирующей AP045. В тестовую зону адсорбировали моноклональные антитела, специфичные к ХВК (3G4) (1 мг/мл), в контрольную зону – антимышинные антитела (0,5 мг/мл).

Тест-полоски для наночастиц Au-Pt собирали в соответствии со схемой, представленной на рисунке 6-а, но вместо конъюгатов НЧЗ на стекловолоконной мембране были адсорбированы конъюгаты Au-Pt.

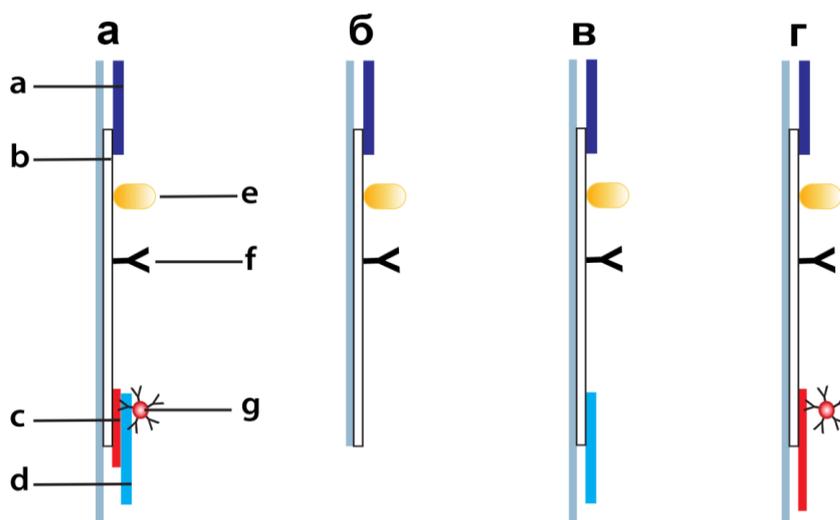


Рисунок 6. – Схемы тест-полосок для ИХА: стандартная тест-полоска ИХА (а); тест-полоска для ИХА с предварительным смешиванием (б); тест-полоски для оптимизации сигнала – (г) тест-полоска с впитывающей, но без стекловолоконной мембраны (в) и тест-полоска с длинной стекловолоконной мембраной (г).

(a) конечная абсорбирующая мембрана, (b) нитроцеллюлозная мембрана (рабочая мембрана), (c) стекловолоконная мембрана, содержащая адсорбированный конъюгат НЧЗ с антителами, (d) впитывающая мембрана для образца, (e) белок А, иммобилизованный в контрольной зоне, (f) антитела, иммобилизованные в тестовой зоне, (g) конъюгат НЧЗ с антителами

2.2.11. Подготовка растительных экстрактов

Здоровые и зараженные листья и клубни картофеля, полученные из Федерального исследовательского центра картофеля имени А. Г. Лорха, тщательно гомогенизировали в ФБС-Т в соотношении 1:10 по массе при комнатной температуре в течение 3 мин. Полученные экстракты центрифугировали (5000 g, 5 мин) и использовали для апробации разработанных тест-систем.

Для выявления *Dickeya* spp. готовили экстракт по следующей методике: из партии (200 клубней) картофеля вырезали конусы сосудистой ткани 3–5 мм в диаметре. Пробы помещали в колбу, экстрагировали бактерии в течение 16–24 ч стерильным 50 мМ ФБС, рН 7,0, и удаляли фильтрацией крупные частицы. Полученный экстракт центрифугировали в течение 10 мин при 10000 g, +4 °С. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали в ФБС-Т и использовали для анализа.

Для приготовления растительного экстракта в полевых условиях использовали разные части растений, из которых вырезали примерно 2 см², помещали в пакет с сеткой, добавляли 3 мл ФБС-Т и растирали в закрытом пакете, перемещая над сеткой неострый предмет (например, магнит, монету или ложку). Полученный экстракт пипетировали и использовали для анализа.

2.2.12. Стандартный ИХА без усиления

ИХА проводили при комнатной температуре. В стандартном ИХА конец тест-полоски (рисунок 6-а) погружали в пробу (буфер или растительный экстракт), оставляли на 10-15 мин в вертикальном положении, а потом вынимали и помещали

горизонтально на поверхность. Результат ИХА визуально оценивали по окрашиванию тестовой зоны, свидетельствующему о присутствии фитопатогена в пробе, и контрольной зоны, подтверждающей исправность тест-полоски.

2.2.13. ИХА с модификациями для снижения предела обнаружения

ИХА на основе НЧЗ с предварительным смешиванием

Отличие этого метода от стандартного ИХА заключается в том, что конъюгаты НЧЗ предварительно смешиваются с пробой, а не адсорбируются на мембране для конъюгата, прикрепленной к тест-полоске (схему тест-полоски см. на рисунке 6-б). Мы применяли два подхода: 1) предварительное смешивание раствора конъюгата НЧЗ (6 мкл, ОП₅₂₀ = 4) и пробы (64 мкл), 2) последовательное погружение тест-полоски в пробу, а затем в раствор конъюгата НЧЗ (70 мкл, ОП₅₂₀ = 0,3) с интервалом 8 мин. Появление окрашивания визуально оценивали через 10 мин.

ИХА на основе МЧ, без усиления и с двойным усилением

В данной тест-системе использовали антитела, связывающие ХВК, и тест-полоски для крупных наноматериалов (см. рисунок 6-б). Для ИХА без усиления смешивали 80 мкл пробы и 20 мкл конъюгата МНЧ и инкубировали 10 мин. Потом тест-полоску погружали в эту смесь и контролировали окрашивание.

Для усиления применяли три подхода: 1) ИХА с магнитным концентрированием; 2) ИХА с добавлением конъюгата НЧЗ – стрептавидин; 3) ИХА с двойным усилением (с магнитным концентрированием и добавлением конъюгата НЧЗ – стрептавидин).

Первый подход. Смесь конъюгата МНЧ (20 мкл) и пробы (1 мл) инкубировали 25 мин при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Затем супернатант отделяли с помощью магнита, комплексы конъюгата МНЧ ресуспендировали в 100 мл ФБС-Т и погружали в смесь тест-полоску.

Второй подход. Смесь 80 мкл пробы и 20 мкл конъюгата МНЧ инкубировали 10 мин. Добавляли НЧЗ – стрептавидин до финальной концентрации $OP_{520} = 0,3$ и погружали в смесь тест-полоску.

Третий подход. Смесь конъюгата МНЧ (20 мкл) и пробы (1 мл) инкубировали 25 мин при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Супернатант отделяли с помощью магнита, комплексы конъюгата МНЧ ресуспендировали в 100 мл ФБС-Т. Затем добавляли НЧЗ – стрептавидин до финальной концентрации $OP_{520} = 0,3$ и погружали в смесь тест-полоску.

Для всех вариантов окрашивание визуально оценивали через 15 мин.

ИХА с усилением, основанном на увеличении размера маркера после анализа

В данной тест-системе использовали антитела, специфичные к *R. solanacearum*. Усиление сигнала проводили после стандартного ИХА в буфере и экстрактах клубней картофеля.

Для усиления в тестовую зону добавляли 20 мкл усиливающего раствора: 2 мМ гидроксилламин и 1% золотохлористовородная кислота ($HAuCl_4$) и через 3 мин промывали водой. Окрашивание визуально оценивали еще через 3 мин.

ИХА с амплификацией, основанной на каталитических свойствах Au-Pt наночастиц

ИХА проводили при комнатной температуре с использованием экстракта листьев яблони. Тест-полоски погружали в экстракт, через 10 мин визуально оценивали результат и сканировали.

Усиление сигнала проводили, инициируя реакцию, катализируемую нанозимом при добавлении хромогенного субстрата на основе 3,3'-диаминобензидина (ДАБ). В тестовую зону добавляли 20 мкл субстратного раствора: 0,05% ДАБ, 0,03% H_2O_2 и 0,05% $NiSO_4 \times 7 H_2O$ в 50 мМ ФБС, pH 7,2. Окрашивание визуально оценивали через 5 мин.

ИХА в полевых условиях

Каждый из рассмотренных выше вариантов ИХА может быть проведен во внелабораторных условиях в соответствии с последовательностью действий, представленной на рисунке 7.

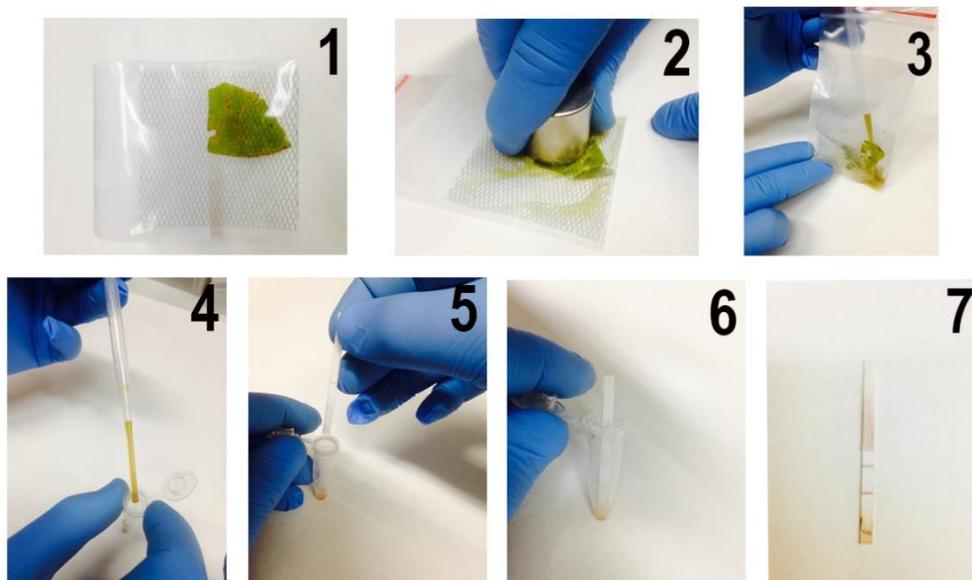


Рисунок 7. – Схема проведения ИХА в полевых условиях. 1–3 приготовление растительного экстракта; 4 – перенос экстракта в пробирку; 5–6 – погружение тест-полоски в пробирку, 7 – визуальная оценка результатов анализа

Обработка полученных данных ИХА

Для обработки данных и определения пределов обнаружения тест-полоски сканировали с использованием сканера Canon 9000F Mark II (Япония). Изображения тест-полосок обрабатывали с помощью программы TotalLab TL120 (Nonlinear Dynamics, Великобритания) и строили зависимости интенсивностей окрашивания тестовых зон от концентраций фитопатогенов, используя программу OriginPro 9.0 (OriginLab, США).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Получение и характеристика сывороток

Для получения сывороток, специфичных к выбранным фитопатогенам, кроликов породы шиншилла иммунизировали бактериями *D. solani* (DSM 28711), *E. amylovora* (CFBP 1430), *R. solanacearum* (Rs 0249) и УВК.

В результате иммунизации получено по четыре антисыворотки к *D. solani* и *E. amylovora* и по 2 антисыворотки к *R. solanacearum* и УВК. Их специфичность и титры охарактеризованы методом ИФА в непрямом формате, основанном на формировании в микропланшете тройного комплекса (иммобилизованный антиген – тестируемая антисыворотка – меченное ферментом антивидовое антитело). ИФА проведен при сорбции бактерий *D. solani* и *P. atrosepticum* в лунках микропланшета из концентраций 10^8 КОЕ/мл. Результаты приведены на рисунке 8-а; титры полученных антисывороток отличаются незначительно, максимальный титр (1×10^7) показали две сыворотки – № 1 и 2.

Для оценки специфичности полученные антисыворотки тестировали с использованием близкородственного патогена – бактерии *P. atrosepticum*, также вызывающей симптому черной ножки. Титр антисывороток относительно *P. atrosepticum* был на два порядка ниже специфического (рисунок 8-б). При связывании с *P. atrosepticum* антисыворотки № 1 и 2 показали сигнал в два раза ниже, чем антисыворотки № 3 и 4. В соответствии с полученными результатами для дальнейшей работы IgG были выделены из антисывороток № 1 и 2.

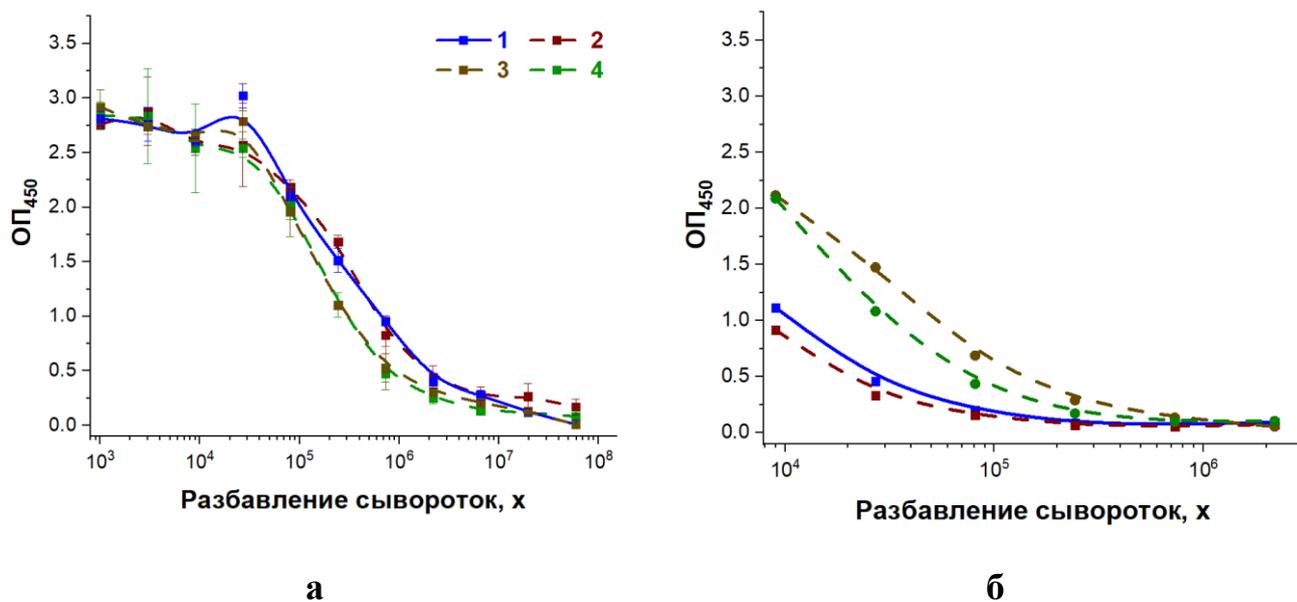


Рисунок 8. – Сравнение антисывороток, специфичных к *D. solani*, методом ИФА при сорбции в лунках микропланшета бактерий *D. solani* (а) и *P. atrosepticum* (б):

Цифры 1–4 – номера сывороток

Для остальных полученных антисывороток к фитопатогенам (*E. amylovora*, *R. solanacearum* и YBK) специфичность и титр также были охарактеризованы в непрямом формате ИФА. Начальные разведения сывороток составили 1:1000. Титром сыворотки считали разведение, для которого сигнал в ИФА соответствовал сумме среднего значения и трех стандартных отклонений OP₄₅₀ по отношению к сыворотке, служившей отрицательным контролем.

Все полученные антисыворотки показали высокие титры – от 1×10^6 до 1×10^7 – с незначительными различиями в зависимости от дня забора (рисунок 9). IgG выделяли из антисывороток, показавших максимальный сигнал: *E. amylovora* - № 1, *R. solanacearum* - № 2, YBK - № 2.

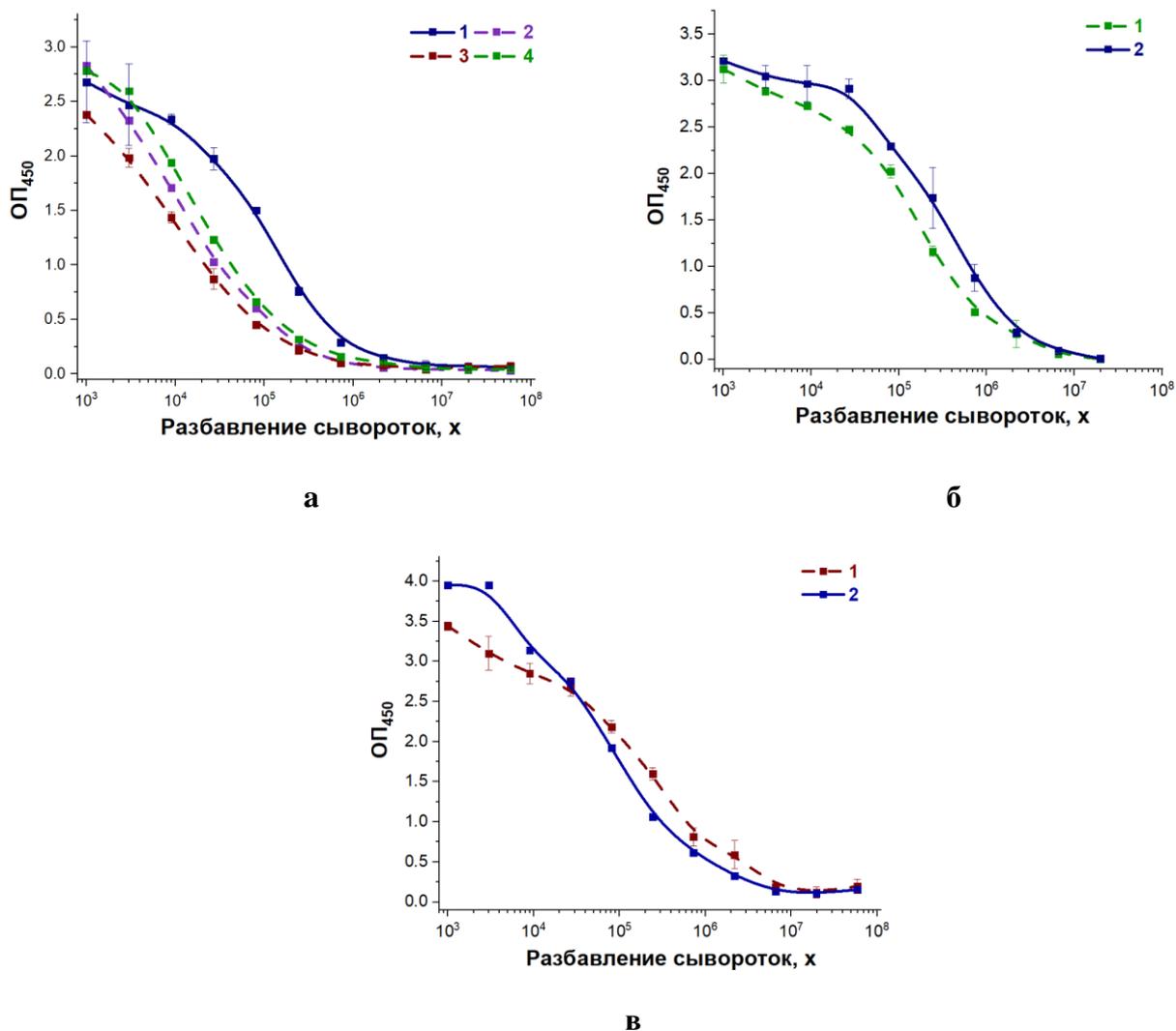


Рисунок 9. – Титры антисывороток, специфичных к *E. amylovora* (а), *R. solanacearum* (б), и YVK (в). 1–4 номера сывороток для каждого фитопатогена

3.2. Характеристика моноклональных антител, специфичных к ХВК, методом непрямого ИФА

Антиген-связывающие свойства МАТ 3G4, специфичных к ХВК, определяли методом непрямого ИФА. Был использован формат ИФА с биотинилированными моноклональными антителами (МАТ) и конъюгатом стрептавидин – пероксидаза, для реализации которого МАТ, специфичные к ХВК, предварительно

биотинилировали. Оптимизация условий ИФА для достижения максимальной чувствительности анализа включала выбор концентрации специфических антител, которую варьировали от 0,2 до 1 мкг/мл. Полученные концентрационные зависимости связывания приведены на рисунке 10.

Снижение концентрации антител приводит к формированию меньшего количества иммунных комплексов, выявляемых конъюгатом стрептавидин – пероксидаза. Как следствие, снижаются количество связанных молекул фермента, количество актов ферментативной реакции и количество трансформированных (окрашенных) молекул субстрата. Как видно из рисунка 10, концентрация иммобилизованных антител в рассматриваемом диапазоне не влияет на предел обнаружения ХВК. Даже при концентрации иммобилизованных антител 0,2 мкг/мл ИФА на основе мАт характеризуется пределом обнаружения 10 нг/мл ХВК. Таким образом, мАт 3G4 обладают высокой антиген-связывающей активностью и могут быть использованы при разработке ИХА ХВК.

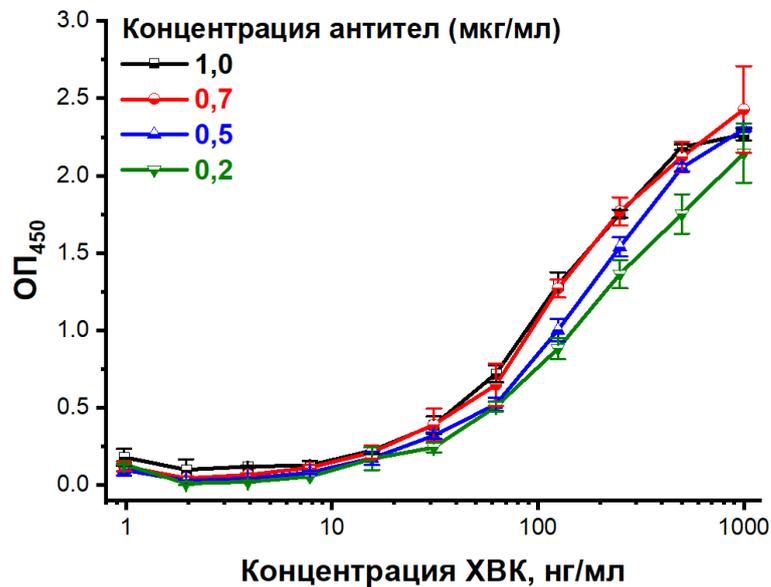


Рисунок 10. – Концентрационные зависимости связывания ХВК в системе ИФА при взаимодействии с мАт 3G4, сорбированными в лунках микропланшета в концентрациях 1, 0,7, 0,5, и 0,2 мкг/мл

3.3. Характеристики поликлональных антител, специфичных к фитопатогенам

Для антител, выделенных из антисывороток, методом ИФА подтверждена высокая антиген-связывающая активность относительно бактерий *D. solani* (рисунок 11). Антитела при концентрации 1 нг/мл и выше распознавали клетки *D. solani*, сорбированные в лунках микропланшета. Полученные концентрационные зависимости говорят о присутствии в препаратах IgG значительного количества высокоаффинных молекул. Оба препарата перспективны для разработки иммунохроматографических тест-систем. Для дальнейшей работы использовали антитела, выделенные из антисыворотки № 1.

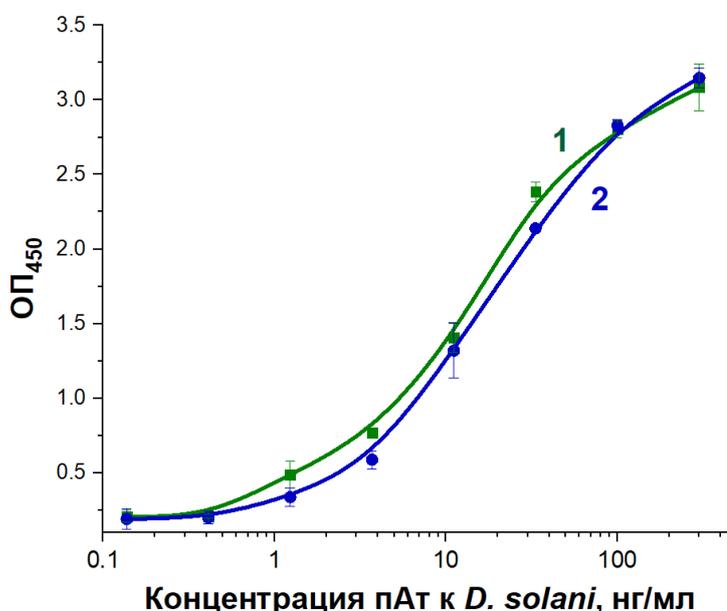


Рисунок 11. – Концентрационные зависимости связывания антител в системе, полученные методом ИФА при взаимодействии с клетками *D. solani*, сорбированным в лунках микропланшета в концентрации 1×10^8 КОЕ/мл:
1, 2 – номера сывороток, из которых выделены антитела

Полученные поликлональные антитела, специфичные к *E. amylovora* и УВК, были охарактеризованы в сэндвич-ИФА, который был проведен при различных концентрациях *E. amylovora* и УВК в ФБС-Т и экстрактах листьев. В лунках микропланшета формировали комплекс состава [сорбированные специфические

антитела – антиген – специфические антитела, модифицированные биотином, – конъюгат стрептавидин – пероксидаза].

Результаты ИФА для антител к *E. amylovora* представлены на рисунке 12-а. Наибольшее сродство к *E. amylovora* и лучшее соотношение сигнал/шум показал препарат пАт-1. Минимальная детектируемая концентрация *E. amylovora* в сэндвич-ИФА составила 5×10^3 КОЕ/мл (рисунок 12-б).

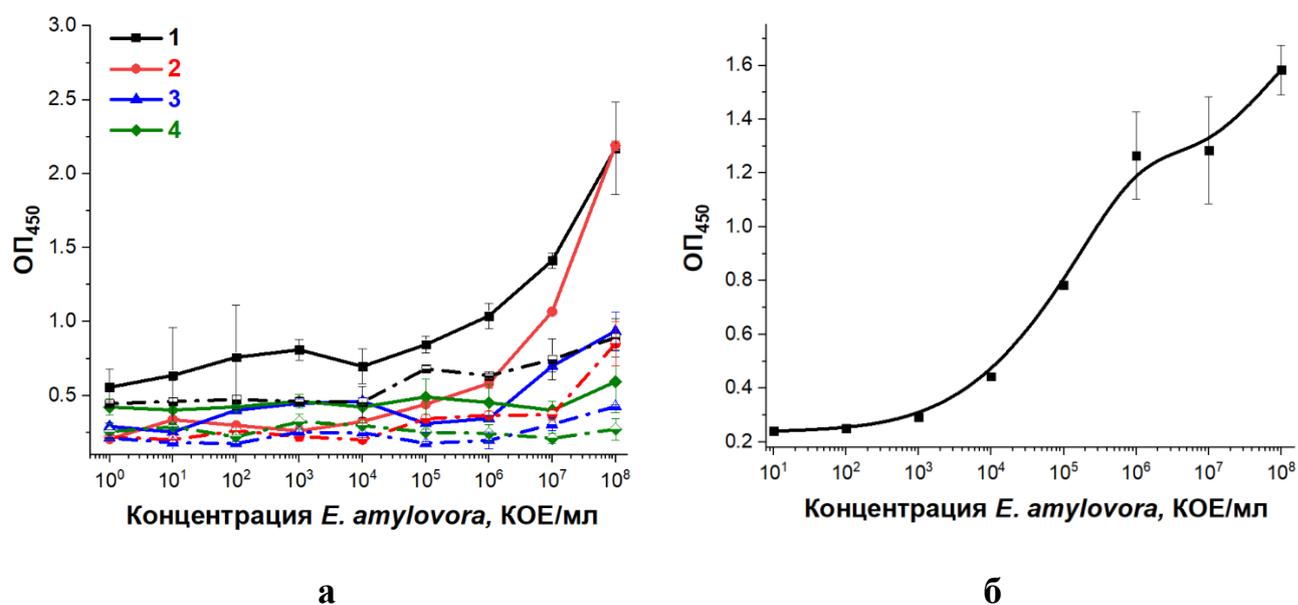


Рисунок 12. – Концентрационные зависимости связывания *E. amylovora* со специфическими антителами в сэндвич ИФА: (а) для четырех пАт прямая линия соответствует штамму CFBR 1430, пунктир – штамму VНИКР KE 37; (б) для пАт-1 после оптимизации условий ИФА

Для антител, специфичных к УВК, предел обнаружения УВК методом сэндвич-ИФА в буферном растворе и в экстрактах составил 4 нг/мл. Существует три основных штамма УВК: обычный штамм (УВК^О), штамм С (УВК^С) и штамм некроза (УВК^Н). Однако серологически отличаются два типа белка оболочки УВК, соответствующие серотипам N и O [194]. Результаты ИФА в экстрактах здорового картофеля показали, что для выделенных пАт перекрестная реактивность между УВК^Н и УВК^О составила 71,5%. Это высокое значение связано с поликлональной

природой антител и позволяет рассчитывать на эффективное обнаружение обоих серотипов вируса.

Методом ИФА также тестировали реакции анти-УВК антител с другими вирусами картофеля – Х-, М-, S-, А- и ВСЛК (рисунок 13-б). В концентрациях вирусов до 1 мкг/мл регистрируемые значения ОП₄₅₀ соответствовали фоновому сигналу (перекрестная реактивность – менее 0,5%), что подтвердило высокую специфичность связывания с УВК. Таким образом, полученные антитела являются эффективным инструментом для выявления основных штаммов УВК.

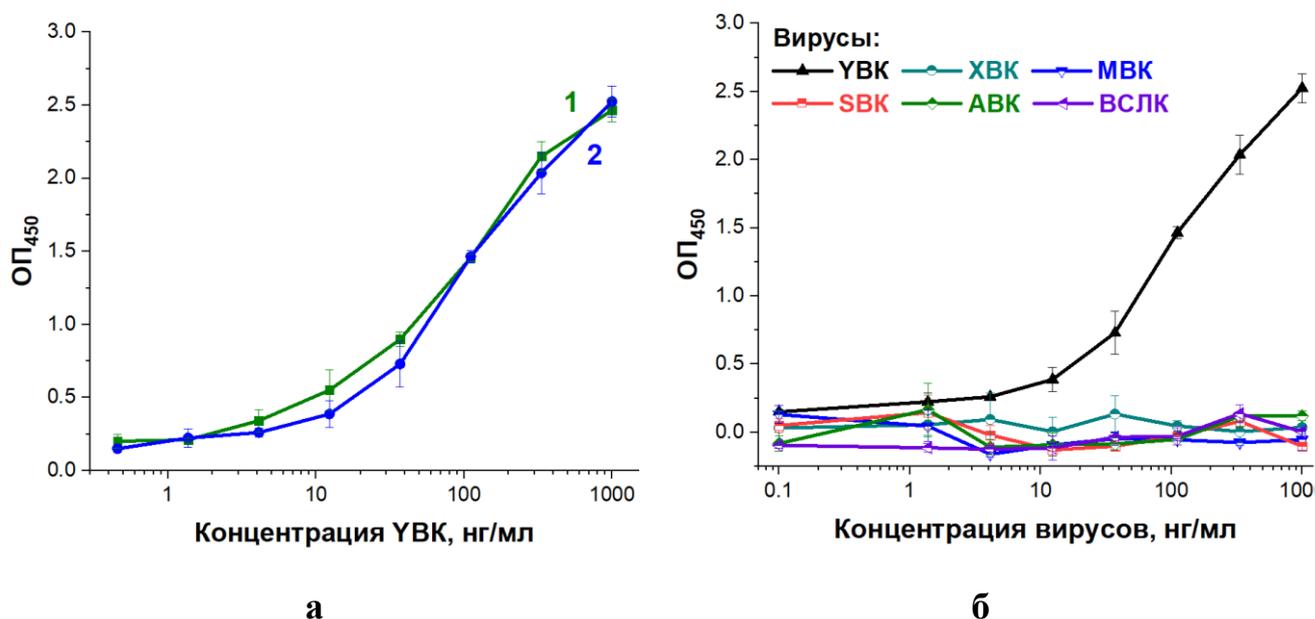


Рисунок 13. – (а) Концентрационные зависимости связывания в сэндвич-ИФА УВК со специфичными антителами: (1) в экстракте листьев картофеля и (2) в ФБС-Т. (б) Концентрационные зависимости в сэндвич-ИФА перекрестной реактивности выделенных антител к УВК по отношению к другим вирусам картофеля

3.4. Характеристика взаимодействия антител и антигенов методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР)

Метод ППР был использован для характеристики образования комплексов YBK^{N} с антителами, специфичными к YBK. Кинетические и равновесные константы взаимодействий были получены с использованием специальной сэндвич-схемы (ковалентно иммобилизованное антитело, специфичное к YBK, – YBK – антитело, специфичное к YBK), которая ранее была признана успешной для вирусов [151]. Сначала антитела, специфичные к YBK, были иммобилизованы ковалентно с высоким ответом ППР (около 5210 RU). Далее вводили YBK, связывающийся с иммобилизованными антителами. После этого были добавлены в разных концентрациях антитела, специфичные к YBK; на этом этапе проводили измерение кинетических констант. Предложенная схема обеспечивает более нативное состояние YBK при его взаимодействии с антителами по сравнению со схемой, основанной на использовании прямой иммобилизации YBK.

Полученные сенсограммы взаимодействий приведены на рисунке 14. Рассчитанные кинетические и равновесные константы диссоциации составили:

$$k_d = (3,9 \pm 0,4) \times 10^{-4} \cdot \text{с}^{-1},$$

$$k_a = (2,9 \pm 0,5) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1},$$

$$K_D = 1,4 \times 10^{-8} \text{ M}.$$

Для поликлональных антител, специфичных к ХВК, и обладающих близкой K_D ($1,05 \times 10^{-8} \text{ M}$), предел обнаружения разработанного ИХА с предварительной инкубацией конъюгата антитело – магнитная наночастица и пробы в течение 10 минут составил 3 нг/мл [80]. Это сравнение позволяет сделать заключение о перспективности полученных иммунореагентов для разработки высокочувствительного ИХА.

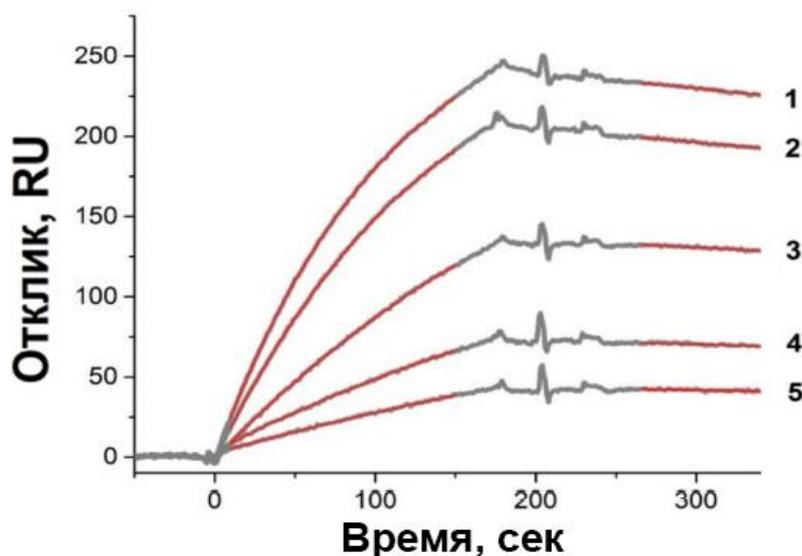
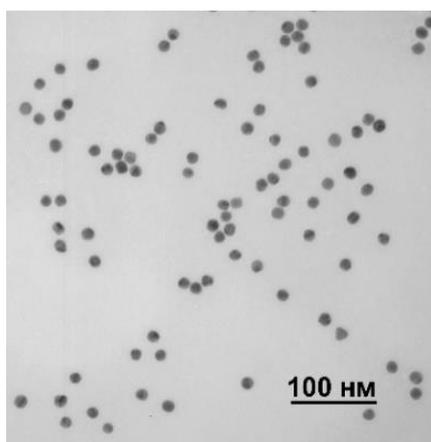


Рисунок 14. – Сенсограммы связывания анти-УВК антител с УВК^N на чипе в системе регистрации ППР. Экспериментальные данные представлены серыми линиями; результаты аппроксимации – красными линиями. Кривые 1-5 соответствуют концентрациям антител 330, 240, 160, 80 и 50 нМ

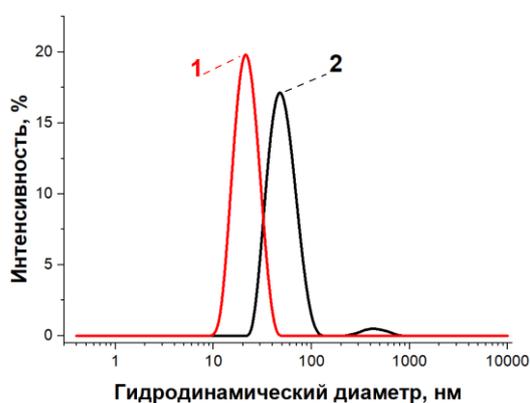
3.5. Синтез и характеристика наночастиц

В работе использовали в качестве визуально детектируемых маркеров в ИХА наночастицы золота (НЧЗ), наночастицы Au-Pt и магнитные частицы (МЧ).

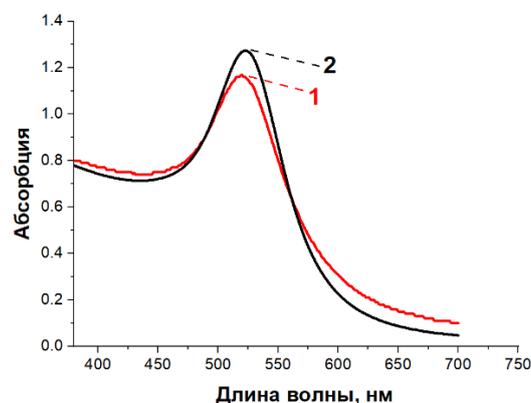
НЧЗ синтезировали по методу Френса с модификацией (см. раздел 2.2.4). По данным просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), полученные НЧЗ имеют сферическую форму со средним диаметром $17,4 \pm 1,0$ нм (рисунок 15-а). Однородность НЧЗ и отсутствие агрегатов в растворе были показаны динамическим лазерным светорассеянием (ДЛСР) (рисунок 15-б). Средний гидродинамический диаметр составил 19,5 нм. Максимум поглощения синтезированных НЧЗ – около 520 нм (рисунок 15-в, кривая 1). Приведенные характеристики НЧЗ позволяют сделать заключение об их монодисперсности.



а



б



в

Рисунок 15. – Характеристика синтезированных НЧЗ и конъюгата НЧЗ – антитело: (а) ПЭМ изображение НЧЗ; (б) распределения по гидродинамическим диаметрам, полученные методом ДЛСР, (в) спектры поглощения. 1 – НЧЗ, (2) – конъюгат НЧЗ – антитело

С использованием полученных НЧЗ синтезировали наночастицы Au-Pt. ПЭМ (рисунок 16-а) свидетельствует о сферической форме наночастиц Au-Pt с шероховатой поверхностью, напоминающей морского ежа. Эта структура образована в результате восстановления ионов Pt^{4+} на поверхности НЧЗ. Средний диаметр наночастиц Au-Pt равен $34,3 \pm 2,8$ нм, а коэффициент эллиптичности (отношение большей оси к меньшей) – $1,1 \pm 0,2$. По данным ДЛСР (рисунок 16-б) гидродинамический диаметр наночастиц Au-Pt – $48,4 \pm 8,2$ нм, полидисперсность 16,8%. Препарат Au-Pt был выраженного черного цвета без пиков поглощения в

диапазоне 300 – 900 нм. Исходя из распределения гидродинамических диаметров (данные ДЛСР), в коллоидном растворе наночастиц Au-Pt нет агрегатов.

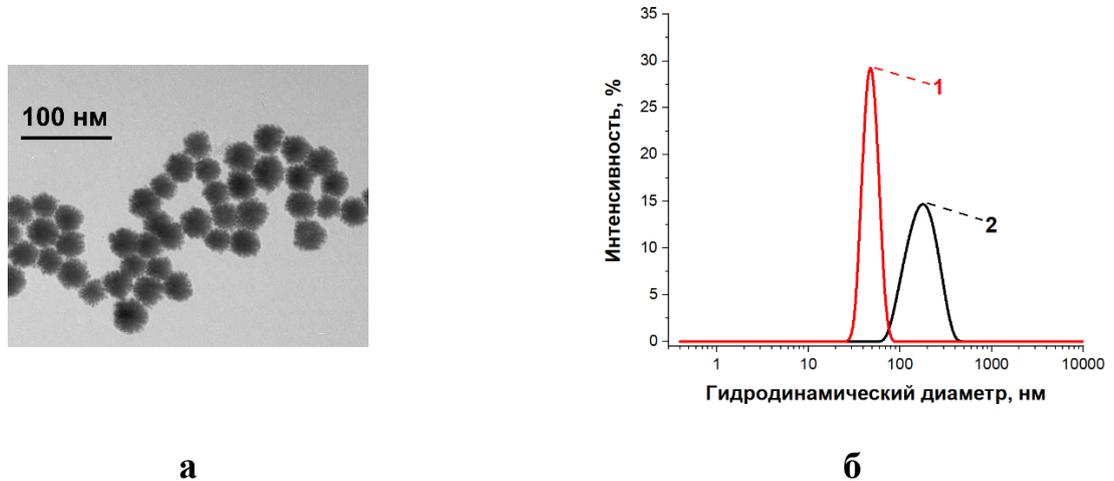


Рисунок 16. – Характеристика наночастиц Au-Pt: (а) изображение, полученное методом ПЭМ, (б) распределения гидродинамических диаметров, полученные методом ДЛСР, 1 – наночастицы, 2 – конъюгат наночастиц с антителами

Размер и форма коммерческих МЧ также были охарактеризованы с помощью ПЭМ и ДЛРС. Показана гетерогенность препарата МЧ – наличие в нем частиц с диаметром от 150 до 550 нм (рисунок 17-а). По данным ДЛСР (рисунок 17-б), средний гидродинамический диаметр МЧ составил 566 ± 155 нм, а полидисперсность – 19%.

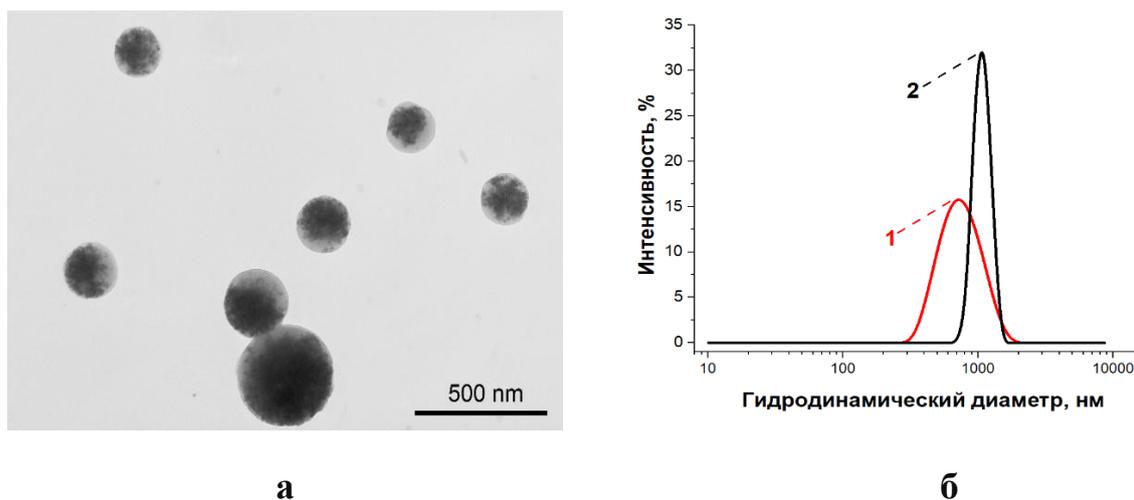


Рисунок 17. – Характеристика МЧ: (а) изображение, полученное методом ПЭМ, (б) распределения гидродинамических диаметров, полученные методом ДЛСР. 1 – наночастицы, 2 – конъюгат наночастиц с антителами

3.6. Синтез конъюгатов наночастиц с биомолекулами

Для синтеза конъюгатов использовали физическую адсорбцию, ковалентную иммобилизацию и иммобилизацию с помощью высокоаффинных молекулярных модулей: (биотин – стрептавидин, антитело – антивидовое антитело). В результате получено 7 типов конъюгатов, перечень и структурные характеристики которых даны в таблице 1.

Для характеристики синтезированных конъюгатов использовали метод ДЛСР. На рисунках 15-б, 16-б и 17-б приведены распределения гидродинамических диаметров для наночастиц (кривая 1) и их конъюгатов (кривая 2) с антителами, специфичными к *E. amylovora*. Сдвиг распределений гидродинамических диаметров при сравнении исходных наночастиц и их конъюгатов с антителами свидетельствует об успешной модификации наночастиц. Функциональную активность конъюгатов подтверждали методом ИФА – формированием в лунках микропланшетов комплексов [сорбированный патоген – конъюгат наночастиц с

антителами – антивидовые антитела, конъюгированные с пероксидазой] при разных концентрациях конъюгатов. Показано, что все конъюгаты антител распознают соответствующие антигены.

Таблица 1. – Конъюгаты наночастиц с биомолекулами и их характеристики

Наночастицы (маркеры)			Конъюгаты	
Тип	ПЭМ, средний диаметр, нм	ДЛСР, средний диаметр, нм	Конъюгированные биомолекулы	ДЛСР, средний диаметр, нм
МЧ	440	712	Биотинилированные мАт, специфичные к ХВК	1110
НЧЗ	17,4	19,5	Стрептавидин, пАт, специфичные к ХВК, УВК, <i>D. solani</i> , <i>E. amylovora</i> и <i>R. solanacearum</i>	47,2 – 91,3
Au-Pt	34,3	48,4	пАт, специфичные к <i>E. amylovora</i>	164,2

3.6.1. Характеристика конъюгатов МЧ – биотинилированные антитела и НЧЗ-стрептавидин методом ПЭМ

Стрептавидин – биотин – одно из самых сильных нековалентных взаимодействий в природе. С использованием этого взаимодействия были получены два конъюгата: МЧ – биотинилированные антитела и НЧЗ – стрептавидин. МЧ

Биотин-связывающие свойства конъюгата НЧЗ со стрептавидином определяли по формированию им комплексов с конъюгатом [МЧ с биотинилированные антитела]. Данные ПЭМ (рисунок 18) демонстрируют присутствие НЧЗ на поверхности МЧ и агрегацию МЧ, индуцируемую НЧЗ, что подтверждает биотин-связывающие свойства конъюгата НЧЗ-стрептавидин.

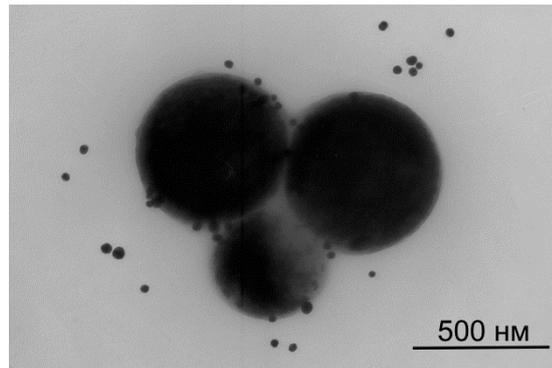


Рисунок 18. – Изображение ПЭМ – пример агрегата конъюгатов МЧ и НЧЗ

3.6.2. Функциональная характеристика конъюгатов НЧЗ –антитела

Для оценки эффективности иммобилизации антител в конъюгате НЧЗ проводили ИФА с образованием тройных комплексов [антиген – конъюгат НЧЗ со специфическими антителами – конъюгат антивидовых антител с пероксидазой]. Рассмотрим результаты эксперимента для конъюгата НЧЗ и антител, специфичных к YBK^{N} . Была сопоставлена антиген-связывающая активность конъюгата НЧЗ – анти- YBK -антитело и немодифицированных анти- YBK -антител. Результаты показали, что конъюгаты НЧЗ – антитело с $\text{OP}_{520} = 0,003$ взаимодействовали с YBK^{N} , иммобилизованным в лунках микропланшета, генерируя сигнал, соответствующий немодифицированным антителам в концентрации 12 нг/мл (рисунок 19). При синтезе конъюгата использовали 12 мкг антител на 1 мл НЧЗ с $\text{OP}_{520} = 1,0$. Таким образом, $\text{OP}_{520} = 0,003$ соответствует 36 нг/мл антител. Близкие значения антиген-связывающих активностей конъюгата, содержащего антитела в концентрации 36 нг/мл, и нативных антител в концентрации 12 нг/мл подтверждают, что антитела были успешно иммобилизованы на поверхности НЧЗ

и сохранили антиген-связывающую активность. Таким образом, полученный конъюгат НЧЗ – антитело можно использовать для разработки ИХА.

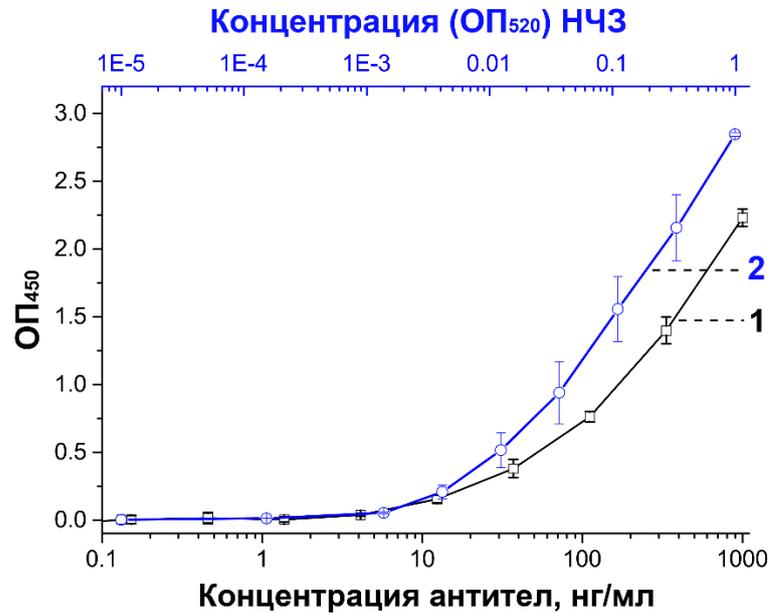


Рисунок 19. – Результаты ИФА: сравнительный анализ связывания с иммобилизованным YBK^N антитела против YBK (кривая 1) и конъюгата НЧЗ – антитело (кривая 2)

3.7. Разработка тест-систем для детекции фитопатогенов

Бактерии и вирусы являются корпускулярными поливалентными объектами, несущими на своей поверхности множество антигенных детерминант. В связи с этим в разрабатываемых иммунохроматографических тест-системах для детекции фитопатогенных бактерий (*Dickeya* spp., *E. amylovora* и *R. solanacearum*) и вирусов (ХВК и YBK) был реализован сэндвич анализ, основанный на формировании тройных детектируемых комплексов [антитело, иммобилизованное в тестовой зоне тест-полоски, – фитопатоген – антитело с меткой (НЧЗ)] (рисунок 20). Ниже представлены результаты по разработке и апробации иммунохроматографических тест-систем для детекции *Dickeya* spp. и *E. amylovora*.



Рисунок 20. – Схема сэндвич формата ИХА

3.7.1. Разработка сэндвич формат ИХА для детекции *Dickeya* spp.

В разработанной иммунохроматографической тест-системе для детекции *Dickeya* spp. использовали поликлональные антитела и их конъюгаты с НЧЗ.

Селективность тест-системы в 7 бактерий рода *Dickeya* и 15 бактерий, относящихся к фитопатогенам родов *Ralstonia*, *Clavibacter*, *Pectobacterium*, и *Pseudomonas*. Результаты ИФА и ИХА, представленные в таблице 4, свидетельствуют о связывании для всех бактерий рода *Dickeya*. Несмотря на то, что антитела были получены при иммунизации клетками *D. solani*, другие виды рода *Dickeya* – *D. dianthicola*, *D. chrysanthemi*, *D. dadantii* subsp. *dadantii*, *D. paradisiaca* и *D. dadantii* subsp. *dieffenbachiae* – не уступали иммуногенному виду, исключением являлись бактерии *D. zeae*, для которых сигнал был в 7 раз слабее. Для 15 бактерий из других родов показано отсутствие перекрестных реакций.

Мы также сравнили специфичность антител против *D. solani* и *D. dianthicola*. Предел обнаружения *D. dianthicola* (2×10^4 КОЕ/мл) был в 4 раза меньше, чем *D. solani* (8×10^4 КОЕ/мл) (рисунок 21).

Предел обнаружения *D. solani* составил 2×10^5 КОЕ/мл (рисунок 22-б), что незначительно уступает ИФА, но соответствует требованиям ГОСТ [195].

Продолжительность ИХА — 15 мин.

Таблица 2. – Результаты тестирования чистых культур бактерий (1×10^7 КОЕ/мл) методами ИФА и ИХА с использованием антител, специфичных к *Dickeya* spp.

№	Коллекции. номер ВНИИКР	Бактерия	ИФА		ИХА
			ОП ₄₅₀	Результат	Результат
1	0039	<i>Ralstonia solanacearum</i> , раса 3, bv.2	0	–	–
2	0040	<i>Ralstonia solanacearum</i> , раса 3, bv.2	0	–	–
3	0141	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	0	–	–
4	0142	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	0	–	–
5	0143	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	0	–	–
6	0144	<i>Dickeya dianthicola</i>	2,41	+	+
7	0235	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	0	–	–
8	0239	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	0	–	–
9	0240	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	0	–	–
10	0222	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	0	–	–
11	0223	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	0	–	–
12	0327	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>odoriferum</i>	0	–	–
13	0328	<i>Pectobacterium wasabiae</i>	0	–	–
14	0329	<i>Pectobacterium</i> <i>betavasculorum</i>	0	–	–
15	0330	<i>Pectobacterium cacticida</i>	0	–	–
16	0331	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	2,46	+	+
17	0332	<i>Dickeya dadantii</i> subsp. <i>dadantii</i>	1,89	+	+
18	0333	<i>Dickeya paradisiaca</i>	2,16	+	–
19	0334	<i>Dickeya zeaе</i>	0,28	+	+
20	0335	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	0	–	–
21	0336	<i>Dickeya dadantii</i> subsp. <i>dieffenbachiae</i>	2,19	+	+
22	0353	<i>Dickeya solani</i>	1,98	+	+

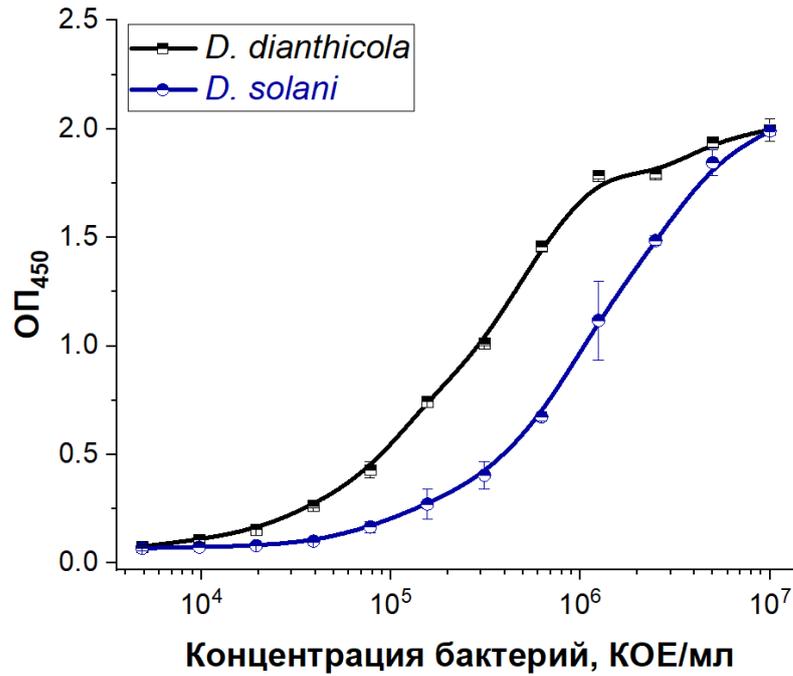


Рисунок 21. – Концентрационные зависимости ИФА для *D. solani* и *D. dianthicola*

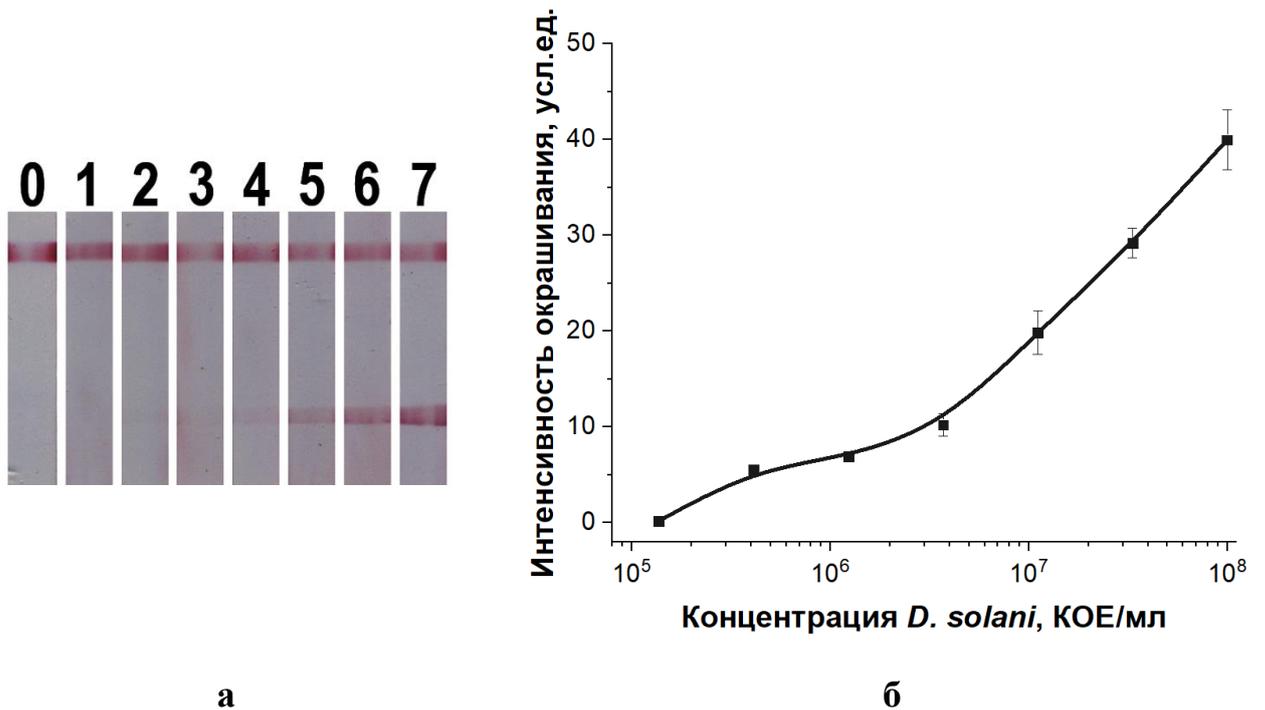


Рисунок 22. – Результаты ИХА *D. solani*. (а) Тест-полоски после анализа: 0 – отрицательный контроль; 1 – $1,4 \times 10^5$; 2 – $4,1 \times 10^5$; 3 – $1,2 \times 10^6$; 4 – $3,7 \times 10^6$; 5 – $1,1 \times 10^7$; 6 – $3,3 \times 10^7$; 7 – 1×10^8 КОЕ *D. solani* на мл. б) Зависимость интенсивности окрашивания тестовых зон от концентрации *D. solani*

Для апробации разработанной тест-системы использовали экстракты из партий семенного картофеля из разных регионов (Киргизия, Московская, Орловская, Брянская области) (таблица 3). При тестировании 43 проб, каждая из которых является суммарной для партии от 40 до 200 клубней, методом ИФА выявлено 24 зараженные пробы, в 19 пробах инфекция не обнаружена. Метод ИХА выявил меньшее количество зараженных проб – 18 положительных и 25 отрицательных. При этом ИХА подтвердил отрицательные пробы, определенные иммуноферментной системой, в 100%, а положительные – в 75% случаев. Отличия можно объяснить худшей чувствительностью ИХА, из-за которой пробы с низким содержанием *Dickeya* spp. дали в ИХА отрицательные результаты.

Таблица 3. – Результаты иммуноферментного и иммунохроматографического тестирования клубневого материала на зараженность *Dickeya* spp.

Проба*		ИФА		ИХА
№ п/п	Сорт, репродукция	ОП ₄₅₀	Результат анализа	Результат анализа
1	Леди Клер, 3 репр.	0,062	–	–
2	Опал, 3 репр.	0,088	–	–
3	Опал, 3 репр.	0,113	–	–
4	Королёк, 2 репр.	0,073	–	–
5	Леди Клер, элита	1,289	+	+
6	Леди Клер, 1 репр.	0,057	–	–
7	Остин, 1 репр.	2,358	+	+
8	Королёк, 2 репр.	0,117	–	–
9	Норт, элита	0,073	–	–
10	Барс, элита	2,111	+	+
11	Опал, 3 репр.	2,635	+	+
12	Королёк, 2 репр.	0,155	–	–
13	Импала, ССЭ	2,308	+	+
14	Ривьера, ССЭ	0,095	–	–
15	Коллете, ССЭ	0,119	–	–
16	Удача, ППП	0,120	–	–
17	Коллете, ППП	2,493	+	+
18	Дезире, ППП	0,427	+	–
19	Фиолетовый, ППП	0,656	+	–
20	Фиолетовый, ССЭ	0,303	+	–

Проба*		ИФА		ИХА
№ п/п	Сорт, репродукция	ОП ₄₅₀	Результат анализа	Результат анализа
21	Арроу, ССЭ	0,070	–	–
22	Удача, ССЭ	0,276	+	–
23	Ред Скарлет, ППП	1,477	+	+
24	Импала, ППП	2,476	+	+
25	Ред Скарлет, ССЭ	0,092	–	–
26	Дезире, ССЭ	0,730	+	–
27	Ривьера, ППП	0,116	–	–
28	Гранд, ППП	0,439	+	+
29	Варяг, ППП	0,991	+	–
30	Кумач, ППП	2,395	+	+
31	Гулливер, ППП	0,092	–	–
32	Метеор, ППП	1,800	+	+
33	Ред Леди, элита	1,977	+	+
34	Королева Анна, элита	0,170	–	–
35	Ред Скарлет, РС-1	0,110	–	–
36	Санте, элита	0,092	–	–
37	Гала, 3 репр.	2,818	+	+
38	ВР-808, 2 репр.	2,281	+	+
39	Брук, 1 репр.	2,120	+	+
40	Леди Клер, 2 репр.	2,386	+	+
41	Леди Клер, 2 репр	0,789	+	+
42	Гала, 2 репр.	1,177	+	+
43	Накра, мини-клубни	0,064	–	–

* Пробы получены: 1–12 – из Киргизии; 13–32, 37–42 – из Московской области; 33–36 – из Орловской области; 43 – из Брянской области.

3.7.2. Разработка ИХА для детекции *Erwinia amylovora*

При разработке ИХА для детекции *E. amylovora* использовали ПАТ и их конъюгатов с НЧЗ.

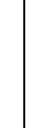
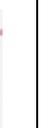
Специфичность антител проверяли с использованием нескольких штаммов *E. amylovora*: СФВР 1430, ВНИИКР РСЕ1, ВНИИКР РСЕ6, и ВНИИКР VRE33, а также близкородственных видов бактерий: *E. tasmaniensis*, *E. piriflorinigrans* и *E. billingiae*. Концентрации бактериальных суспензий равнялись 1×10^7 КОЕ/мл. Все штаммы *E. amylovora* показали сильное окрашивание в тестовой зоне тест-

полоски. *E. tasmaniensis* и *E. billingiae* – слабый сигнал, что объясняется их генетической близостью к *E. amylovora*. При этом для *E. piriflorinigrans* результат ИХА был отрицательным.

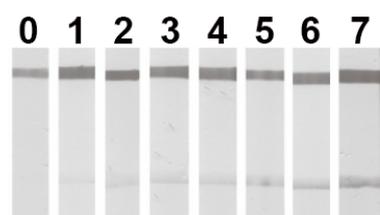
Специфичность ИХА *E. amylovora* была также проверена по отношению к неблизкородственным видам *Rahnella aquatilis*, *Dickeya solani*, *Dickeya* spp., *Pectobacterium atrosepticum* и *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (концентрация – 1×10^9 КОЕ/мл). Все результаты были отрицательными (таблица 4), что свидетельствовало о высокой специфичности ИХА *E. amylovora*.

Разработанную тест-систему далее характеризовали, проводя ИХА в буфере и экстрактах искусственно зараженных листьев яблони (рисунок 23). Для обоих вариантов предел обнаружения составил 4×10^5 КОЕ/мл.

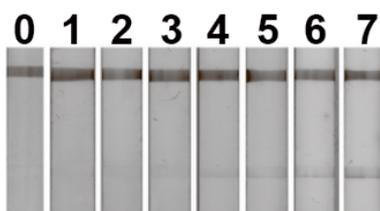
Таблица 4. – Специфичность разработанного ИХА *E. amylovora*

Бактерия, штамм	<i>E. amylovora</i> CFBR 1430	<i>E. amylovora</i> ВНИИКР RCE1	<i>E. amylovora</i> ВНИИКР RCE6	<i>E. amylovora</i> ВНИИКР VRE33	<i>E. tasmaniensis</i>	<i>E. billingiae</i>	<i>E. piriflorinigrans</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>	<i>Dickeya solani</i>	<i>Dickeya</i> sp.	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
Тест-полоска												
Результат*	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

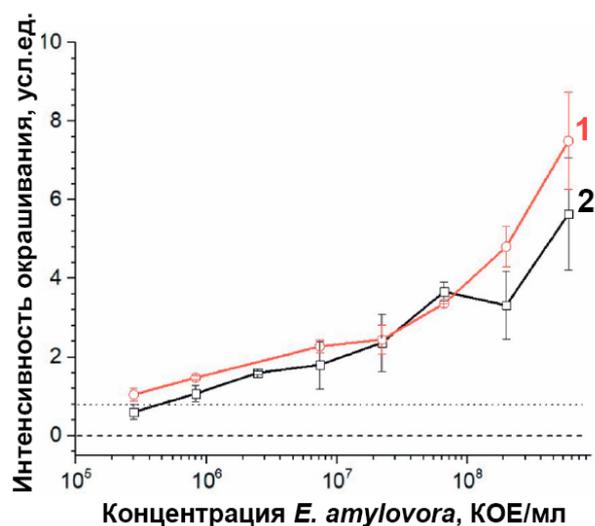
* Внешний вид через 10 мин: (+) – положительный, (-) – отрицательный результат ИХА



а



б



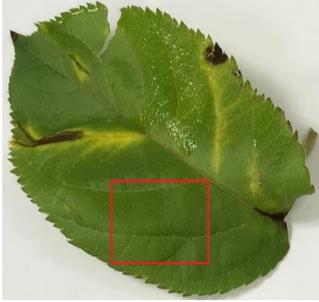
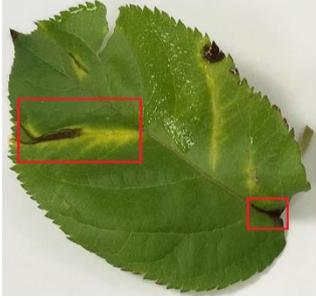
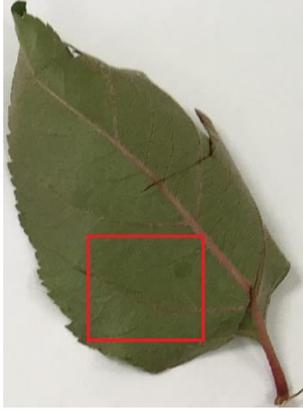
в

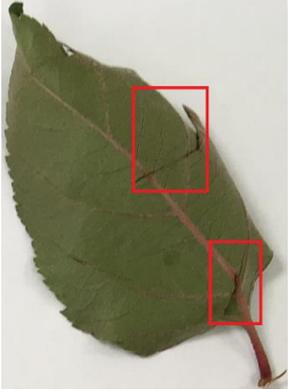
Рисунок 23. – ИХА *E. amylovora*. Внешний вид тест-полосок после проведения анализа: в буфере (а) и в растительном экстракте (б). 0 – отрицательный контроль, 1 – 8×10^5 ; 2 – 2×10^6 ; 3 – 7×10^6 ; 4 – 2×10^7 ; 5 – 6×10^6 ; 6 – 2×10^8 ; 7 – 6×10^8 КОЕ/мл. Концентрационные зависимости окрашивания тестовой зоны для ИХА в буфере (в-1) и в растительном экстракте (в-2)

Далее разработанные тест-полоски применяли для контроля *E. amylovora* в листьях растений.

Показано отсутствие ложноположительных результатов для листьев здоровых растений (яблоки, груши, черная малина) и листьев с признаками некроза, но без *E. amylovora* согласно ПЦР-тесту (таблица 5).

Таблица 5. – Результаты ИХА в листьях незараженных растений

№	Часть растений	Образец	Тест-полоска	Результат
1	Лист яблони «Богатырь»			—
2	Лист яблони «Богатырь» с некрозом			—
3	Лист яблони, подвой			—

№	Часть растений	Образец	Тест-полоска	Результат
4	Лист яблони, подвой, есть признаки инфекции			—
5	Лист малины,			—
6	Лист яблони «Богатырь»,			—

№	Часть растений	Образец	Тест-полоска	Результат
7	Лист яблони «Богатырь», с некрозом			—
8	Лист груши, с некрозом			—

Путем механической инокуляции *E. amylovora* внедрили в 25 листьев трех сортов яблони, в различные подвои и четыре листа малины. Для инфицирования использовали 8 штаммов *E. amylovora*: CFBP 1430, RCE 7, ККЕ 3, ТЕ 16, SE 56, КЕ 37, ПЛ 5 и МЕ 1. Для каждого изолята было произведено механическое заражение по крайней мере одной пары привоев древесных подвоев. Изолятом CFBP 1430 было инфицировано 14 листьев. На 7-й день заражения отобрали листья с явными повреждениями. Во всех случаях заражение подтвердилось методом ИХА. Более того, интенсивная окраска тестовых зон наблюдалась при разбавлениях экстрактов листьев вплоть до 1:2000.

Таким образом, ИХА достоверно отличал заражение *E. amylovora* от поражений растений другого генеза – см. примеры на рисунке 24. При этом регион сбора пораженных растений не влиял на эффективность диагностики. Все

результаты анализа, а также фотографии инфицированных листьев на 7-й день инокуляции представлены в Приложении А.

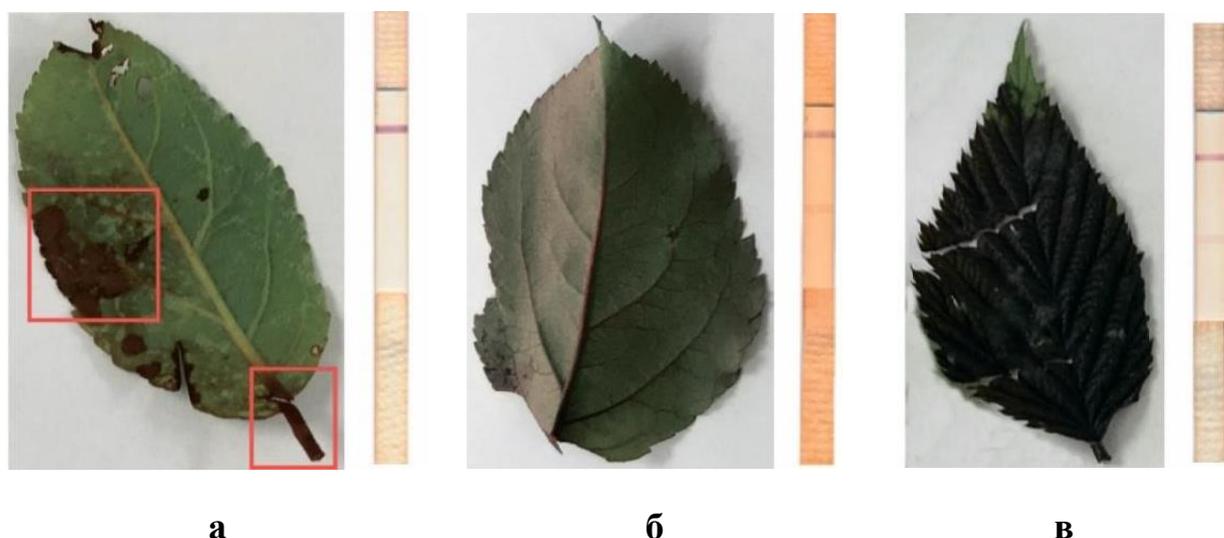


Рисунок 24. – Внешний вид тестируемых листьев и тест-полосок: (а) лист яблони, сорт «Богатырь» с некрозом этиологии невоспалительного поражения, отрицательный результат; (б) лист яблока, механически инфицированный *E. amylovora* (штамм CFBR 1430), положительный результат; (в) лист малины, механически инфицированный *E. amylovora* (штамм IL 5), положительный результат

Для апробации тест-системы проводили анализ в полевых условиях, всего тестировали 31 растение (яблоко, груша, терновник, айва, боярышник, и вишня). Для каждого растения брали от 2 до 9 проб (общее количество проб – 121), относящихся к разным органам (рисунок 25): листья, веточка, кора, плоды, цветочки и экссудат.

В таблице 8 представлены типичные изображения всех тестируемых частей растений и тест-полосок после анализа, результаты ИХА и FLASH-ПЦР (тестирование методом FLASH-ПЦР проводили коллеги из Всероссийского центра карантина растений). Методом ИХА выявлено присутствие *E. amylovora* у 28 растений, методом FLASH-ПЦР – у 30 растений. Использование нескольких проб

от одного растения (кластер) значительно повысило точность обнаружения зараженных растений, совпадение разработанного ИХА и FLASH-ПЦР составило 70,2% для отдельных проб и 93,5% для кластеров (см. Приложение Б). Установлено также, что при тестировании сосудистых частей растений вероятность обнаружения инфекции на 20% выше, чем при тестировании листьев.

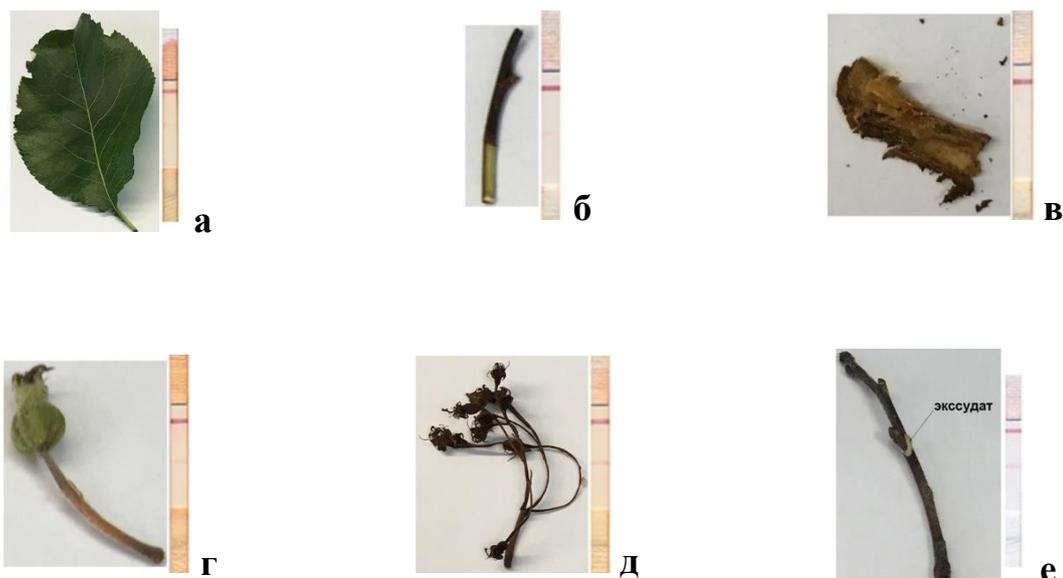


Рисунок 25. – Пробы из разных частей растений и изображения тест-полосок после ИХА *E. amylovora*. Лист (а); веточка (б); кора (в); плоды (г), цветы (д); экссудат (е)

Достигнутые пределы обнаружения иммунохроматографических тест-систем соответствуют требованиям, предъявляемым фитосанитарными нормативными документами к иммунодетекции, однако не позволяют рассчитывать на выявление инфекции у бессимптомных растений.

Для снижения предела обнаружения мы использовали несколько амплифицирующих подходов, каждый из которых представлен ниже на примере одного из патогенов, выбранных в настоящей работе.

3.7.3. Разработка ИХА с предварительным смешиванием для детекции УВК

Полученные антитела к УВК имеют невысокую аффинность.

Равновесная константа диссоциации комплекса УВК и антител к ним (K_D), определенная методом поверхностного плазмонного резонанса, составила 10^{-8} М.

С использованием этих реагентов был сначала реализован обычный сэндвич ИХА (как для детекции *E. amylovora*), для которого предел обнаружения составил 333 нг/мл УВК (рисунок 26-а; -г, кривая 3). Для снижения предела обнаружения было предложено предварительное смешивание пробы с конъюгатом. Чтобы выбрать оптимальные условия, варьировали концентрацию конъюгатов и время инкубации.

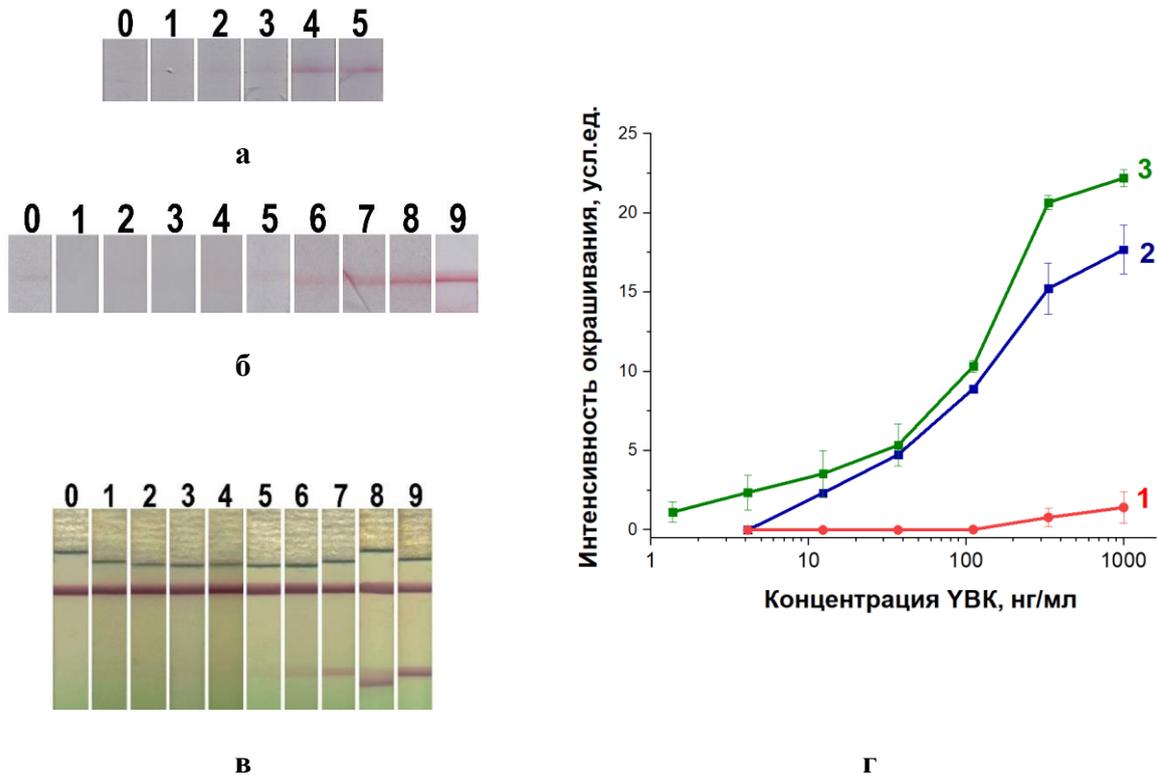


Рисунок 26. – ИХА УВК. Внешний вид тест-полосок после ИХА с предварительным смешиванием в растительном экстракте (а) и буфере (б). Тест-полоска 0 – отрицательный контроль, 1 – 0,2; 2 – 0,5; 3 – 1,4; 4 – 4; 5 – 12; 6 – 37; 7 – 111; 8 – 333; 9 – 1000 нг/мл. Обычный сэндвич ИХА (в), тест-полоска 0 – отрицательный контроль; 1 – 12, 2 – 37; 3 – 111; 4 – 333; 5 – 1000 нг/мл.

Концентрационные зависимости окрашивания в тестовой зоне при проведении ИХА УВК с предварительным смешиванием в растительном экстракте (г-1) и в буфере (г-2), а также при проведении обычного сэндвич ИХА УВК (г-3)

Проведено сравнение конъюгатов НЧЗ – антитела с $ОП_{520} = 4, 6, 8$ и 10 , адсорбируемых на стекловолоконной мембране. Как следует из рисунка 27, наибольший сигнал достигается при $ОП_{520} = 10$. Однако при этом без антигена в тестовых зонах наблюдается неспецифическое окрашивание.

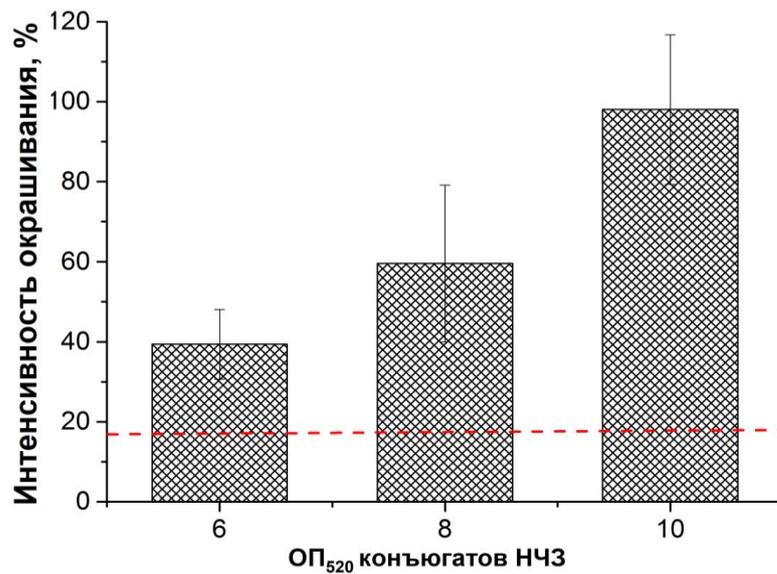


Рисунок 27. – ИХА УВК (1 мкг/мл) с разными концентрациями конъюгата НЧЗ, адсорбированными на стекловолоконную мембрану. Красная пунктирная линия соответствует средней интенсивности окрашивания тестовой зоны при $ОП_{520} = 4$ (обычный ИХА)

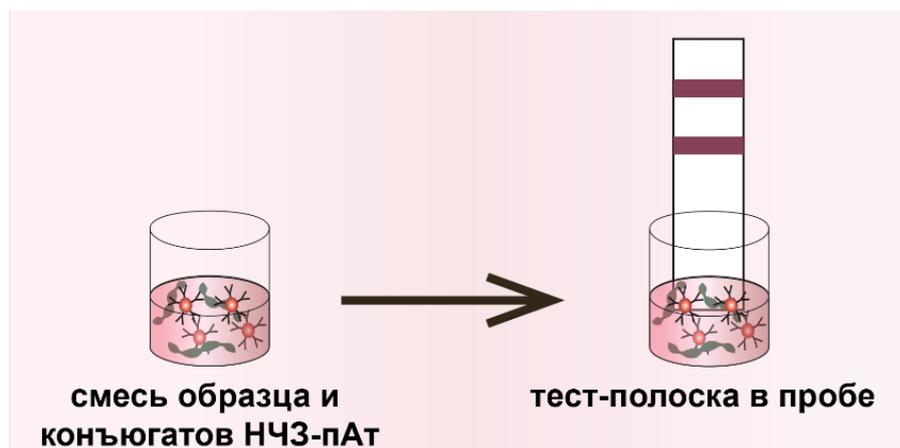


Рисунок 28. – Схема ИХА с предварительным смешиванием пробы и конъюгата НЧЗ-антитела

В качестве второго подхода проводили ИХА с предварительным смешиванием (рисунок 28). К пробе (64 мкл) добавляли конъюгат НЧЗ – антитело (6 мкл, $ОП_{520} = 4$), затем погружали тест-полоску. Для оптимизации условий ИХА варьировали время инкубации – 30 сек, 5 мин, 10 мин и 15 мин. На рисунке 29 представлены интенсивности окрашивания тестовой зоны при разном времени инкубации. Согласно полученным результатам, максимальная интенсивность достигается уже за 30 сек. Поэтому во всех дальнейших экспериментах предварительное смешивание проводили в течение 30 сек. Предел обнаружения УВК в буфере с использованием этого подхода составил 12 нг/мл (рисунок 26-б, -г, кривая 2).

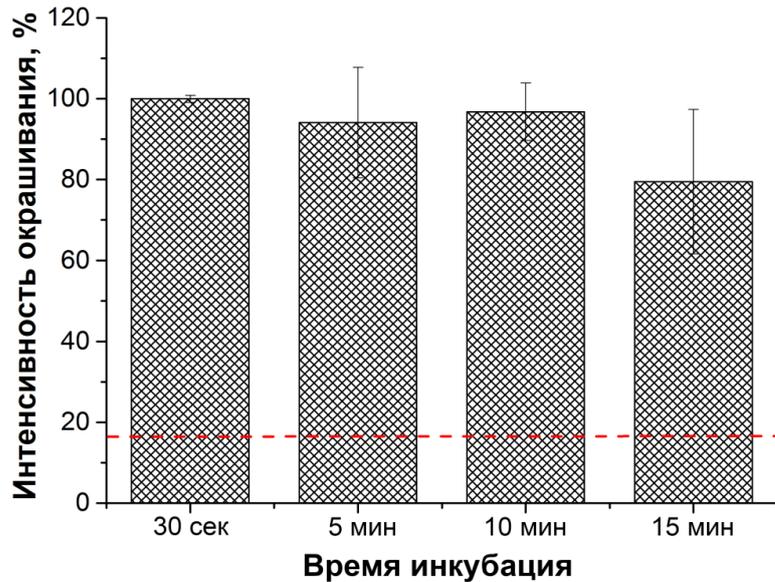


Рисунок 29. – ИХА УВК (1 мкг/мл) с добавлением к пробе в буфере конъюгатов НЧЗ-антитела при разном времени инкубации. Красная пунктирная линия соответствует средней интенсивности окрашивания тестовой зоны при проведении ИХА без прединкубации

С использованием растительного экстракта был апробирован второй подход. Предел обнаружения УВК составил 5,4 нг/мл (рисунок 26-в, -г, кривая 1).

Полученные результаты показали, что предварительное образование комплексов конъюгата НЧЗ-антитела с вирусами способствовало лучшему последующему накоплению конъюгата в тестовой зоне в составе тройных комплексов. Возможной причиной этого эффекта была агрегация (образование разветвленных комплексов между УВК и конъюгатами НЧЗ), характерная для поливалентных взаимодействий, т.е. уменьшение предела обнаружения было связано с образованием крупных агрегатов, которые обеспечивали большее содержание НЧЗ в тестовой зоне, большую интенсивность окрашивания и благодаря этому снижали предел обнаружения.

Экстракты инфицированных листьев картофеля (21 проба) тестировали с использованием ИХА с предварительным смешиванием и коммерческого ИФА. Показано, что по эффективности выявления вируса разработанный ИХА не

уступает коммерческому ИФА, а количественные результаты хорошо коррелируют друг с другом ($R^2 = 0,891$) (рисунок 30).

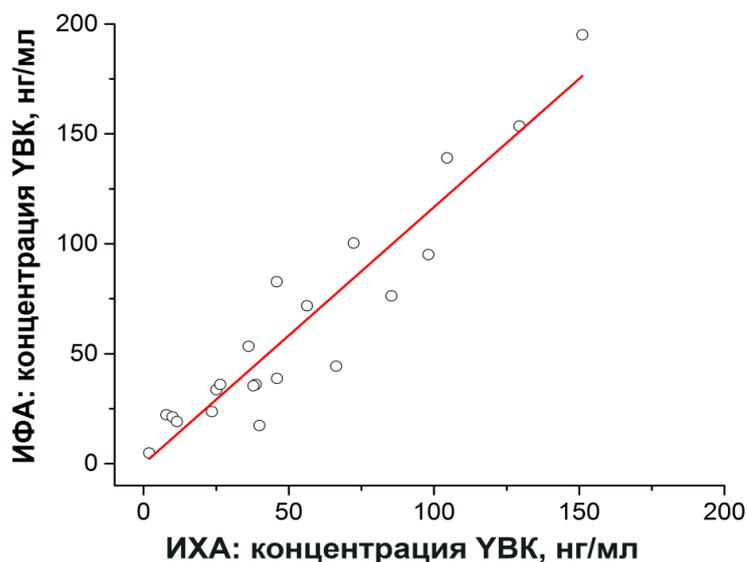


Рисунок 30. – Корреляция концентраций YVK в экстрактах листьев картофеля, определенных методами ИХА и ИФА. Круги – экспериментальные данные; сплошная линия – линейная аппроксимация

3.7.4. Разработка сэндвич ИХА ХВК с двойным усилением

Основной задачей, решаемой в этом разделе, было снижение предела обнаружения для детекции бессимптомной инфекции. Для разработанной стандартной схемы ИХА (см. разделы 3.7.1-3.7.2) предел обнаружения ХВК составил 8 нг/мл (рисунок 31-а, -б).

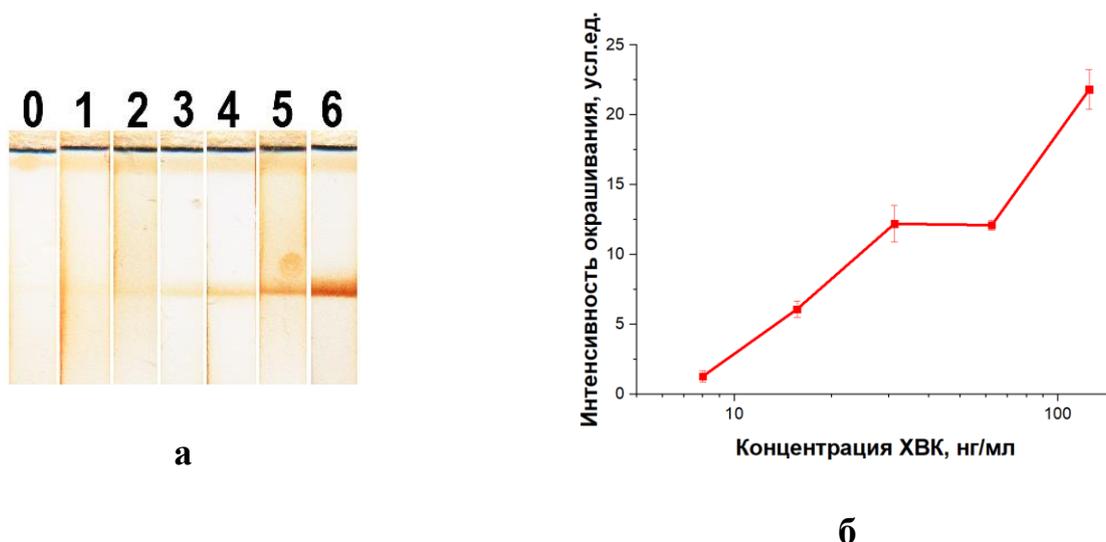


Рисунок 31. – ИХА ХВК без усиления в буфере. (а) Внешний вид тест-полосок после проведения анализа. Тест-полоска 0 – отрицательный контроль; 1 – 0,25; 2 – 1; 3 – 4; 4 – 16; 5 – 63; 6 – 125 нг/мл ХВК. (б) Зависимость интенсивности окрашивания в тестовой зоне от концентрации ХВК

Для снижения предела обнаружения мы предложили подходы, использующие концентрирование МЧ в магнитном поле и агрегации функционализированных МЧ и НЧЗ или комбинацию этих подходов (рисунок 32). В результате оптимизации определены количества используемых конъюгатов (МНЧ-биотинилированные антитела: 20 мкл; НЧЗ-стрептавидин: $OP_{520} = 0,3$), обеспечивающие минимальные пределы обнаружения.

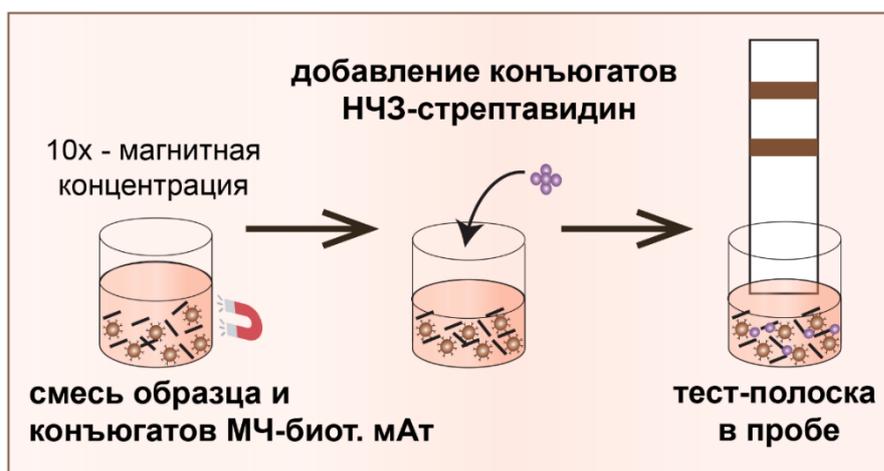
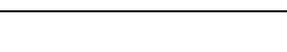
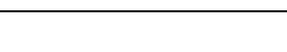
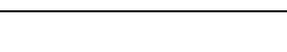
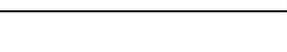
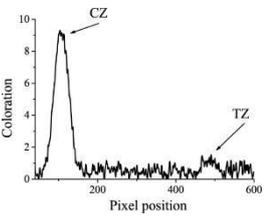
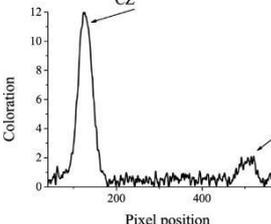
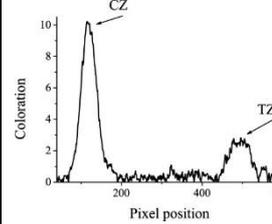
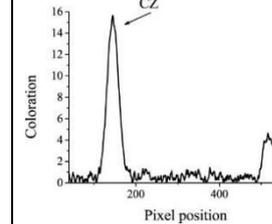
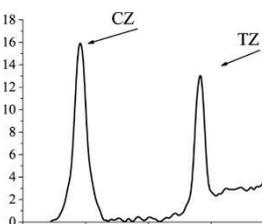
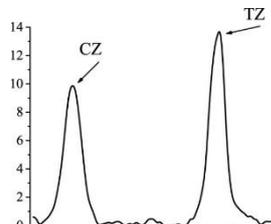
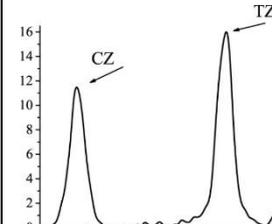
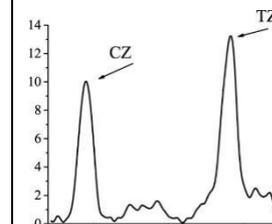


Рисунок 32. – Схема ИХА с двойным усилением

Сочетание в ИХА конъюгатов НЧЗ – стрептавидин МЧ – биотинилированные антитела приводит к образованию их комплексов, состав которых зависит от соотношения конъюгатов. С целью определения оптимума сравнили четыре концентрации конъюгата НЧЗ – стрептавидин, которые соответствуют $OP_{520} = 0,1, 0,3, 0,5$ и $1,0$. Сравнение было выполнено для ИХА без магнитного концентрирования в ФБС-Т при концентрации ХВК 20 нг/мл. Как видно из денситограмм распределения окраски в тестовых зонах (таблица 6), при $OP_{520} = 0,5$ отношение сигнал/шум максимально (после анализа проб с 20 нг/мл ХВК). Увеличение OP_{520} до 1,0 привело к высокой неспецифической окраске тестовой зоны после анализа образцов без ХВК и снижению отношения сигнал/шум после анализа образцов с 20 нг/мл ХВК. Отличие тестовых зон по цвету – коричнево-оранжевый для МЧ и розово-красный для МЧ+НЧЗ свидетельствует о формировании гетероагрегатов наночастиц.

Таблица 6. – Сравнение внешнего вида и денситограмм тест полосок при проведении ИХА ХВК с использованием конъюгата МНЧ – биотинилированные антитела и разных концентраций конъюгата НЧЗ – стрептавидин

Конъюгат НЧЗ – стрептавидин (OP_{520})				
0,1				
0,3				
0,5				
1				
Тест-полоски после анализа проб без ХВК				
Тест-полоски				
				
				
				

Конъюгат НЧЗ – стрептавидин (ОП₅₂₀)				
	0,1	0,3	0,5	1
Денситограммы				
S/N*	3	4,4	5,6	7,6
Тест-полоски после анализа проб с 20 нг/мл ХВК				
Тест-полоски				
Денситограммы				
S/N*	43,9	64,1	70,6	17,3

*S/N – соотношение сигнал/шум.

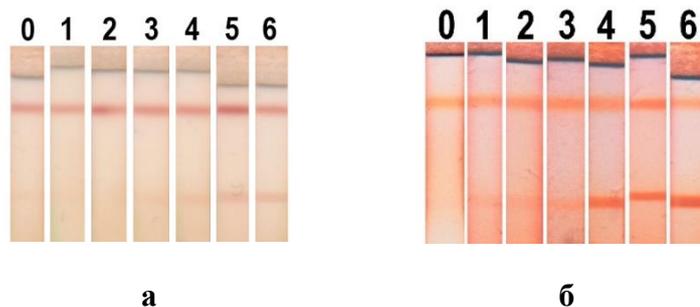
CZ – контрольная зона (КЗ), TZ – тестовая зона (ТЗ)

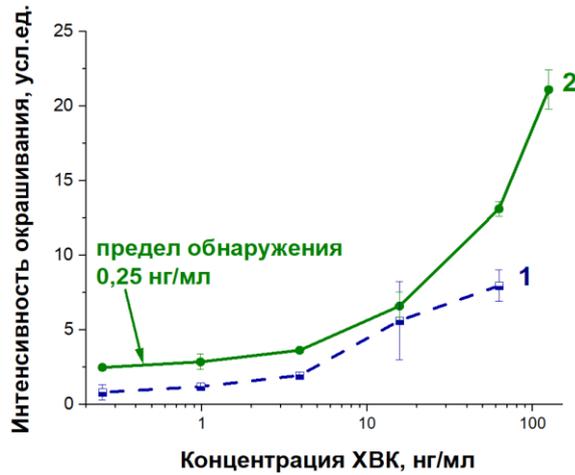
Тест-системы, полученные с использованием разных подходов, сравнили на серии проб с разными концентрациями ХВК (от 0 до 125 нг/мл) в буферном растворе. В таблице 7 представлены полученные пределы обнаружения ХВК. В случае двойного усиления предел обнаружения снизился в 32 раза – до 0,25 нг/мл. Два других подхода снизили предел обнаружения в 2 раза – до 4 нг/мл.

Таблица 7. – Сравнение пределов обнаружения ХВК для ИХА без усиления и с разными вариантами усиления

№	Амплификация ИХА	Предел обнаружения, нг/мл	
		в буфере	в экстракте
1	Стандартный ИХА	8,0	–
2	Концентрирование МЧ в магнитном поле – да . Агрегация конъюгатов МЧ и НЧЗ – нет	4,0	–
3	Концентрирование МЧ в магнитном поле – нет . Агрегация конъюгатов МЧ и НЧЗ – да	4,0	4,0
4	<u>Двойное усиление</u> Концентрирование МЧ в магнитном поле – да . Агрегация конъюгатов МЧ и НЧЗ – да	0,25	0,25

Апробацию разработанных тест-систем для детекции ХВК проводили для наиболее перспективных вариантов усиления – с агрегацией МЧ с НЧЗ и без концентрирования МЧ в магнитном поле (рисунок 33-, -в, кривая 1) и с двойным усилением (рисунок 33-в, -д, кривая 2). Результаты апробации существенно не отличались по пределам обнаружения от ИХА ХВК в буфере.





в

Рисунок 33. – Результаты ИХА ХВК в растительном экстракте. Внешний вид тест-полосок после проведения анализа: (а) ИХА с агрегацией МЧ и НЧЗ, но без концентрирования МНЧ в магнитном поле, (б) двойное усиление. Тест полоска 0 – отрицательный контроль; 1 – 0,25; 2 – 1; 3 – 4; 4 – 16; 5 – 63; 6 – 125 нг/мл ХВК. (в) Зависимости интенсивности окрашивания в тестовой зоне от концентрации ХВК: 1 – ИХА с агрегацией конъюгатов МНЧ и НЧЗ, но без концентрирования МНЧ в магнитном поле, 2 – двойное усиление

Экстракты листьев картофеля (40 проб) тестировали методом ИХА с двойным усилением и коммерческим ИФА. Показано, что по эффективности выявления вируса разработанный ИХА не уступает коммерческому ИФА, а количественные результаты хорошо коррелируют ($R^2 = 0,935$) (рисунок 34).

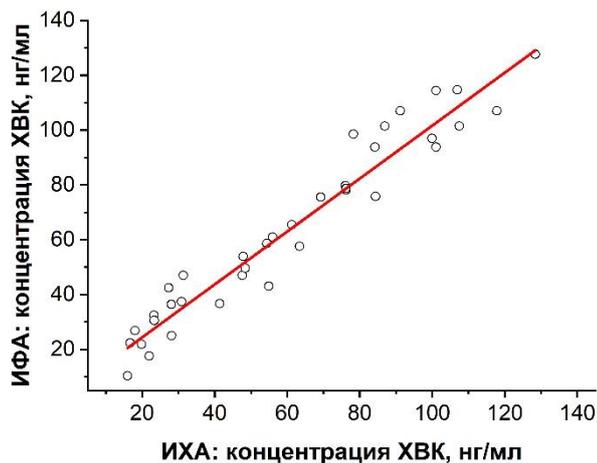
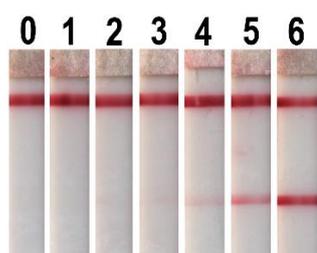


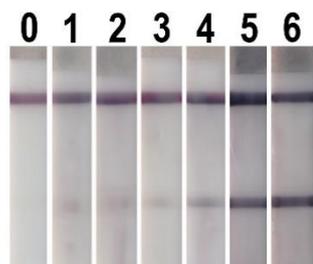
Рисунок 34. – Корреляция концентраций ХВК в экстрактах листьев картофеля, определенных методами ИХА и ИФА. Кружки – экспериментальные данные; сплошная линия – линейная аппроксимация

3.7.5. Разработка сэндвич ИХА *R. solanacearum* с усилением, основанным на увеличении размера маркера после анализа

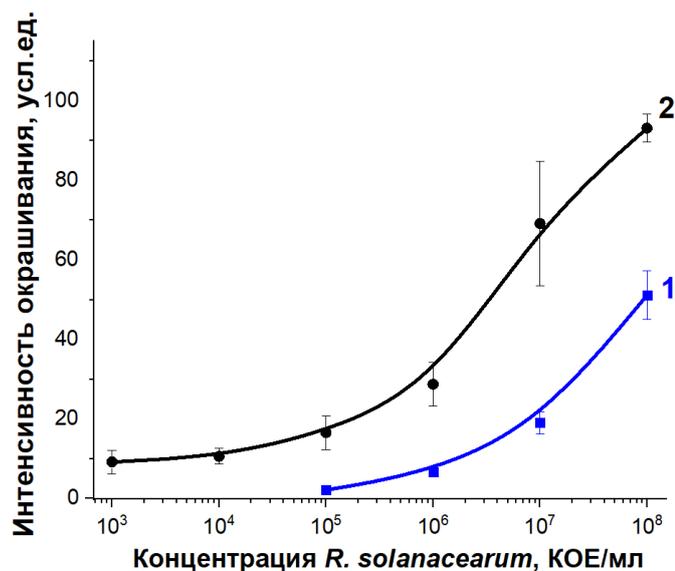
При использовании стандартной сэндвич схемы ИХА предел обнаружения *R. solanacearum* в буфере составил 1×10^6 КОЕ/мл (рисунок 35-а, -в, кривая 1). Для снижения предела обнаружения использовали «золотое усиление» – увеличение размера маркера (НЧЗ) после анализа (рисунок 36).



а



б



в

Рисунок 35. – Результаты ИХА *R. solanacearum* в растительном экстракте. Внешний вид тест-полосок после проведения ИХА: без усиления (а) и с «золотым усилением» (б). 0 – отрицательный контроль; 1 – 10^3 ; 2 – 10^4 ; 3 – 10^5 ; 4 – 10^6 ; 5 – 10^7 ; 6 – 10^8 КОЕ/мл. (в) Зависимости интенсивности окрашивания в тестовой зоне от концентрации *R. solanacearum* без усиления (в-1), и с «золотым усилением» (в-2)

После проведения обычного ИХА на тестовую зону наносили усиливающий раствор, содержащий гидроксилламин и HAuCl_4 . В результате на поверхности НЧЗ ионы тетрахлораурата (III) восстанавливались гидроксилламином, что приводило к увеличению размеров НЧЗ.

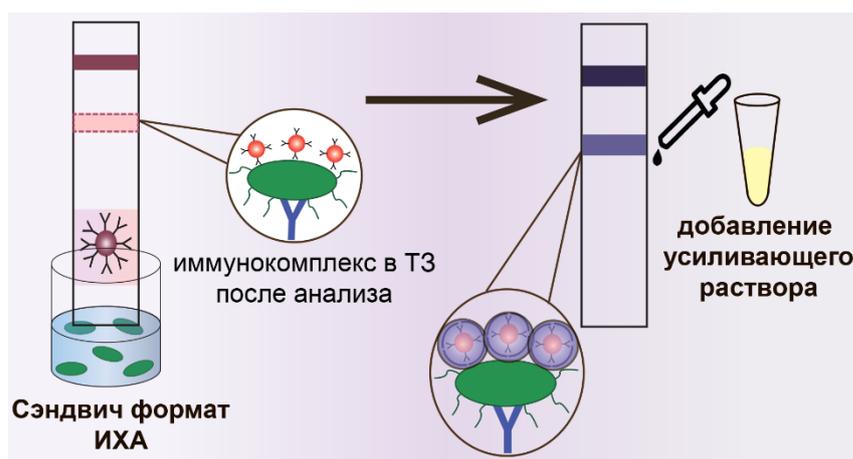


Рисунок 36. – Схема ИХА с «золотым усилением»

Внешний вид тест-полосок после ИХА с усилением при разных концентрациях гидроксиламина (от 0,5 до 10 мМ) показан в таблице 8; соответствующие концентрационные зависимости ИХА *R. solanacearum* приведены на рисунке 37. Концентрации гидроксиламина, равные 1 и 0,5 мМ, вызывали небольшое увеличение сигнала. Высокие концентрации гидроксиламина (от 2 до 10 мМ) вызывали изменение цвета с красного на темно-фиолетовый, значительно усиливая сигнал. Однако при концентрациях гидроксиламина выше 2 мМ наблюдались неспецифическое окрашивание. В результате пределы обнаружения при концентрациях от 0,5 до 10 мМ составили 3×10^5 , 1×10^5 , 2×10^4 , 6×10^4 и 4×10^4 КОЕ/мл. Максимальная достоверность анализа и минимальный предел обнаружения обеспечивались при концентрации гидроксиламина 2 мМ, которая и использовалась в дальнейших экспериментах.

Таблица 8. – Оптимизация концентрации гидроксиламина в усиливающем растворе при проведении ИХА *R. solanacearum*

Гидроксиламин, мМ	<i>R. solanacearum</i> , КОЕ/мл						
	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	0 (контроль)
0,5							
1							
2							
5							
10							

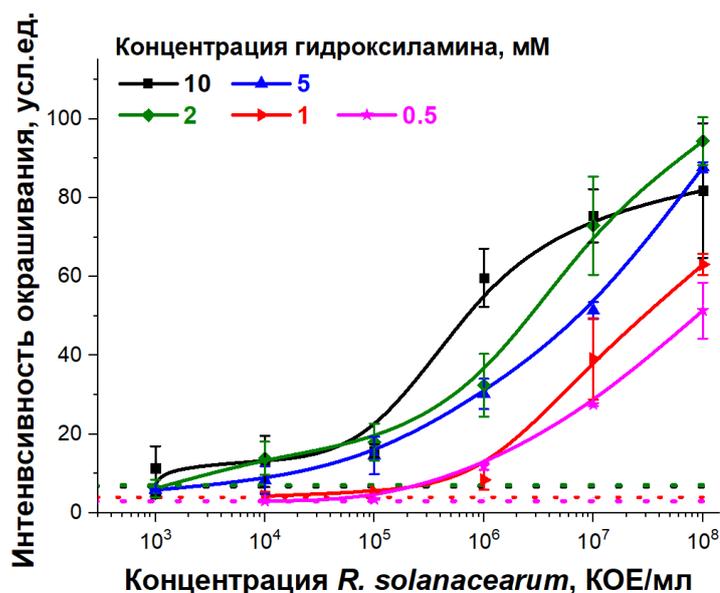


Рисунок 37. – Калибровочные кривые *R. solanacearum* после добавления усиливающего раствора с различными концентрациями гидроксиламина.

Пунктир соответствует пределу обнаружения

Чтобы оценить изменения размеров НЧЗ в результате предложенного усиления, был применен метод СЭМ. Кроме того, аналогичное восстановление было проведено на поверхности НЧЗ, адсорбированный на слюдяной подложке, с регистрацией методом АСМ. Увеличение размеров НЧЗ до 100 нм подтверждено обоими методами (рисунок 38). Образующиеся увеличенные НЧЗ имели узкое распределение по размерам. По данным АСМ не наблюдалось существенных отличий структуры поверхности НЧЗ до и после обработки усиливающим раствором, т.е. ионы тетрахлораурата (III) на поверхности НЧЗ восстанавливались равномерно. Хотя форма НЧЗ осталась близкой к сферической, шероховатость увеличенных частиц ($RMS = 3,4 \pm 0,6$ нм, $N = 15$) значительно возросла по сравнению с исходным НЧЗ ($RMS = 0,3 \pm 0,1$ нм, $N = 20$). Проведенная структурная характеристика увеличенных НЧЗ свидетельствует о высокой воспроизводимости усиливающей реакции, что важно для воспроизводимости результатов ИХА.

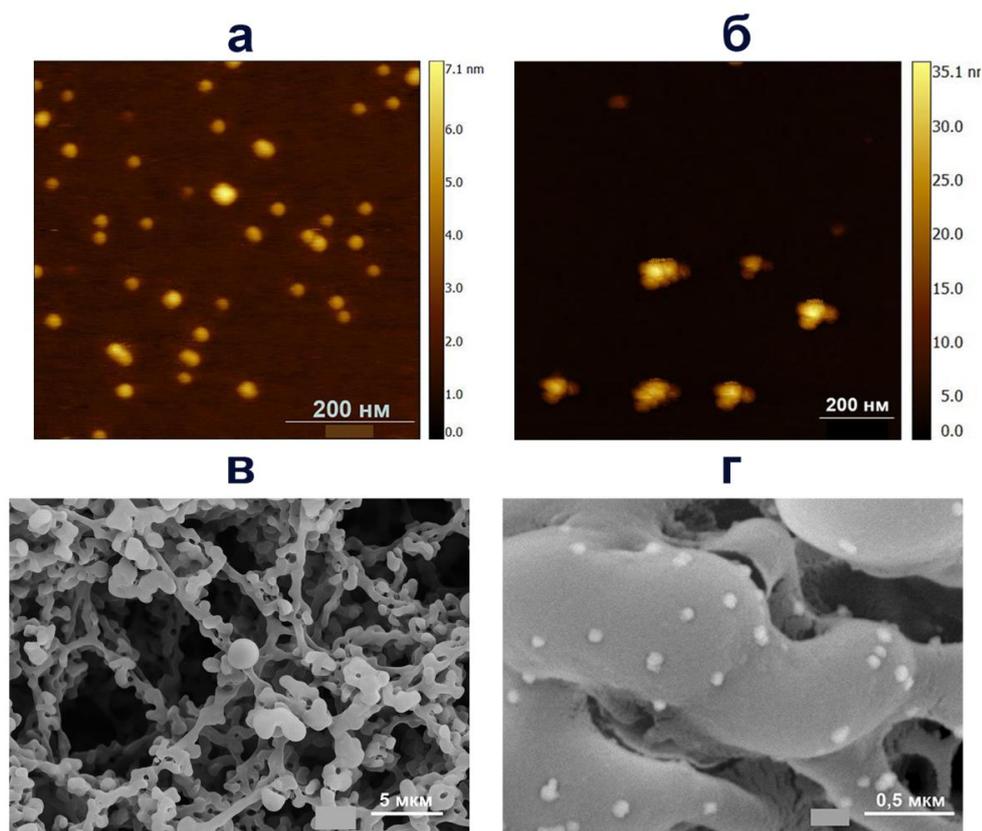


Рисунок 38. – Увеличение размеров НЧЗ на слюдяной подложке – изображения АСМ (а, б) и на нитроцеллюлозной мембране – изображения СЭМ (в, г): (а, в) исходные НЧЗ; (б, г) НЧЗ после обработки усиливающим раствором

Поскольку в результате усиливающей реакции НЧЗ, уже связанные в тестовой зоне, увеличивались, становилось возможным выявлять меньшие концентрации антигена. Действительно, предел обнаружения *R. solanacearum* в буфере снизился в 50 раз – до 2×10^4 КОЕ/мл.

Для апробации ИХА *R. solanacearum* с предложенным усилением был использован клубневой экстракт картофеля. Внешний вид тест-полоски и графики представлены на рисунке 35-б, -в, кривая 2. Предел обнаружения *R. solanacearum* в экстракте в результате усиления снизился в 33 раза – до 3×10^4 КОЕ/мл.

Кроме того, была установлена полнота выявления добавляемых в экстракт клеток *R. solanacearum* для ИХА без усиления и с усилением. Результаты, представленные на рисунке 38, свидетельствуют о хорошей корреляции известных

добавленных и выявленных концентраций *R. solanacearum* для обоих вариантов ИХА; R^2 ($n = 18$) составляли 0,99834 и 0,93943 соответственно.

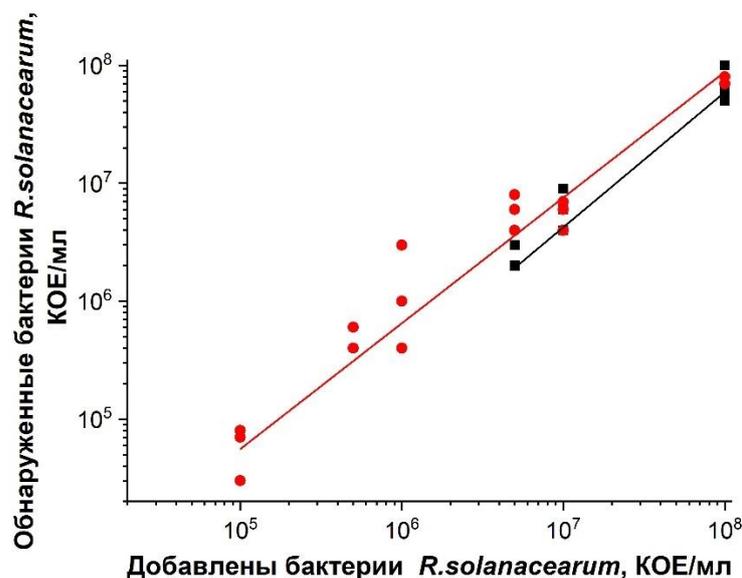


Рисунок 39. – Корреляции между добавленными и выявленными концентрациями *R. solanacearum* для обычного ИХА (черная линия) и ИХА с увеличением размеров НЧЗ (красная линия)

3.7.6. Разработка сэндвич ИХА *E. amylovora* с Au-Pt-нанозимным усилением

Для снижения предела обнаружения ИХА *E. amylovora* использовали в качестве метки Au-Pt нанозим, обладающий каталитической (пероксидазоподобной) активностью (рисунок 40). Специфичность ИХА обеспечивали антитела к *E. amylovora*, иммобилизованные в тестовой зоне рабочей мембраны и на поверхности Au-Pt нанозима.

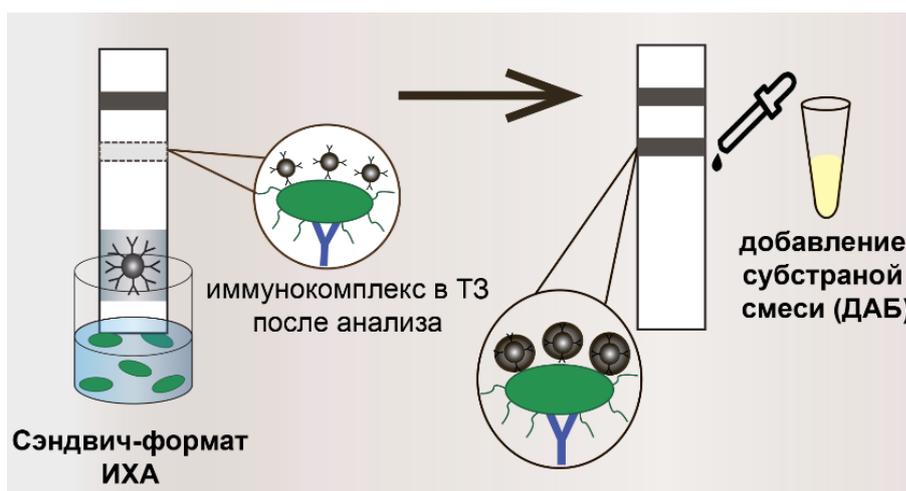


Рисунок 40. – Схема ИХА с Au-Pt-нанозимным усилением

Анализ состоял из двух этапов: 1) проведение стандартного ИХА, 2) добавление на тестовую зону 20 мкл субстратной смеси на основе ДАБ, который при наличии Au-Pt-нанозима трансформировался в окрашенный продукт, усиливая оптический сигнал. Анализ проводили в экстракте листьев яблони, к которому добавляли клетки *E. amylovora* в известных концентрациях – от 5×10^3 до 1×10^9 КОЕ/мл.

Уже после первого этапа наблюдалось окрашивание тестовых зон, обусловленное оптическими свойствами Au-Pt, включаемыми в тройные комплексы [антитела – бактерии *E. amylovora* – конъюгат Au-Pt с пАт]. Предел обнаружения составил 5×10^4 КОЕ/мл, что в 8 раз ниже по сравнению с ИХА с теми же пАт и НЧЗ в качестве метки (см. результаты раздела 3.7.2).

При добавлении субстрата на основе ДАБ в тестовую зону предел обнаружения снизился в 10 раз – до 5×10^3 КОЕ/мл (рисунок 41). Каталитическая активность Au-Pt-нанозима, инициируемая субстратом, приводила к образованию нерастворимого темно-коричневого продукта окисления ДАБ и значительному росту интенсивности окрашивания в тестовых и контрольных линиях. Таким образом, предел обнаружения для ИХА с каталитическим усилением благодаря Au-Pt-нанозиму снизился в 80 раз относительно ИХА без усиления с НЧЗ меткой.

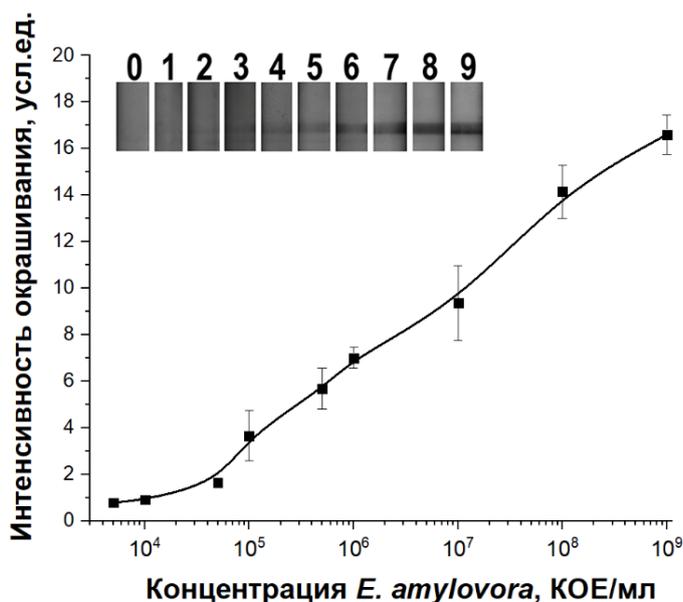


Рисунок 41. – Внешний вид тест-полосок при проведении ИХА *E. amylovora* после нанозимного усиления (0 – отрицательный контроль; 1 – 5×10^3 ; 2 – 1×10^4 ; 3 – 5×10^4 ; 4 – 1×10^5 ; 5 – 5×10^5 ; 6 – 1×10^6 ; 7 – 1×10^7 ; 8 – 1×10^8 ; 9 – 1×10^9 ; КОЕ/мл) и соответствующая концентрационная зависимость интенсивности окрашивания тестовых зон

При апробации разработанной тест-системы на экстрактах растений с бактериальным ожогом, подтвержденным методом ПЦР, но без видимых симптомов (8 проб), результаты ИХА подтвердили присутствие *E. amylovora* во всех пробах. Интенсивность окрашивания тестовой зоны при нанозимном усилении возросла по сравнению с ИХА без усиления в 1,3 – 3,3 раза (рисунок 42). Чем больше был сигнал на первом этапе анализа, тем больше он становился на втором. Так, и до, и после усиления максимальный сигнал давала проба № 6, а минимальный – проба № 2. Отличия результатов ИХА для проб из разных листьев одного растения соответствуют данным, полученным при изучении воспроизводимости ИХА в зависимости от выбора части растения для анализа (см. раздел 3.7.2).

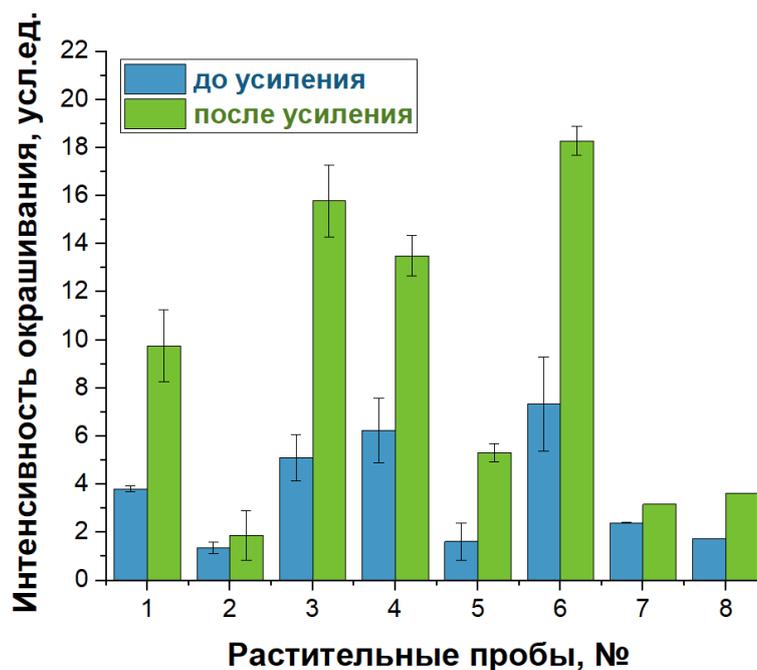


Рисунок 42. – ИХА *E. amylovora* в экстрактах листьев яблонь, зараженных бактериальным ожогом: интенсивности окрашивания тестовых зон до (1) и после (2) нанозимного усиления ($n = 2$)

Результаты апробации тест-системы на зараженных растениях яблони подтвердили, что достигнутый предел обнаружения позволяет выявлять инфекцию у бессимптомных растений. Проведение стадии усиления сводится к нанесению субстратного раствора на мембрану, т.е. сохраняет простоту тестирования. Продолжительность ИХА с усилением – 15 мин. Таким образом, разработанная тест-система с нанозимным усилением обеспечивает высокочувствительную детекцию *E. amylovora* и может использоваться во внелабораторных условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного исследования можно сделать следующие **выводы:**

- 1) Разработана иммунохроматографическая тест-система для детекции *Dickeya* spp. с пределом обнаружения от 2×10^5 КОЕ/мл (*D. solani*) и временем анализа 15 мин.
- 2) Разработана иммунохроматографическая тест-система для детекции *E. amylovora* с пределом обнаружения 4×10^5 КОЕ/мл и продолжительностью 10 мин. Предложены правила проведения пробоотбора для детекции *E. amylovora* методом ИХА (анализ проб, объединённых в кластеры; анализ сосудистых тканей), повышающие достоверность ИХА на 20%.
- 3) Разработана высокочувствительная иммунохроматографическая тест-система для детекции *E. amylovora*, в которой амплификационный подход, основанный на каталитической активности Au-Pt-нанозима и требующий 5 мин, снижает предел обнаружения *E. amylovora* в 10 раз относительно тест-системы с Au-Pt-меткой без амплификации и в 80 раз относительно тест-системы с НЧЗ меткой – до 5×10^3 КОЕ/мл.
- 4) Разработана высокочувствительная иммунохроматографическая тест-система для детекции YBK, в которой амплификационный подход, основанный на предварительном смешивании пробы и конъюгата НЧЗ с антителами, снижает предел обнаружения YBK в 60 раз – до 5,4 нг/мл.
- 5) Разработана высокочувствительная иммунохроматографическая тест-система для детекции ХВК, в которой амплификационный подход, основанный на концентрировании МНЧ в магнитном поле и агрегации МНЧ и НЧЗ, снижает предел обнаружения ХВК в 32 раза – до 0,25 нг/мл.
- б) Разработана высокочувствительная иммунохроматографическая тест-система для детекции *R. solanacearum*, в которой амплификационный подход, основанный на увеличении размера НЧЗ после анализа в течение 3 минут, снижает предел обнаружения *R. solanacearum* в 33 раза – до 3×10^4 КОЕ/мл.

Список сокращений и условных обозначений

БСА	бычий сывороточный альбумин
ДАБ	3,3'-диаминобензидин
ДЛСР	динамическое лазерное светорассеяние
ДМСО	диметилсульфоксид
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИМК	иммуномагнитное концентрирование
ИФА	иммуноферментный анализ
ИХА	иммунохроматографический анализ
НЧЗ	наночастицы золота
ЛЧ	латексные частицы
мАт	моноклональные антитела
МЧ	магнитные частицы
ОТ-ПЦР	ПЦР с обратной транскрипцией
пАт	поликлональные антитела
ПО	предел обнаружения
ППР	поверхностный плазмонный резонанс
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЭМ	просвечивающая электронная микроскопия
РНК	рибонуклеиновая кислота
СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
ТМБ	3,3',5,5'-тетраметилбензидин
ттБСА	10 мМ трис (рН 7,4), 0,25% БСА, 0,25% Твин-20 и 1% сахарозы
ФБС	50 мМ фосфатный буфер солевой, рН 7,4
ФБС-Т	ФБС, содержащий 0,05% Тритона X-100
EDC	1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид
IgG	иммуноглобулины класса G

NHS	N-гидроксисукцинимид
XVK	X-вируса картофеля
YVK	Y-вируса картофеля

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bebber, D.P. et al. Economic and physical determinants of the global distributions of crop pests and pathogens // *New Phytologist*. – 2014. – Vol. 202, № 3. – P. 901-910.
2. Wang, X. et al. *Dickeya oryzae* sp. nov., isolated from the roots of rice // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2020. – Vol. 70, № 7. – P. 4171-4178.
3. Burkholder, W., McFadden, L.A., and Dimock, E. A bacterial blight of *Chrysanthemums* // *Phytopathology*. – 1953. – Vol. 43, № 9. – P. 522-526.
4. Toth, I. et al. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe // *Plant Pathology*. – 2011. – Vol. 60, № 3. – P. 385-399.
5. Toth, I., Saddler, G., and Elphinstone, J. Investigating the biology and appropriate control of *Dickeya* species affecting GB potatoes // Kenilworth: Potato Council. – 2014. – P. 87.
6. Locke, T. Compendium of Potato Diseases /edited by W. R. Stevenson, R. Loria, G. D. Franc & D. P. Weingartner. St Paul, Minnesota: APS Press, 2001. 2nd edition // *The Journal of Agricultural Science*. – 2002. – Vol. 138, № 3. – P. 345-348.
7. Dubois Gill, E., Schaerer, S. and Dupuis, B. Factors impacting blackleg development caused by *Dickeya* spp. in the field // *European Journal of Plant Pathology*. – 2014. – Vol. 140. – P. 317-327.
8. Ignatov, A. et al. Dynamics of species composition of potato pathogens in the European part of the Russian Federation // *AGRIS*. – 2019. – Vol. 9. – P. 28-32.
9. Ерохова М.Д., Кузнецова М.А. «Чёрная ножка» – опасное для отечественного картофелеводства заболевание // *Аграрная наука*. – 2019. – Т. 3. – С. 44-48.
10. Карлов А.Н. и др. *Dickeya dianthicola*-новый для России бактериальный патоген картофеля // *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. – 2010. – №. 3. – С. 134-141.

11. Игнатов А.Н., Егорова М.С., Ходыкина М.В. Распространение бактериальных и фитоплазменных болезней растений в России // Защита и карантин растений. – 2015. – №. 5. – С. 6-10.
12. Зайцев И.А. и др. Мониторинг скрытых (латентных) форм распространения возбудителей черной ножки и кольцевой гнили картофеля в Российской Федерации // Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции. – 2016. – Т. 1. – С. 37-44.
13. Perombelon, M.C. and A. Kelman. Ecology of the soft rot erwinias // Annual Review of Phytopathology. – 1980. – Vol. 18, № 1. – P. 361-387.
14. Tsrer, L. et al. Assessment of recent outbreaks of *Dickeya* sp.(syn. *Erwinia chrysanthemi*) slow wilt in potato crops in Israel // European Journal of Plant Pathology. – 2009. – Vol. 123, № 3. – P. 311-320.
15. Tsrer, L., Aharon, M. and Erlich, O. Survey of bacterial and fungal seedborne diseases in imported and domestic potato seed tubers // Phytoparasitica. – 1999. – Vol. 27, № 3. – P. 215-226.
16. Franc, G. et al. Compendium of Potato Diseases / edited by W. R. Stevenson, R. Loria, G. D. Franc & D. P. Weingartner. St Paul, Minnesota: APS Press. – 2001.
17. Lumb, V., Perombelon, M., and Zutra, D. Studies of a wilt disease of the potato plant in Israel caused by *Erwinia chrysanthemi* // Plant Pathology. – 1986. – Vol. 35, № 2. – P.196-202.
18. Cother, E. Bacterial seed tuber decay in irrigated sandy soils of New South Wales // Potato Research. – 1980. – Vol. 23, № 1. – P. 75-84.
19. Lindo, L.D. and French, E. *Erwinia* species attacking potato in the humid tropics of Peru // Fitopatologia. – 1981. – Vol. 16, № 2. – P. 69-74.
20. Van Der Wolf, J. and De Boer, S. Bacterial Pathogens of Potato // Potato Biology and Biotechnology. – 2007. – Oxford: Elsevier. – P. 595-617.
21. Czajkowski, R. et al. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review // Annals of Applied Biology. – 2015. – Vol. 166, № 1. – P. 18-38.

22. Dobhal, S. et al. Comparative genomics reveals signature regions used to develop a robust and sensitive multiplex TaqMan real-time qPCR assay to detect the genus *Dickeya* and *Dickeya dianthicola* // *Journal of Applied Microbiology*. – 2020. – Vol. 128, № 6. – P. 1703-1719.
23. Arif, M. et al. Development of a rapid, sensitive, and field-deployable Razor Ex BioDetection system and quantitative PCR assay for detection of *Phymatotrichopsis omnivora* using multiple gene targets // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2013. – Vol. 79, № 7. – P. 2312-2320.
24. Safenkova, I.V. et al. Development of a lateral flow immunoassay for rapid diagnosis of potato blackleg caused by *Dickeya* species // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2017. – Vol. 409, № 7. – P. 1915-1927.
25. EPPO (2022) *Erwinia amylovora*. EPPO datasheets on pests recommended for regulation. Available online. <https://gd.eppo.int>.
26. Wang, D., Korban, S.S., and Zhao, Y. Molecular signature of differential virulence in natural isolates of *Erwinia amylovora* // *Phytopathology*. – 2010. – Vol. 100, № 2. – P. 192-198.
27. Adeolu, M. et al. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov. and *Budviciaceae* fam. nov. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2016. – Vol. 66, № 12. – P. 5575-5599.
28. Zwet, T. and Keil, H.L. Fire blight: A bacterial disease of Rosaceous plants // *US Department of Agriculture*. – 1979. – № 510.
29. Mansfield, J. et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology // *Molecular Plant Pathology*. – 2012. – Vol. 13, № 6. – P. 614-29.
30. Brennan, J. et al. Characterization and differentiation of Irish *Erwinia amylovora* isolates // *Journal of Phytopathology*. – 2002. – Vol. 150, № 8-9. – P. 414-422.

31. Braun, P.G. and Hildebrand, P.D. Epidemiology of fire blight of floricanne fruiting red raspberry caused by *Erwinia amylovora* // Canadian Journal of Plant Pathology. – 2006. – Vol. 28, № 1. – P. 95-99.
32. Bonn, W.G. and van der Zwet, T. Distribution and economic importance of fire blight // Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. – 2000. – Vol. 5. – P. 37-53.
33. Malnoy, M. et al. Fire blight: applied genomic insights of the pathogen and host // Annual Review of Phytopathology. – 2012. – Vol. 50. – P. 475-494.
34. Svircev, A.M. et al. *Erwinia amylovora*: Modern methods for detection and differentiation // Plant Pathology. – Humana Press, Totowa, NJ, – 2009. – P. 115-129.
35. Roberts, R. et al. The potential for spread of *Erwinia amylovora* and fire blight via commercial apple fruit; A critical review and risk assessment // Crop Protection. – 1998. – Vol. 17, № 1. – P. 19-28.
36. *Erwinia amylovora* // EPPO datasheets on pests recommended for regulation. – 2021. Available online: <https://gd.eppo.int/taxon/ERWIAM/datasheet>.
37. Braun-Kiewnick, A., et al. A rapid lateral-flow immunoassay for phytosanitary detection of *Erwinia amylovora* and on-site fire blight diagnosis // Journal of Microbiological Methods. – 2011. – Vol. 87, № 1. – P. 1-9.
38. Yabuuchi, E., Kawamura, Y. and Ezaki, T. *Ralstonia* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (online). – 2015. – P. 1-21. doi: 0.1002/9781118960608.gbm00941.
39. Bergsma-Vlami, M., et al. Phylogenetic assignment of *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Ralstonia solanacearum* Phylotype I) isolated from *Rosa spp.* // Plant Disease. – 2018. – Vol. 102, № 11. – P. 2258-2267.
40. Allen, C. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex / C. Allen, P. Prior, A. Hayward // American Phytopathological Society (APS Press), 2005.

41. Dookun, A., Saumtally, S. and Seal, S. Genetic diversity in *Ralstonia solanacearum* strains from Mauritius using restriction fragment length polymorphisms // *Journal of Phytopathology*. – 2001. – Vol. 149, № 1. – P. 51-55.
42. Yik, C., Ong, A. and Ho, R. Characterization of *Pseudomonas solanacearum* strains from Singapore // *Singapore Journal of Primary Industries*. – 1994. – Vol. 22, № 2. – P. 57-62.
43. Hayward, A., Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* // *Annual Review of Phytopathology*. – 1991. – Vol. 29. – P. 65-87.
44. Shattock, R. Compendium of Potato Diseases /edited by W. R. Stevenson, R. Loria, G. D. Franc & D. P. Weingartner. St Paul, Minnesota: APS Press, 2001. 2nd edition // *Plant Pathology*. – 2002. – Vol. 51, № 4. – P. 520-520.
45. Liu, Y., et al. The sequevar distribution of *Ralstonia solanacearum* in tobacco-growing zones of China is structured by elevation // *European Journal of Plant Pathology*. – 2017. – Vol. 147, № 3. – P. 541-551.
46. She, X., et al. Identification and genetic characterization of *Ralstonia solanacearum* species complex isolates from *Cucurbita maxima* in China // *Frontiers in Plant Science*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1794.
47. Buddenhagen, I.W. Designations of races in *Pseudomonas solanacearum* // *Phytopathology*. – 1962. – Vol. 52. – P. 726.
48. Buddenhagen, I. and Kelman, A. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* // *Annual Review of Phytopathology*. – 1964. – Vol. 2, № 1. – P. 203-220.
49. Fletcher, J. Compendium of Tomato Diseases. // Edited by J. B. Jones, J. P. Jones, R. E. Stall and T. A. Zitter. – St. Paul, Minnesota: APS Press (The American Pathological Society Press), 1991. – P. 370.
50. Priou, S., Gutarra, L. and Aley, P. An improved enrichment broth for the sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* (biovars 1 and 2A) in soil using DAS–ELISA // *Plant Pathology*. – 2006. – Vol. 55, № 1. – P. 36-45.

51. Behiry, S.I., et al. Antigenic and pathogenicity activities of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 molecularly identified and detected by indirect ELISA using polyclonal antibodies generated in rabbits // *Microbial Pathogenesis*. –2018. –Vol. 115. –P. 216-221.
52. Weller, S., et al. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay // *Applied and Environmental Microbiology*. –2000. –Vol. 66, № 7. –P. 2853-2858.
53. Chen, Y., et al. A real-time PCR assay for the quantitative detection of *Ralstonia solanacearum* in horticultural soil and plant tissues // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. –2010. –Vol. 20, № 1. –P. 193-201.
54. Stulberg, M.J., Shao, J. and Huang, Q. A multiplex PCR assay to detect and differentiate select agent strains of *Ralstonia solanacearum* // *Plant Disease*. – 2015. – Vol. 99, № 3. – P. 333-341.
55. Horita, M., Yano, K. and Tsuchiya, K. PCR-based specific detection of *Ralstonia solanacearum* race 4 strains // *Journal of General Plant Pathology*. – 2004. – Vol. 70, № 5. – P. 278-283.
56. Smith, D.S. and De Boer, S.H. Implementation of an artificial reaction control in a TaqMan method for PCR detection of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 // *European Journal of Plant Pathology*. – 2009. – Vol. 124, № 3. – P. 405-412.
57. Ha, Y., et al. A rapid, sensitive assay for *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 in plant and soil samples using magnetic beads and real-time PCR // *Plant Disease*. – 2012. – Vol. 96, № 2. – P. 258-264.
58. Panferov, V.G. et al. Development of the sensitive lateral flow immunoassay with silver enhancement for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers // *Talanta*. – 2016. – Vol. 152. – P. 521-530.
59. Huang, W. et al. Loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of *Ralstonia solanacearum* phylotype i mulberry strains in China // *Frontiers in Plant Science*. – 2017. – Vol. 8. – P. 76-76.

60. Kubota, R. et al. Detection of *Ralstonia solanacearum* by loop-mediated isothermal amplification // *Phytopathology*. – 2008. – Vol. 98, № 9. – P. 1045-1051.
61. Lenarčič, R. et al. Loop-mediated isothermal amplification of specific endoglucanase gene sequence for detection of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, № 4. – P. e96027.
62. Gergerich, R.C. and Dolja, V.V. Introduction to plant viruses, the invisible foe // *The Plant Health Instructor*. – 2006. – Vol. 478.
63. Lacomme, C., et al. (editor). Potato virus Y: biodiversity, pathogenicity, epidemiology and management. – Basel, Switzerland: Springer International Publishing, 2017.
64. Atabekov, J., et al. Potato virus X: structure, disassembly and reconstitution // *Molecular Plant Pathology*. – 2007. – Vol 8, № 5. – P. 667-675.
65. Tollin, P. and Wilson, H. The Filamentous Plant Viruses in the Plant Viruses 4/Ed., Milne RC New York: Plenum Press, 1988.
66. Huisman, M.J. et al. The complete nucleotide sequence of potato virus X and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses // *Journal of General Virology*. – 1988. – Vol. 69, № 8. – P. 1789-1798.
67. Skryabin, K.G. et al. The nucleotide sequence of potato virus X RNA // *Nucleic Acids Research*. – 1988. – Vol. 16, № 22. – P. 10929-10930.
68. Yu, X.Q. et al. Complete genome sequence of a Chinese isolate of potato virus X and analysis of genetic diversity // *Journal of Phytopathology*. – 2008. – Vol. 156, № 6. – P. 346-351.
69. Yu, X.Q. et al. Phylogenetic analyses of an isolate obtained from potato in 1985 revealed potato virus X was introduced to China via multiple events // *Virus Genes*. – 2010. – Vol. 40, № 3. – P. 447-451.
70. Salazar, L.F. Potato viruses and their control / L.F. Salazar. – Peru: International Potato Center, 1996. – P. 214

71. Семенного картофеля: Руководство ЕЭК ООН по болезням, вредителями и дефектам // Стандарт ЕЭК ООН, касающийся сбыта и контроля товарного качество. – Организация Объединенных Наций: Женева, Швейцария, 2014.
72. Nasir, M. et al. ELISA-based detection of major potato viruses in tissue culture produced potato germplasm // *International Journal Agricultural Sciences*. – 2012. – Vol. 2. – P. 75-80.
73. De Bokx, J.A., Piron, P.G.M. and Maat, D.Z. Detection of potato virus X in tubers with the enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) // *Potato Research*. – 1980. – Vol. 23, № 1. – P. 129-131.
74. Drygin, Y.F. et al. Highly sensitive field test lateral flow immunodiagnosics of PVX infection // *Applied Microbiology Biotechnology*. – 2012. – Vol. 93, № 1. – P. 179-89.
75. Panferov, V.G. et al. Post-assay growth of gold nanoparticles as a tool for highly sensitive lateral flow immunoassay. Application to the detection of potato virus X // *Microchima Acta*. – 2018. – Vol. 185, № 11. – P. 1-8.
76. Mortimer-Jones, S.M. et al. A single tube, quantitative real-time RT-PCR assay that detects four potato viruses simultaneously // *Journal of Virological Methods*. – 2009. – Vol. 161, № 2. – P. 289-296.
77. Peiman, M. and Xie, C. Sensitive detection of potato viruses, PVX, PLRV and PVS, by RT-PCR in potato leaf and tuber // *Australasian Plant Disease Notes*. – 2006. – Vol. 1, № 1. – P. 41-46.
78. Agindotan, B.O., Shiel, P.J. and Berger, P.H. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan® real-time RT-PCR // *Journal of Virological Methods*. – 2007. – Vol. 142, № 1-2. – P. 1-9.
79. Safenkova, I.V. et al. Multiarray on a test strip (MATS): rapid multiplex immunodetection of priority potato pathogens // *Analytical Bioanalytical Chemistry*. – 2016. – Vol. 408, № 22. – P. 6009-6017.

80. Panferov, V.G. et al. Setting up the cut-off level of a sensitive barcode lateral flow assay with magnetic nanoparticles // *Talanta*. – 2017. – Vol. 164. – P. 69-76.
81. Tribodet, M. et al. Characterization of potato virus Y (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVYN isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi* // *Journal of General Virology*. – 2005. – Vol. 86, № 7. – P. 2101-2105.
82. Gaur, R.K. *Plant Viruses: Diversity, Interaction and Management* / R.K. Gaur, S.P. Khurana, and Y. Dorokhov. – Boca Raton: CRC Press, 2018. – P. 405.
83. Valkonen, J.P. Potato viruses: economical losses and biotechnological potential // *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives* / editor / D. Vreugdenhil, J. Bradshaw, C. Gebhardt, F. Govers, D.K.L. MacKerron, M.A. Taylor, H.A. Ross. – Elsevier, Scientific Publ. Co, 2007. – P. 619-641.
84. Al-Ani, R.A. et al. Management of potato virus Y (PVY) in potato by some biocontrol agents under field conditions // *Advances in Environmental Biology*. – 2013. – Vol. 1, № 1. – P. 1-6.
85. Bragard C. et al. Status and prospects of plant virus control through interference with vector transmission // *Annual Review of Phytopathology*. – 2013. – Vol. 51. – P. 177-201.
86. Shukla, D.D. *The Potyviridae* / D.D. Shukla, C.W. Ward, A.A. Brunt. – Wallingford, Oxfordshire: CAB International, 1994.
87. Dougherty, W.G. and Carrington, J.C. Expression and function of potyviral gene products // *Annual Review of Phytopathology*. – 1988. – Vol. 26, № 1. – P. 123-143.
88. Kerlan, C. et al. Variability of potato virus Y in potato crops in France // *Journal of Phytopathology*. – 1999. – Vol. 147, № 11-12. – P. 643-651.
89. MacKenzie, T.D.B. et al. Evidence of Potato virus Y Spread through Post-Emergence Management Practices in Commercial Potato Fields // *American Journal of Potato Research*. – 2018. – Vol. 95, № 6. – P. 720-728.

90. Lindner, K. et al. Potato virus Y (PVY) in seed potato certification // *Journal of Plant Diseases and Protection*. – 2015. – Vol. 122, № 3. – P. 109-119.
91. MacKenzie, T.D.B. et al. Differential Spread of Potato virus Y (PVY) Strains O, N:O and NTN in the Field: Implications for the Rise of Recombinant PVY Strains in New Brunswick, Canada // *American Journal of Potato Research*. – 2018. – Vol. 95, № 3. – P. 301-310.
92. Al-Ani, R.A., Adhab, M.A. and Diwan, S.N. Systemic resistance induced in potato plants against potato virus Y common strain (PVYO) by plant extracts in Iraq // *Advances in Environmental Biology*. – 2011. – Vol. 5, № 1. – P. 209-215.
93. Kerlan, C. et al. Identification of the molecular make-up of the Potato virus Y strain PVYZ: Genetic typing of PVYZ-NTN // *Phytopathology*. – 2011. – Vol. 101, № 9. – P. 1052-1060.
94. Ismail, M.H. The use of enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitative detection of potato virus Y in potato and other test plants // *Microbiological Research*. – 1997. – Vol. 152, № 3. – P. 307-313.
95. Barker, H., Webster, K.D. and Reavy, B. Detection of potato virus Y in potato tubers: a comparison of polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay // *Potato Research*. – 1993. – Vol. 36, № 1. – P. 13-20.
96. Safenkova, I.V. et al. Alarm lateral flow immunoassay for detection of the total infection caused by the five viruses // *Talanta*. – 2019. – Vol. 195. – P. 739-744.
97. Jacquot, E. et al. A single nucleotide polymorphism-based technique for specific characterization of YO and YN isolates of Potato virus Y (PVY) // *Journal of Virological Methods*. – 2005. – Vol. 125, № 1. – P. 83-93.
98. Lorenzen, J.H. et al. A multiplex PCR assay to characterize potato virus y isolates and identify strain mixtures // *Plant Disease*. – 2006. – Vol. 90, № 7. – P. 935-940.
99. Schubert, J., Fomitcheva, V. and Sztangret-Wiśniewska, J. Differentiation of potato virus Y strains using improved sets of diagnostic PCR-primers // *Journal of Virological Methods*. – 2007. – Vol. 140, № 1-2. – P. 66-74.

100. Martin R.R., James D. and Lévesque C.A. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management // *Annual Review of Phytopathology*. – 2000. – Vol. 38, №. 1. – P. 207-239.
101. Delong, R.K. Experiment 6 - Polymerase Chain Reaction (PCR) / R.K. Delong, Zhou, Q. // *Introductory Experiments on Biomolecules and their Interactions*. Cambridge, MA, USA: Academic Press, 2015. – P. 59-66.
102. Alemu, K. Real-time PCR and its application in plant disease diagnostics // *Advances Life Science and Technology*. – 2014. – Vol. 27. – P. 39-50.
103. Fenollar, F. and Raoult, D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms // *Apmis*. – 2004. – Vol. 112, № 11-12. – P. 785-807.
104. Nikitin, M.M. et al. Matrix approach to the simultaneous detection of multiple potato pathogens by real-time PCR // *Journal of Applied Microbiology*. – 2018. – Vol. 124, № (3). – P. 797-809.
105. Tsushima, D. and Fuji, S.-i. Comparison of two highly sensitive methods to detect potato spindle tuber viroid in Dahlia using quantitative-reverse transcription-polymerase chain reaction assays // *Journal of Virological Methods*. – 2022. – Vol. 300. – P. 114401.
106. Li, S. et al. A rapid sap-direct reverse transcription-polymerase chain reaction method for detection of dendrobium viroid in Dendrobium plants // *Letters in Applied Microbiology*. – 2021. – Vol. 73, № 1. – P. 26-30.
107. Pallás, V., Sánchez-Navarro, J.A. and James, D. Recent advances on the multiplex molecular detection of plant viruses and viroids // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 2087.
108. Martinelli, F. et al. Advanced methods of plant disease detection. A review // *Agronomy for Sustainable Development*. – 2015. – Vol. 35, № 1. – P. 1-25.
109. Farber, C. et al. Advanced spectroscopic techniques for plant disease diagnostics. A review // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2019. – Vol. 118. – P. 43-49.

110. Schaad, N.W. and Frederick, R.D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics // *Canadian Journal of Plant Pathology*. – 2002. – Vol. 24, № 3. – P. 250-258.
111. Notomi, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA // *Nucleic Acids Research*. – 2000. – Vol. 28, № 12. – P. e63.
112. Tomita, N. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products // *Nature Protocols*. – 2008. – Vol. 3, № 5. – P. 877-882.
113. Zhang, X. et al. Development of a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 in soil // *PloS One*. – 2013. – Vol. 8, № 12. – P. e82841.
114. Wu, X. et al. Rapid and quantitative detection of citrus huanglongbing bacterium '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' by real-time fluorescent loop-mediated isothermal amplification assay in China // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. – 2016. – Vol. 94. – P. 1-7.
115. Piepenburg, O. et al. DNA detection using recombination proteins // *PLoS Biology*. – 2006. – Vol. 4, № 7. – P. e204.
116. Daher, R.K. et al. Influence of sequence mismatches on the specificity of recombinase polymerase amplification technology // *Molecular and Cellular Probes*. – 2015. – Vol. 29, № 2. – P. 116-121.
117. Ivanov, A.V. et al. The challenge for rapid detection of high-structured circular rna: assay of potato spindle tuber viroid based on recombinase polymerase amplification and lateral flow tests // *Plants*. – 2020. – Vol. 9, № 10. – P. 1369.
118. Ghosh, D.K. et al. Development of a recombinase polymerase based isothermal amplification combined with lateral flow assay (HLB-RPA-LFA) for rapid detection of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" // *PloS One*. – 2018. – Vol. 13, № 12. – P. e0208530.

119. Ivanov, A.V. et al. Development of lateral flow assay combined with recombinase polymerase amplification for highly sensitive detection of *Dickeya solani* // Molecular and Cellular Probes. 2020. Vol. 53. P. 101622.
120. Ju, Y. et al. Development of recombinase polymerase amplification combined with lateral flow detection assay for rapid and visual detection of *Ralstonia solanacearum* in tobacco // Plant Disease. – 2021. – P. PDIS-04.
121. Zhang, S. et al. Rapid diagnostic detection of plum pox virus in Prunus plants by isothermal AmplifyRP(®) using reverse transcription-recombinase polymerase amplification // Journal of Virological Methods. – 2014. – Vol. 207. – P. 114-20.
122. Lau, H.Y. et al. Specific and sensitive isothermal electrochemical biosensor for plant pathogen DNA detection with colloidal gold nanoparticles as probes // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 1-7.
123. Rani, A., Donovan, N. and Mantri, N. The future of plant pathogen diagnostics in a nursery production system // Biosensors and Bioelectronics. – 2019. – Vol. 145. – P. 111631.
124. Ivanov, A.V. et al. The potential use of isothermal amplification assays for in-field diagnostics of plant pathogens // Plants. – 2021. – Vol. 10, № 11. – P. 2424.
125. Bergman, L. Immunochemical Methods, Localization / L. Bergman, S. Bechtel, S. Wiemann // Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine. Berlin, Heidelberg: Springer, 2006. – P. 862-866.
126. Koivunen, M.E. and Krogsrud, R.L. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories // Laboratory Medicine. – 2006. – Vol. 37, № 8. – P. 490-497.
127. Rosner, M.H., Grassman, J.A. and Haas, R.A. Immunochemical techniques in biological monitoring // Environmental Health Perspectives. – 1991. – Vol. 94. – P. 131-134.
128. Фундаментальная фитопатология / Багирова, С.Ф., Джавахия, В.Г., Дьяков, Ю.Т. и др. – Красанд, 2012.

129. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилов. – М.: Высшая школа, 1991. – С. 288.
130. Aćimović, S.G. et al. Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes // *Frontiers in Plant Science*. – 2015. – Vol. 6. – P. 16.
131. Köhler, G. and Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // *Nature*. – 1975. – Vol. 256, № 5517. – P. 495-497.
132. Huang, X. et al. Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – Vol. 75. – P. 166-180.
133. Perlmann, P. and Perlmann, H. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay // e LS (Wiley Online Library). – 2001.
134. Clark, M.F., Lister, R.M. and Bar-Joseph, M. ELISA techniques // *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1986. – Vol. 118. – P. 742-766.
135. Leuvering, J.H. et al. Sol particle immunoassay (SPIA) // *Journal of Immunoassay*. – 1980. – Vol. 1, № 1. – P. 77-91.
136. Hu, J. et al. Advances in paper-based point-of-care diagnostics // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2014. – Vol. 54. – P. 585-597.
137. Singh, J., Sharma, S. and Nara, S. Evaluation of gold nanoparticle based lateral flow assays for diagnosis of enterobacteriaceae members in food and water // *Food Chemistry*. – 2015. – Vol. 170. – P. 470-483.
138. Lönnberg, M. and Carlsson, J. Quantitative detection in the attomole range for immunochromatographic tests by means of a flatbed scanner. *Analytical Biochemistry*. – 2001. – Vol. 293, № 2. – P.224-231.
139. Noguera, P. et al. Carbon nanoparticles in lateral flow methods to detect genes encoding virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2011. – Vol. 399, № 2. – P. 831-838.

140. Бызова, Н. И др. Взаимодействие вируса шарки сливы с антителами, конъюгированными с коллоидным золотом, и разработка иммунохроматографической тест-системы для детекции вируса // Биохимия. – 2010. – Т. 75, № 11. – С. 1583-1595.
141. Safenkova, I.V. et al. Lateral flow immunoassay for rapid detection of potato ring rot caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2014. – Vol. 50, № 6. – P. 675-682.
142. Byzova, N.A. et al. Development of immunochromatographic test systems for express detection of plant viruses // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2009. – Vol. 45, № 2. – P. 204-209.
143. Byzova, N.A. et al. Interaction of plum pox virus with specific colloidal gold-labeled antibodies and development of immunochromatographic assay of the virus // Biochemistry (Moscow). – 2010. – Vol. 75, № 11. – P. 1393-1403.
144. Tadic, M. et al. Magnetic properties of novel superparamagnetic iron oxide nanoclusters and their peculiarity under annealing treatment // Applied Surface Science. – 2014. – Vol. 322. – P. 255-264.
145. Liu, D. et al. A modified lateral flow immunoassay for the detection of trace aflatoxin M1 based on immunomagnetic nanobeads with different antibody concentrations // Food Control. – 2015. – Vol. 51. – P. 218-224.
146. Rettcher, S. et al. Simple and portable magnetic immunoassay for rapid detection and sensitive quantification of plant viruses // Applied Environmental Microbiology, – 2015. – Vol. 81, № 9. – P. 3039-3048.
147. Wang, D.-B. et al. Detection of *Bacillus anthracis* spores by super-paramagnetic lateral-flow immunoassays based on “Road Closure” // Biosensors and Bioelectronics. – 2015. – Vol. 67. – P. 608-614.
148. Orlov, A.V., et al. Rapid dry-reagent immunomagnetic biosensing platform based on volumetric detection of nanoparticles on 3D structures // Biosensors and Bioelectronics. – 2016. – Vol. 79. – P. 423-429.

149. Yan, J., et al. Effect of physiochemical property of Fe₃O₄ particle on magnetic lateral flow immunochromatographic assay // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2014. – Vol. 197. – P.129-136.
150. Safenkova, I.V., et al. Complex analysis of concentrated antibody-gold nanoparticle conjugates' mixtures using asymmetric flow field-flow fractionation // *J Chromatography A*. – 2016. – Vol. 1477. – P. 56-63.
151. Safenkova, I.V., Zherdev, A.V. and Dzantiev, B.B. Correlation between the composition of multivalent antibody conjugates with colloidal gold nanoparticles and their affinity // *Journal Immunological Methods*. – 2010. – Vol. 357, № 1-2. – P. 17-25.
152. Liu, X. et al. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2007. – Vol. 58, № 1. – P. 3-7.
153. Robenek, H. *Colloidal gold: Principles, methods, and applications* / H. Robenek / Edited by M. A. Hayat // New York: Academic Press, Inc., 1990. – P. 536.
154. Baigent, C.L. and Müller, G. A colloidal gold prepared with ultrasonics // *Experientia*. – 1980. – Vol. 36, № 4. – P. 472-473.
155. Frens, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Nature Physical Science*. – 1973. – Vol. 241, № 105. – P. 20-22.
156. Safenkova, I.V., Zherdev, A.V., and Dzantiev, B.B. Factors influencing the detection limit of the lateral-flow sandwich immunoassay: A case study with potato virus X // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2012. – Vol. 403, № 6. – P. 1595-605.
157. Hermanson, G.T. *Bioconjugate techniques* / G.T. Hermanson / New York: Academic Press, 1996.
158. Khreich, N. et al. Detection of Staphylococcus enterotoxin B using fluorescent immunoliposomes as label for immunochromatographic testing // *Analytical Biochemistry*. – 2008. – Vol. 377, № 2. – P. 182-188.

159. Fenzl, C., Hirsch, T. and Baeumner, A.J. Nanomaterials as versatile tools for signal amplification in (bio)analytical applications // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2016. – Vol. 79. – P. 306-316.
160. Elmer, W. and White, J.C. The future of nanotechnology in plant pathology // *Annual Review of Phytopathology*. – 2018. – Vol. 56. – P. 111-133.
161. Wu, M.-L. and Lai, L.-B. Synthesis of Pt/Ag bimetallic nanoparticles in water-in-oil microemulsions // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2004. – Vol. 244, № 1-3. – P. 149-157.
162. Ferrando, R., Jellinek, J. and Johnston, R.L. Nanoalloys: from theory to applications of alloy clusters and nanoparticles // *Chemical Reviews*. – 2008. – Vol. 108, № 3. – P. 845-910.
163. Luo, J. et al. Characterization of carbon-supported aupt nanoparticles for electrocatalytic methanol oxidation reaction // *Langmuir*. – 2006. – Vol. 22, № 6. – P. 2892-2898.
164. Gao, Z., et al. Urchin-like (gold core)@(platinum shell) nanohybrids: A highly efficient peroxidase-mimetic system for in situ amplified colorimetric immunoassay // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2015. – Vol. 70. – P. 194-201.
165. Panferov, V.G. et al. Urchin peroxidase-mimicking Au@Pt nanoparticles as a label in lateral flow immunoassay: impact of nanoparticle composition on detection limit of *Clavibacter michiganensis* // *Microchimica Acta*. – 2020. – Vol. 187, № 5. – P. 268.
166. Loynachan, C.N. et al. Platinum nanocatalyst amplification: redefining the gold standard for lateral flow immunoassays with ultrabroad dynamic range // *ACS Nano*. – 2018. – Vol. 12, № 1. – P. 279-288.
167. Jiang, T. et al. Sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 using Pt–Au bimetal nanoparticles with peroxidase-like amplification // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – Vol. 77. – P. 687-694.

168. Zhang, J. et al. Gold-platinum nanoflowers as a label and as an enzyme mimic for use in highly sensitive lateral flow immunoassays: application to detection of rabbit IgG // *Microchimica Acta*. – 2019. Vol. 186, – № 6. – P. 357.
169. Gao, Z. et al., Platinum-decorated gold nanoparticles with dual functionalities for ultrasensitive colorimetric in vitro diagnostics // *Nano Letters*. – 2017. – Vol. 17, № 9. – P. 5572-5579.
170. Li, J., McMillan, D. and Macdonald, J. Enhancing the signal of lateral flow immunoassays by using different developing methods. *Sensors and Materials*. – 2015. – Vol. 27, № 7. – P. 549-561.
171. Quesada-Gonzalez, D. and Merkoci, A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2015. – Vol. 73. – P. 47-63.
172. Shan, S. et al. Novel strategies to enhance lateral flow immunoassay sensitivity for detecting foodborne pathogens // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2015. – Vol. 63, № 3. – P. 745-753.
173. Varshney, M. et al. Magnetic nanoparticle-antibody conjugates for the separation of *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef // *Journal of Food Protection*. – 2005. – Vol. 68, № 9, – P. 1804-1811.
174. Xiong, Q. et al. Development of an immunomagnetic separation method for efficient enrichment of *Escherichia coli* O157: H7 // *Food Control*. – 2014. – Vol. 37. – P. 41-45.
175. Shan, S. et al. Immunomagnetic nanobeads based on a streptavidin-biotin system for the highly efficient and specific separation of *Listeria monocytogenes* // *Food Control*. – 2014. – Vol. 45. – P. 138-142.
176. Shim, W.-B. et al. Enhanced rapidity for qualitative detection of *Listeria monocytogenes* using an enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatography strip test combined with immunomagnetic bead separation // *Journal of Food Protection*. – 2008. – Vol. 71, № 4. – P. 781-789.
177. Fisher, M. et al. A combined immunomagnetic separation and lateral flow method for a sensitive on-site detection of *Bacillus anthracis* spores—assessment in water

- and dairy products // *Letters in Applied Microbiology*. – 2009. – Vol. 48, № 4. – P. 413-418.
178. Qi, H. et al. A rapid and highly sensitive protocol for the detection of *Escherichia coli* O157: H7 based on immunochromatography assay combined with the enrichment technique of immunomagnetic nanoparticles // *International Journal of Nanomedicine*. – 2011. – Vol. 6. – P. 3033.
179. Xi, C. et al. Establishing of a method combined immunomagnetic separation with colloidal gold lateral flow assay and its application in rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 // *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. – 2013. – Vol. 41, № 12. – P. 1812-1816.
180. Chivers, C.E. et al. How the biotin–streptavidin interaction was made even stronger: investigation via crystallography and a chimaeric tetramer // *Biochemical Journal*. – 2011. – Vol. 435, № 1. – P. 55-63.
181. Jain, A. and Cheng, K. The principles and applications of avidin-based nanoparticles in drug delivery and diagnosis // *Journal of Controlled Release*. – 2017. – Vol. 245. – P. 27-40.
182. Rosebrough, S.F. and Hartley, D.F. Biochemical modification of streptavidin and avidin: in vitro and in vivo analysis // *Journal of Nuclear Medicine*. – 1996. – Vol. 37, № 8. – P. 1380-1384.
183. Zhao, X. et al. Development and evaluation of colloidal gold immunochromatographic strip for detection of *Escherichia coli* O157 // *African Journal of Microbiology Research*. – 2010. – Vol. 4, № 9. – P. 663-670.
184. Cho, I.H. and Irudayaraj, J. Lateral-flow enzyme immunoconcentration for rapid detection of *Listeria monocytogenes* // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2013. – Vol. 405, № 10. – P. 3313-3319.
185. Liu, R. et al. Silver enhancement of gold nanoparticles for biosensing: from qualitative to quantitative // *Applied Spectroscopy Reviews*. – 2013. – Vol. 49, № 2. – P. 121-138.

186. Anfossi, L. et al. Increased sensitivity of lateral flow immunoassay for ochratoxin A through silver enhancement. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. – 2013. – Vol. 405, № 30. – P. 9859-9867.
187. Yang, W. et al. A colloidal gold probe-based silver enhancement immunochromatographic assay for the rapid detection of abrin-a // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2011. – Vol. 26, № 8. – P. 3710-3713.
188. Wen, J., Zhou, S. and Yuan, Y. Graphene oxide as nanogold carrier for ultrasensitive electrochemical immunoassay of *Shewanella oneidensis* with silver enhancement strategy // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2014. – Vol. 52. – P. 44-49.
189. Loynachan, C.N. et al. Platinum nanocatalyst amplification: redefining the gold standard for lateral flow immunoassays with ultrabroad dynamic range // *ACS Nano*. – 2018. – Vol. 12, № 1. – P. 279-288.
190. Jiang, T. et al. Sensitive detection of *Escherichia coli* O157: H7 using Pt–Au bimetal nanoparticles with peroxidase-like amplification // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – Vol. 77. – P. 687-694.
191. Zhang, J. et al. Gold-platinum nanoflowers as a label and as an enzyme mimic for use in highly sensitive lateral flow immunoassays: application to detection of rabbit IgG // *Microchimica Acta*. – 2019. – Vol. 186, № 6. – P. 1-9.
192. PM 7/98 (4) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity // *EPPO Bulletin*. – 2019. Vol. 49, № 3. P. 530-563.
193. Brenner, S. and Horne, R.W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1959. – Vol. 34. – P. 103-110.
194. Karasev, A.V. et al. Genetic diversity of the ordinary strain of Potato virus Y (PVY) and origin of recombinant PVY strains // *Phytopathology*. – 2011. – Vol. 101, № 7. – P. 778-785.

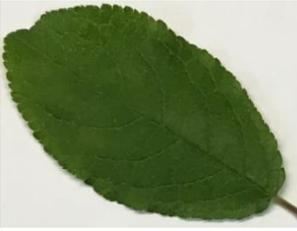
195. Стандартиформ, ГОСТ 33996—2016. Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества. Seed potatoes. Specifications and methods of determining the quality. 2020: Moscow.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Данные апробации тест-системы на ИХА для детекции *E. amylovora*

№ образца	№ растения и кластера	Часть растения, образца	Изображение исходного образца	ИХА			FLASH- ПЦР	
				Тест-полоска	Значение	Результат	Значение	Результат
1	1.1	Лист, груша			2,4	+	7,2	+
2	1.2	Лист, груша			3,3	+	6,6	+
3	1.3	Лист, груша			0	-	5,3	+

4	2.1	Лист, терновник			0	-	1,1	-
5	2.2	Лист, терновник			0	-	4,1	+
6	2.3	Ветка, терновник			0	-	1,1	-
7	3.1	Лист, груша			0	-	6,5	+

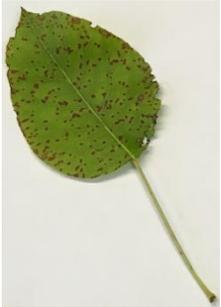
8	3.2	Лист, груша			2,2	+/-	4,6	+
9	3.3	Лист, груша			0	-	7,0	+
10	4.1	Лист, груша			0	-	3,7	+
11	4.2	Лист, груша			0	-	4,3	+

12	4.3	Лист, груша			2,8	+	6,3	+
13	4.4	Лист, груша			2,2	+	5,1	+
14	4.5	Лист, груша			5,3	+	6,4	+
15	4.6	Ветка, груша			1,4	+/-	4,6	+

16	5.1	Лист, боярышник			0	-	10,3	+
17	5.2	Лист, боярышник			2,6	+	8,2	+
18	5.3	Лист, боярышник			2,2	+/-	8,2	+
19	5.4	Лист, боярышник			3,0	+	9,2	+

20	5.5	Лист, боярышник			2,0	+	5,7	+
21	5.6	Лист, боярышник			0	-	7,2	+
22	5.7	Цветы, боярышник			5,3	+	8,4	+
23	5.8	Цветы, боярышник			7,7	+	8,3	+

24	5.9	Ветка, боярышник			6,9	+	8,0	+
25	6.1	Лист, груша			1,4	+/-	3,9	+
26	6.2	Лист, груша			1,6	+/-	3,2	+
27	6.3	Лист, груша			3,6	+	6,2	+

28	7.2	Лист, груша			2,1	/-	6,1	+
29	7.3	Лист, груша			0	-	3,8	+
30	8.1	Лист, груша			0	-	4,9	+
31	8.2	Лист, груша			0	-	1,1	-

32	8.3	Лист, груша			3,1	+	6,2	+
33	8.4	Лист, груша			3,8	+	7,8	+
34	8.5	Лист, груша			1,5	+	4,6	+
35	9.1	Лист, груша			1,7	+/-	4,1	+

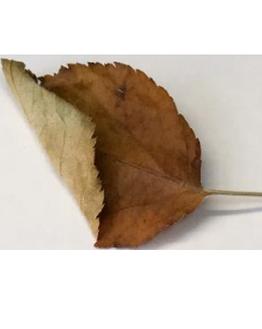
36	9.2	Лист, груша			2,2	+	4,5	+
37	9.3	Ветка, груша			1,7	+	4,5	+
38	10.1	Лист, груша			2,6	+	7,5	+
39	10.2	Лист, груша			1,9	+	1,1	-

40	10.3	Лист, груша			1,8	+	1,1	-
41	11.1	Лист, груша			3,6	+	3,2	+
42	11.2	Лист, груша			4,2	+	1,04	-
43	11.3	Ветка, груша			1,9	+	6,4	+

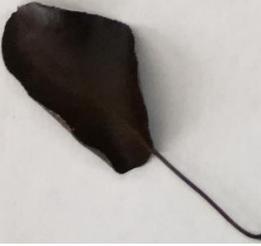
44	11.4	Лист, груша			1,6	+	2,8	+
45	11.5	Ветка, груша			0	-	6,5	+
46	11.6	Ветка, груша			0	-	4,1	+
47	12.1	Лист, груша			0	-	3,1	+

48	12.2	Лист, груша			0	-	2,2	+
49	12.3	Лист, груша			0	-	2,7	+
50	13.1	Лист, яблоко			0	-	1,1	-
51	13.2	Лист, яблоко			0	-	4,8	+

52	13.3	Плод, яблоко			3,2	+	5,8	+
53	13.4	Цветы, яблоко			0	-	5,6	+
54	13.5	Плод (цветонос), яблоко			4,1	+	11,3	+
55	14.1	Плод, яблоко			6,0	+	5,0	+
56	14.2	Плод, яблоко			4,3	+	9,1	+

57	14.3	Цветы, яблоко			0	-	9,8	+
58	14.4	Цветы, яблоко			3,6	+	9,6	+
59	14.5	Цветы, яблоко			4,0	+	1,4	-
60	14.6	Лист, яблоко			0	-	7,6	+
61	15.1	Лист, яблоко			0	-	7,2	+

62	15.2	Лист, яблоко			0	-	1,3	-
63	15.3	Плод (цветонос), яблоко			2,3	+	6,8	+
64	15.4	Ветка, яблоко			0	-	9,8	+
65	15.5	Цветы, яблоко			0	-	9,4	+
66	16.1	Лист, груша			0	-	6,2	+

67	16.2	Лист, груша			0	-	1,3	-
68	16.3	Лист, груша			2,5	+	1,3	-
69	16.4	Лист, груша			1,9	+	7,6	+
70	16.5	Лист, груша			1,3	+	7,6	+

71	16.6	Лист, груша			2,5	+	1,4	-
72	17.1	Лист, груша			1,7	+	7,2	+
73	17.2	Лист, груша			2,4	+	6,6	+
74	18.1	Лист, груша			2,9	+	5,6	+

75	18.2	Лист, груша			2,7	+	6,2	+
76	19.1	Лист, боярышник			2,4	+	5,4	+
77	19.2	Лист, боярышник			1,5	+	5,7	+
78	19.3	Плод (цветонос), боярышник			1,7	+	6,1	+
79	19.4	Цветы, боярышник			7,3	+	10,3	+

80	20.1	Эксудат от ветки боярышника			7,1	+	11,6	+
81	20.2	Лист, боярышник			3,6	+	6,6	+
82	20.3	Ветка, боярышник			7,9	+	12,9	+
83	20.5	Ветка, боярышник			6,4	+	12,2	+
84	20.6	Лист, боярышник			5,5	+	13,5	+

85	21.1	Лист, груша			3,1	+	6,0	+
86	21.2	Кора, груша			2,0	+	10,3	+
87	21.3	Кора, груша			1,1	+/-	12,0	+
88	22.1	Ветка, вишня			2,4	+	10,7	+
89	22.2	Лист, вишня			1,8	+	10,2	+

90	22.3	Ветка, вишня			1,4	+	5,3	+
91	22.4	Лист, вишня			0	-	1,4	-
92	22.5	Лист, вишня			0	-	1,1	-
93	23.1	Лист, айва			0	-	7,2	+
94	23.2	Лист, айва			3,7	+	1,4	-

95	23.3	Лист, айва			2,9	+	1,1	-
96	23.4	Лист, айва			0	-	9,1	+
97	24.1	Лист, груша			0	-	6,0	+
98	24.2	Лист, груша			0	-	1,3	-

99	24.3	Лист, груша			0	-	1,1	-
100	24.4	Лист, груша			0	-	5,9	+
101	26.1	Лист, груша			2,7	+	1,1	-
102	26.2	Лист, груша			2,8	+	5,8	+

103	27.1	Лист, груша			2,1	+	1,2	-
104	27.2	Лист, груша			2,3	+	5,7	+
105	27.3	Цветы, груша			0	-	7,0	+
106	28.1	Лист, груша			3,5	+	9,0	+

107	28.2	Лист, груша			3,3	+	11,1	+
108	28.3	Черешки, груша			7,1	+	6,6	+
109	29.1	Лист, груша			4,7	+	9,0	+
110	29.1.1	Лист, груша			4,8	+	7,4	+

111	29.2	Лист, груша			4,6	+	9,0	+
112	29.2.2	Лист, груша			3,3	+	9,1	+
113	29.3.2	Черешки, груша			9,1	+	11,5	+
114	29.3.3	Черешки, груша			11, 9	+	11,8	+

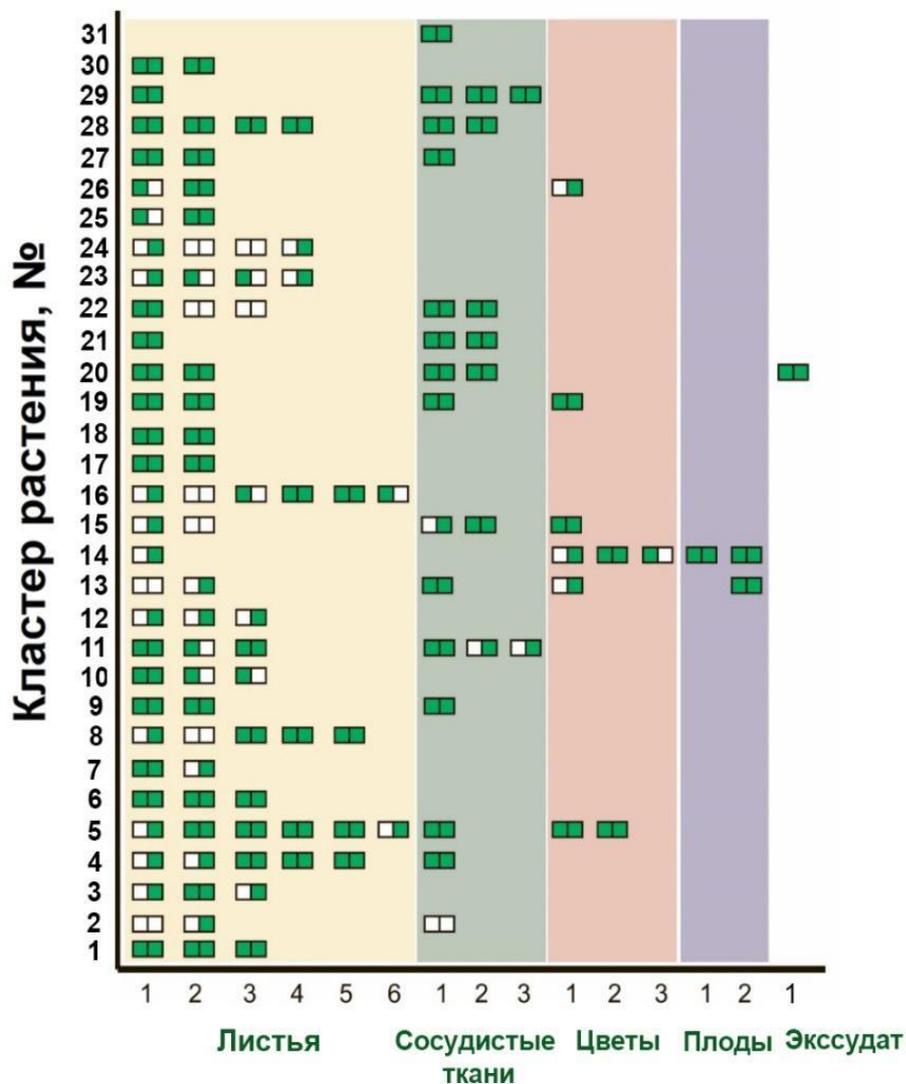
115	30.1	Лист, груша			5,6	+	9,8	+
116	30.3.1	Черешка, груша			2,5	+	11,9	+
117	30.3.2	Черешки, груша			4,5	+	10,6	+
118	30.3.3	Черешки, груша			2,3	+	7,8	+

119	35.1	Лист, яблоко			3,9	+	7,2	+
120	35.5	Лист, яблоко			4,5	+	7,9	+
121	36.2	Черешки, яблоко			6,1	+	11,3	+

*Значение – данные интенсивности окрашивания

**Значение – данные, полученные FLASH-PCR

Результаты апробации тест-системы на ИХА для детекции *E. amylovora**



*Результаты ИХА (левый квадрат) и FLASH-ПЦР (правый квадрат). Зеленый цвет – положительный результат; белый цвет – отрицательный результат.