

УДК 57:088.1

## ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МИКРОЦИСТИНА-LR В МОРЕПРОДУКТАХ

© 2021 г. Е. А. Зверева<sup>1</sup>, О. Д. Гендриксон<sup>1</sup>, А. В. Жердев<sup>1</sup>, \*, Б. Б. Дзантиев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: zherdev@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 30.11.2020 г.

После доработки 01.12.2020 г.

Принята к публикации 22.12.2020 г.

Для экспрессного контроля высокотоксичного фикотоксина микроцистина-LR в морепродуктах разработаны и сопоставлены иммунохроматографические тест-системы с использованием в качестве маркеров двух видов наночастиц золота – сферических частиц и частиц с развитой поверхностью (“наноцветов”). Функционирование тест-систем основано на непрямом конкурентном анализе, в котором детектируемые иммунные комплексы включают нативные специфичные к микроцистину-LR антитела и меченные наночастицами антивидовые антитела. Разработанные тест-системы позволяют детектировать микроцистин-LR в течение 18 мин с инструментальными пределами обнаружения, равными 0.2 и 0.1 нг/мл при использовании сферических наночастиц и наноцветов золота соответственно. Визуальный предел обнаружения составил 1 нг/мл для обеих схем. Охарактеризованы параметры наночастиц, обуславливающие аналитические характеристики тест-систем с их использованием. Показана пригодность разработанных тест-систем для контроля контаминации проб рыбы и морепродуктов (креветки, осьминоги, кальмары, мидии), сочетающего экспрессные стадии пробоподготовки и иммунохроматографии.

**Ключевые слова:** фикотоксины, микроцистин-LR, иммунохроматографический анализ, безопасность пищевой продукции

**DOI:** 10.31857/S055510992103017X

Развитие мирового рынка продовольствия обусловило значимость оперативного мониторинга контаминации продуктов питания на разных этапах производства и потребления [1]. В данной ситуации возрастает потребность в достоверном, производительном и чувствительном контроле токсичных контаминант, которые могут присутствовать в используемом сырье и готовой пищевой продукции. Принципиальное значение имеет возможность быстрого, в течение 5–15 мин, получения информации о наличии и уровне контролируемых соединений, что позволяет оперативно предпринять действия по защите от воздействия токсичных контаминант.

Высокотоксичный фикотоксин микроцистин-LR (MC-LR) продуцируется цианобактериями, главным образом, *Microcystis aeruginosa*, которые входят в состав планктона и бентоса и служат пищей для многих водных организмов, в том числе для моллюсков и рыбы, накапливаясь в их организмах [2]. Из различных микроцистинов MC-LR является наиболее распространенной и изученной формой [3]. Перенос MC-LR вдоль пищевых

цепочек приводит к серьезной опасности для человека. Попадание в организм человека происходит при употреблении контаминированной воды и морепродуктов [4, 5]. Острое токсическое действие выражается в абдоминальном болевом синдроме, тошноте, рвоте, диарее, головных болях, сухом кашле, пневмонии. Хроническое воздействие MC-LR обусловлено его высокой гепатотоксичностью, генотоксичностью и канцерогенностью [6]. По строению MC-LR представляет собой циклический гептапептид, стабильный в широком диапазоне pH и температур. Благодаря циклической структуре разрушение MC-LR в организме затруднено, что способствует его накоплению и развитию тяжелых токсических эффектов [7].

Учитывая высокую степень токсичности фикотоксинов, принципиальное значение имеет расширение панели существующих аналитических методов их обнаружения за счет новых экспрессных методов с минимумом компонентов и простым протоколом, не зависящим от внешних ресурсов и квалификации персонала. К ним от-

носятся, в частности, иммунохроматографические тест-системы [8].

В иммунохроматографическом анализе (ИХА) микроцистина используется широкий спектр маркеров – флуоресцентные, хемилюминесцентные метки, ферменты, коллоидное золото [9–14]. Применение флуоресцентных и хемилюминесцентных меток позволяет детектировать микроцистин с пределом обнаружения (ПО) в пикограммовом диапазоне, однако требует специального оборудования (детекторы, сканеры) [10, 14].

Использование сферических наночастиц золота (НЧЗ), наиболее распространенных меток в ИХА, позволяет получить воспроизводимый аналитический сигнал при окрашивании зон на тест-полосках в красный цвет и проводить визуальную детекцию с высокой чувствительностью. Так, для иммунохроматографических систем детекции МС-LR в пробах воды, основанных на использовании НЧЗ, показана возможность обнаружения МС-LR в концентрациях до 1 нг/мл [15–17]. В работе [18] показано изменение окраски тестовой зоны при тестировании проб речной воды в интервале концентраций МС-LR 0.1–0.3 нг/мл.

Известно, что коллоидное золото, обладая плазмонными свойствами, может образовывать золи разного цвета, который определяется формой и размером его частиц [19]. Использование наночастиц золота (НЦЗ) в ИХА обеспечивает синее окрашивание, что увеличивает контрастность и чувствительность анализа, как было показано на примере ИХА Т2-токсина [20]. В предыдущей работе нами были предложены тест-системы для детекции микроцистина-LR в воде и образцах рыбы, основанные на прямом и непрямом форматах ИХА [21]. В качестве меченых иммунореагентов использовались конъюгаты специфических или антивидовых антител с НЧЗ. Непрямое введение метки путем замены конъюгата специфических антител с НЧЗ комбинацией нативных специфических антител и меченых антивидовых антител позволило снизить предел обнаружения МС-LR до 0.2 нг/мл, не усложняя при этом тестирование в целом.

Цель работы – сравнение иммунохроматографических тест-систем, основанных на непрямом введении НЧЗ или НЦЗ в качестве меток, для обнаружения микроцистина-LR и апробация данных тест-систем как средств контроля МС-LR в экстрактах рыбы и морепродуктов.

## МЕТОДИКА

**Реактивы.** В работе использовали МС-LR, этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), бычий сывороточный альбумин (БСА), золотохлористово-

дородную кислоту (НАuCl<sub>4</sub>), сахарозу, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), азид натрия, гидрохинон, детергенты тритон X-100 и твин-20 (“Sigma-Aldrich”, США), моноклональные антитела к микроцистину-LR и конъюгат МС-LR–БСА (“Eximio Biotec”, Китай), антитела козы против иммуноглобулинов мыши (АК) и антитела осла против иммуноглобулинов козы (АО) (“Arista Biological”, США), а также антитела козы против иммуноглобулинов мыши, меченные пероксидазой хрена (АК–ПХ, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия).

Для получения НЧЗ, НЦЗ и их конъюгатов с антителами использовали воду, деионизированную с помощью установки Milli-Q (“Millipore”, США). Исходный раствор МС-LR (2 мг/мл) готовили в метаноле (“Fluka”, США) и хранили при 4°C.

Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили в 96-луночных прозрачных полистироловых микропланшетах Costar 9018 (“Corning Costar”, США).

**ИФА микроцистина.** В лунках микропланшета сорбировали по 100 мкл конъюгата МС-LR–БСА в концентрации 0.5 мкг/мл в 50 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7.4, содержащем 100 мМ NaCl (ФБС), в течение 16 ч при 4°C. После четырехкратной отмывки ФБС, содержащем 0.05% детергента Тритон X-100 (ФБСТ), в лунки вносили по 50 мкл раствора МС-LR (от 10 до 0.005 нг/мл) в ФБСТ, добавляли по 50 мкл специфических антител в концентрации 10 нг/мл и инкубировали в течение 60 мин при 37°C. После отмывки ФБСТ в лунки микропланшета добавляли по 100 мкл АК–ПХ в разведении 1 : 5000 и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Микропланшет отмывали 4 раза ФБСТ и 1 раз дистиллированной водой и определяли активность ПХ. Для этого в лунки микропланшета вносили по 100 мкл раствора субстрата (0.42 мМ ТМБ и 1.8 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 0.1 М цитратном буферном буфере, рН 4.0), инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре и останавливали реакцию добавлением 1.0 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 мкл на лунку). Оптическую плотность (ОП) продукта реакции измеряли при 450 нм с использованием микропланшетного фотометра Zenyth 3100 (“Anthos Labtec Instruments”, Австрия).

**Синтез сферических наночастиц золота.** Синтез НЧЗ проводили в соответствии с методом [22], для чего к 48.75 мл деионизированной воды добавляли 0.5 мл 1%-ного раствора НАuCl<sub>4</sub> и довели смесь до кипения. После этого для получения НЧЗ диаметром 30 нм в смесь вносили 0.75 мл 1%-ного раствора цитрата натрия, а для получения НЧЗ диаметром 10 нм – 1.5 мл 1%-ного рас-

творца цитрата натрия. Растворы кипятили при перемешивании с использованием обратного холодильника в течение 25 мин. Полученные препараты охлаждали и хранили при 4°C.

**Синтез наночастиц золота.** НЦЗ получали методом доразрастворения согласно [20] с модификациями. В качестве центров нуклеации использовали предварительно синтезированные сферические НЧЗ диаметром 10 нм. К 10 мл деионизированной воды последовательно вносили водный раствор  $\text{HAuCl}_4$  в конечной концентрации 0.12 мМ, раствор НЧЗ в концентрации 0.5% об., 22 мкл 1%-ного водного раствора цитрата натрия и 100 мкл 0.3 М гидрохинона в 0.1 М натрий-цитратном буфере, pH 4.0. Реакцию проводили при комнатной температуре и перемешивании в течение 30 мин.

**Получение конъюгатов НЧЗ и НЦЗ с антителами.** АК с концентрацией 6 мкг/мл, выбранной согласно [21], диализовали против 10 мМ трис-НСI буфера, pH 8.5, и вносили в раствор НЧЗ или НЦЗ с pH, предварительно доведенным до 8.5 добавлением 0.1 М  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Смеси инкубировали 45 мин при перемешивании и комнатной температуре, вносили раствор 10%-ного БСА в объемном соотношении 40 : 1 и перемешивали еще 15 мин. Полученные конъюгаты осаждали центрифугированием при 8500 г в течение 15 мин при 4°C и ресуспендировали в 10 мМ трис-НСI буфере, pH 8.5, содержащем 1.0% БСА, 1.0% сахарозы и 0.05% азида натрия (ТБСА). Конъюгаты хранили при 4°C.

**Определение размеров НЧЗ и НЦЗ.** Размерные характеристики препаратов НЧЗ и НЦЗ определяли методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Растворы НЧЗ и НЦЗ наносили на сеточки (300 меш.), покрытые пленкой-подложкой из поливинилформала, растворенного в хлороформе. Микрофотографии получали с помощью электронного микроскопа JEM-100C (“Jeol”, Япония) и анализировали, используя программу Image Tool (Научный центр здоровья при Техасском Университете в Сан-Антонио, США).

**Изготовление иммунохроматографических тест-систем.** Были использованы наборы мембран, включающие пластиковую подложку с нанесенной на нее нитроцеллюлозной мембраной CNPC (размер пор 15 мкм, “MDI”, Индия), разделительную мембрану GFB-R4, адсорбционную мембрану AP045 и мембрану из стекловолокна PT-R7 MdiEa-spack (“Advanced Microdevices”, Индия).

Для формирования аналитической зоны на рабочую мембрану наносили конъюгат MC-LR-БСА (0.75 мг/мл в ФБС); контрольную зону формировали нанесением АО (0.5 мг/мл в ФБС). Реагенты иммобилизовали с помощью автоматического диспенсера IsoFlow (“Imagene Technology”, США)

из расчета 0.1 мкл на 1 мм мембраны. На стекловолоконную мембрану вручную наносили конъюгаты АК-НЧЗ и АК-НЦЗ в ТБСА, содержащем 0.05% Твин-20, в разведении, соответствующем  $\text{ОП}_{520} = 2.5$ . Нагрузка конъюгатов антител с НЧЗ и НЦЗ составляла 32 мкл на 1 см стекловолоконной мембраны.

Мембраны высушивали в течение не менее 20 ч при комнатной температуре и собирали мульти-мембранный композит, который затем нарезали с помощью автоматического гильотинного резчика Index Cutter-1 (“A-Point Technologies”, США) на тест-полоски шириной 3.0 мм.

**Приготовление проб морепродуктов.** Тестируемая пищевая продукция – рыба (треска), мидии, креветки, осьминоги и кальмары – была приобретена в супермаркетах г. Москва (Россия). Пробоподготовка проводилась по методу, предложенному в [21]. Из гомогенизированных проб MC-LR экстрагировали 5%-ным раствором уксусной кислоты, содержащей 0.01 М ЭДТА, в течение 15 мин при перемешивании. Экстракты центрифугировали при 15000 г в течение 15 мин. Супернатанты выпаривали, перерастворяли в ФБС и использовали для анализа.

**ИХА микроцистина.** В лунки микропланшета вносили по 50 мкл раствора MC-LR (от 100 до 0.01 нг/мл в ФБСТ) или экстракты морепродуктов. Добавляли по 50 мкл антител (200 нг/мл в ФБСТ) и инкубировали 3 мин при комнатной температуре, после чего погружали в лунку тест-полоски и через 15 мин контролировали результат анализа.

**Детекция результатов ИХА.** Тест-полоски сканировали с помощью сканера CanoScan LiDE 90 (“Canon”, Япония) и определяли интенсивность окрашивания аналитических зон, используя программу TotalLab (“Nonlinear Dynamics”, Великобритания).

**Обработка результатов ИФА и ИХА.** Зависимость интенсивности аналитического сигнала от концентрации MC-LR аппроксимировали при помощи программного продукта Origin (“Origin Lab”, США), используя четырехпараметрическую сигмоидную функцию:

$$Y = (A - B) / (1 + (x/C)^D) + B,$$

где  $x$  – концентрация MC-LR в пробе,  $y$  – интенсивность аналитического сигнала,  $A$  и  $B$  – асимптотические максимум и минимум (фоновое значение) аналитического сигнала,  $C$  – точка перегиба кривой в полулогарифмических координатах (50%-ное ингибирование сигнала) и  $D$  – наклон кривой в точке перегиба.

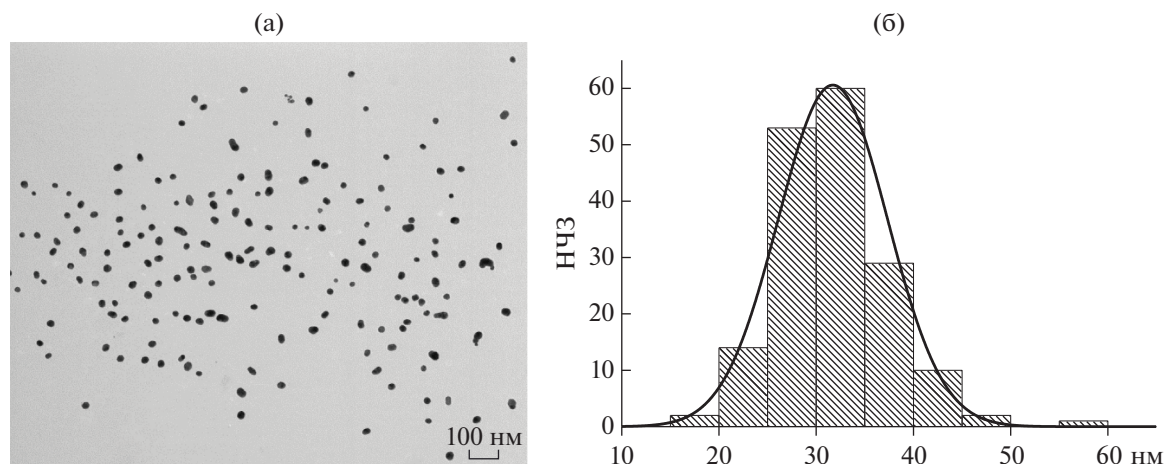


Рис. 1. Микрофотография НЧЗ (а) и гистограмма их распределения по диаметру (б).

Концентрацию МС-LR, вызывающую 10%-ное снижение сигнала, ( $IC_{10}$ ) рассматривали как количественный (для ИХА — инструментальный) предел обнаружения [23]. Концентрации МС-LR, вызывающие 20- и 80%-ное снижение сигнала, рассматривали в качестве нижнего и верхнего пределов рабочего диапазона определяемых концентраций. Визуальный предел обнаружения соответствовал минимальной концентрации МС-LR, при которой наблюдалось полное отсутствие окрашивания в аналитической зоне.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Получение и характеристика иммунореагентов.

При разработке иммунохроматографического определения МС-LR применялось коллоидное золото — метка, широко используемая в колориметрическом ИХА [24]. Были получены наномаркеры двух типов, различающиеся по форме и размерным характеристикам, — сферические наночастицы и так называемые наноцветы. Сферические наночастицы золота были синтезированы одностадийным восстановлением  $\text{HAuCl}_4$  цитратом натрия. Соотношение реагентов и время реакции было выбрано с целью получения НЧЗ диаметром 30 нм. Нанодисперсный носитель такого размера оптимален в иммунохроматографии, поскольку обеспечивает высокий аналитический сигнал и хорошую сорбционную емкость [25].

Препарат был изучен методом ПЭМ. Полученные данные (рис. 1) свидетельствуют о том, что синтезированные НЧЗ были гомогенны, имели округлую форму и характеризовались средним размером  $31.7 \pm 5.6$  нм (минимальный диаметр наночастиц составлял 18.18 нм, максимальный диаметр — 59.60 нм). Агрегаты в препарате отсутствовали.

Синтез НЧЗ проводили методом доразщипывания сферических наночастиц. Для этого к смеси  $\text{HAuCl}_4$ , цитрата натрия и гидрохинона добавляли предварительно синтезированные НЧЗ малого диаметра (около 10 нм), служащие центрами нуклеации. Синтезированные НЧЗ характеризовали спектрально и методом ПЭМ. Согласно полученным спектральным данным (рис. 2), максимум поглощения для НЧЗ (центров нуклеации) составлял 520 нм, а для НЦЗ — 600 нм. Сдвиг максимумов поглощения для НЦЗ в более длинноволновую область по сравнению с НЧЗ свидетельствовал об образовании более крупных наночастиц. Характеристика препарата НЦЗ методом ПЭМ показала, что он содержит одиночные наночастицы с игольчатой поверхностью. Размер частиц варьировал в пределах 80–90 нм.

Иммунохимические свойства моноклональных антител к МС-LR были охарактеризованы методом непрямого ИФА. В данном формате свободный определяемый МС-LR в растворе и иммобилизованный микроцистин в составе белкового конъюгата конкурентно взаимодействовали со специфическими антителами. Согласно полученной конкурентной кривой определения МС-LR (рис. 3), ПО микроцистина в ИФА составил 0.01 нг/мл. Продемонстрированная высокая чувствительность детекции МС-LR в ИФА подтвердила возможность разработки экспрессного иммуноанализа с использованием данного клона антител.

Полученные НЧЗ и НЦЗ конъюгировали с антивидовыми антителами методом физической адсорбции. Предварительно была выбрана оптимальная концентрация АК для получения конъюгата. Для этого была получена флокуляционная кривая зависимости ОП конъюгата АК–НЧЗ от концентрации иммобилизованных антител в среде, содер-

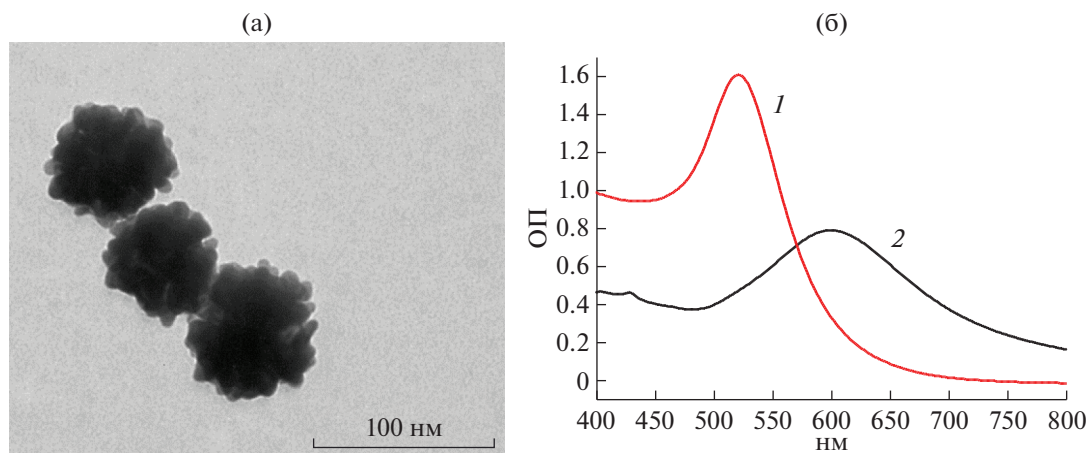


Рис. 2. Характеристика НЦЗ методом ПЭМ (а) и спектрально (б): 1 – исходные НЧЗ; 2 – НЦЗ.

жашей коагулирующий агент. Адсорбированные на поверхности НЧЗ иммуноглобулины обуславливали их стабилизацию, предотвращая агрегацию при добавлении коагулянта. При концентрации антител, равной 6 мкг/мл, зависимость ОП выходила на плато, что свидетельствовало о стабилизации НЧЗ молекулами иммуноглобулинов [21]. При меньших концентрациях антител НЧЗ дестабилизировались и флокулировали, о чем свидетельствовал рост ОП. Поэтому данная концентрация и была выбрана для конъюгации антител с НЧЗ и НЦЗ.

**Разработка ИХА микроцистина.** В работе был реализован непрямой формат ИХА микроцистина, в котором введение наномаркера в аналитическую систему осуществлялось посредством конъюгации с антивидовыми антителами. Для прямого ИХА на рабочей мембране тест-полоски формировали две зоны – аналитическую и контрольную с иммобилизацией белкового конъюгата МС-LR и антивидовых антител соответственно. ИХА включал две стадии: предварительную инкубацию пробы, содержащей МС-LR, со специфическими антителами, а затем инкубацию тест-полоски с этой смесью. Если МС-LR в образце отсутствует, специфические антитела связываются с мечеными золотом антивидовыми антителами, иммобилизованными на стекловолоконной мембране, а затем этот комплекс перемещается в аналитическую зону и концентрируется там с образованием первой окрашенной линии. При наличии МС-LR в пробе последний взаимодействует с антителами, блокируя их активные центры и препятствуя связыванию с конъюгатом МС-LR–БСА. Следовательно, окрашивания в аналитической зоне тест-полоски не происходит.

Протокол анализа был оптимизирован для достижения минимального предела обнаружения МС-LR. Оптимизация включала выбор концентраций иммунореагентов на рабочей мембране и в растворе, а также продолжительности стадий анализа. Концентрацию адсорбированного конъюгата МС-LR–БСА варьировали в диапазоне 0.2–1.2 мг/мл, меченные НЧЗ и НЦЗ антивидовые антитела наносили на стекловолоконную мембрану в диапазоне концентраций, соответствующих  $ОП_{520} = 0.5–3.5$ , а АО иммобилизовали в диапазоне концентраций 0.5–1 мг/мл. Время предынкубации образца, содержащего МС-LR, со специфическими антителами варьировали от 2 до 10 мин, а время инкубации тест-полоски с пробой – от 8 до 20 мин. Было показано, что минимальный ПО МС-LR достигался при концентрациях МС-LR–БСА и АО, равных 0.75 и 0.5 мг/мл

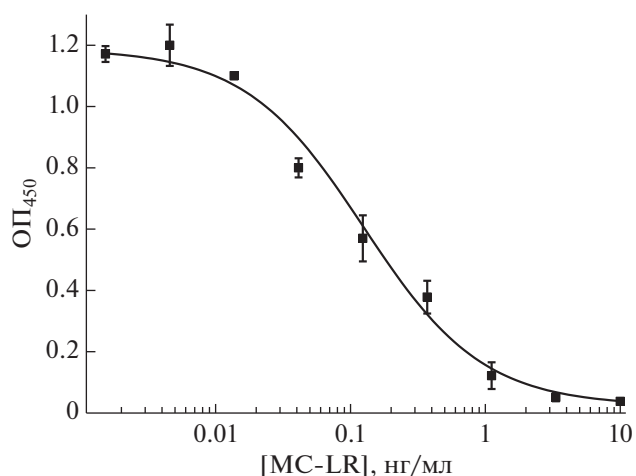
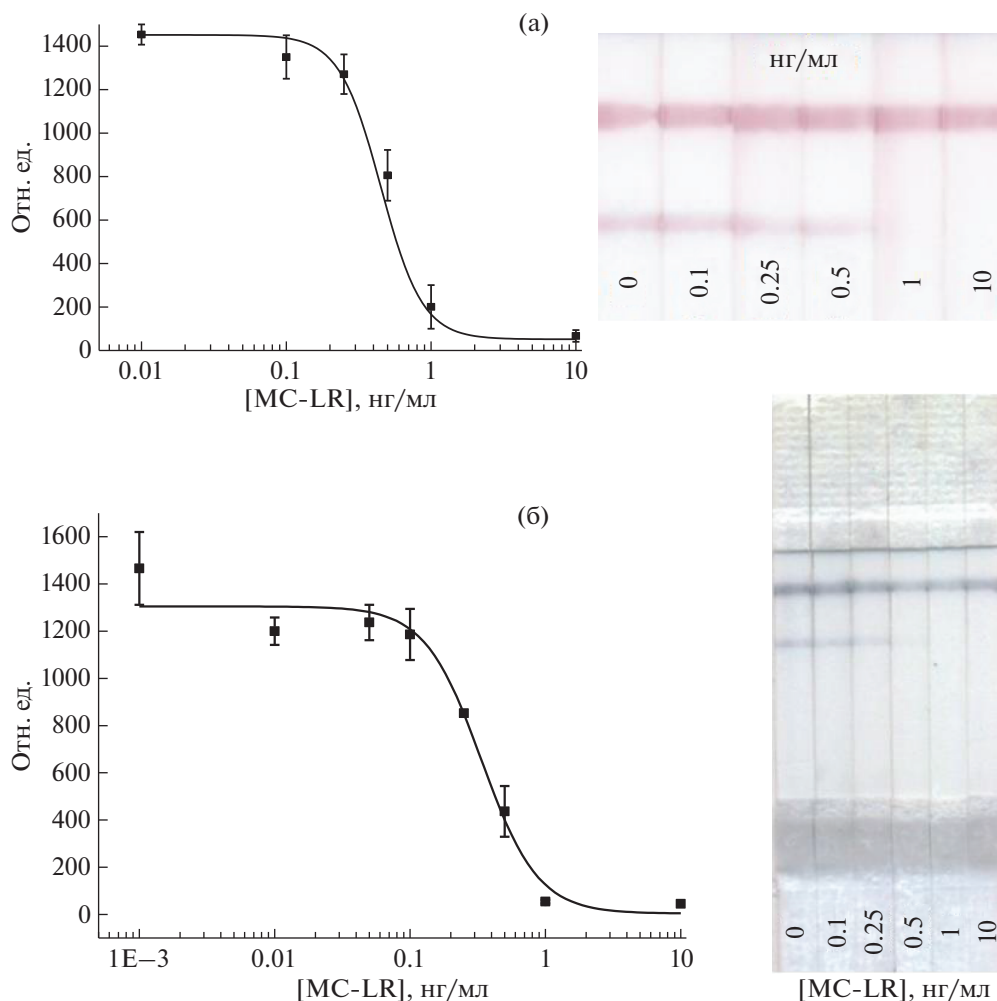


Рис. 3. Конкурентная кривая определения МС-LR в ИФА.



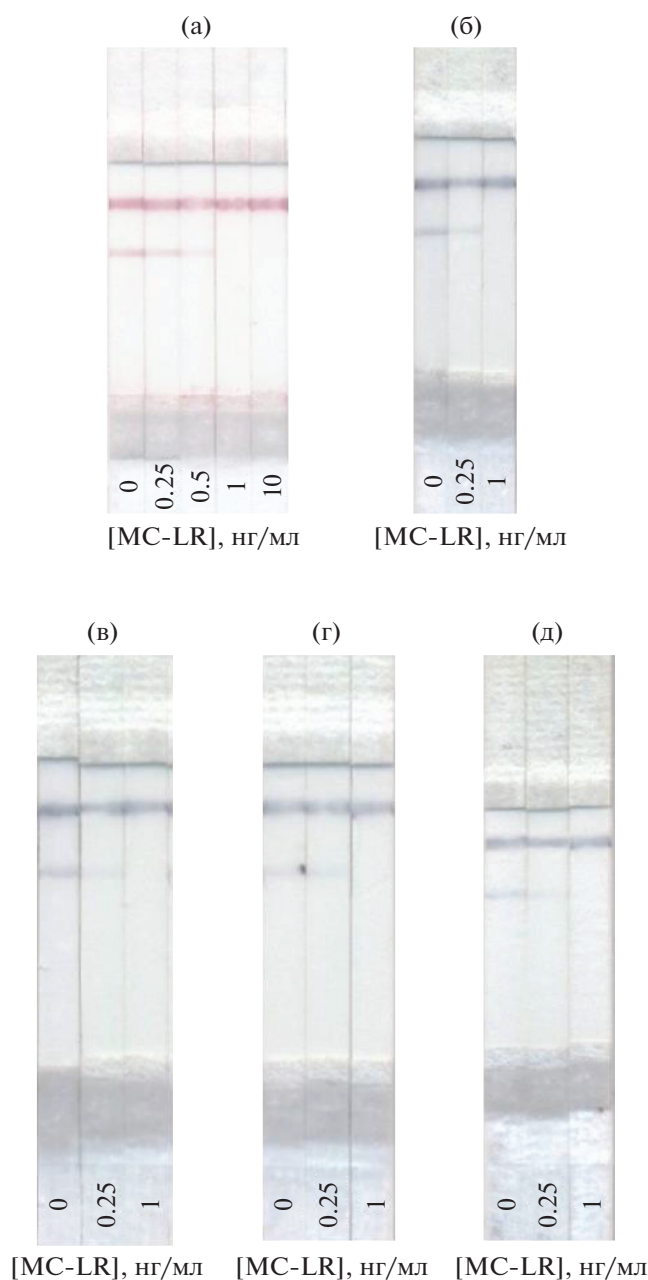
**Рис. 4.** Калибровочные кривые определения MC-LR в ИХА с использованием НЧЗ (а) и НЦЗ (б) и соответствующие тест-полоски ( $n = 3$ ).

соответственно, и количестве конъюгатов АК–НЧЗ и АК–НЦЗ, соответствующем  $OP_{520} = 2.0$ . Оптимальная продолжительность первой стадии ИХА (предынкубация антител с MC-LR) составила 3 мин, второй – 15 мин.

Калибровочные кривые MC-LR, полученные в оптимизированных условиях, представлены на рис. 4. Инструментальные ПО/рабочие диапазоны определяемых концентраций MC-LR составили 0.20/0.33–0.77 нг/мл и 0.10/0.17–0.65 нг/мл для ИХА с использованием НЧЗ и НЦЗ соответственно. Визуальные ПО составили 1 нг/мл в обоих случаях, время анализа – 18 мин. Таким образом, сопоставление наночастиц золота разного размера и формы показало, что минимальный предел обнаружения MC-LR обеспечивается при использовании НЦЗ. При реализации ИХА с НЦЗ был достигнут двукратный выигрыш в чувствительности анализа.

**Апробация иммунохроматографических тест-систем.** Полученные данные позволили перейти к апробации разработанных тест-систем для контроля фикотоксина в реальных пробах, контаминированных MC-LR. Были охарактеризованы пробы рыбы (треска), мидий, креветок, осьминогов и кальмаров. Поскольку компоненты матрикса данных проб могут влиять на результаты тестирования, необходима пробоподготовка, обеспечивающая экстракцию фикотоксина, с одной стороны, и нивелирование влияния компонентов проб на результаты ИХА, с другой стороны. Предложенная процедура пробоподготовки состояла из гомогенизации проб с добавленным известным количеством MC-LR, экстракции аналита водно-органической смесью, центрифугирования и выпаривания экстрактов.

В результате проведенной апробации было показано, что тест-системы позволяли качественно



**Рис. 5.** Изображения тест-полосок после ИХА MC-LR в реальных пробах: а – детекция в рыбе (маркер – НЦЗ); б – детекция в креветках (маркер – НЦЗ); в – детекция в осьминогах (маркер – НЦЗ); г – детекция в кальмарах (маркер – НЦЗ); д – детекция в мидиях (маркер – НЦЗ).

определять микроцистин в контаминированных пробах (рис. 5). На тест-полосках регистрируется исчезновение окрашенной линии в аналитической зоне, коррелирующее с увеличением концентрации MC-LR в пробах. Таким образом, проведенная апробация ИХА показала пригодность разработанных тест-систем для определения фикотоксина в морепродуктах.

Авторы выражают благодарность Н.А. Тарановой (ФИЦ Биотехнологии РАН) за помощь в синтезе препаратов НЦЗ и С.М. Придворовой (ФИЦ Биотехнологии РАН) за получение электронных микрофотографий НЦЗ и НЦЗ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 20-43-07001).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thompson L.A., Darwish W.S. // J. Toxicol. 2019. Article 2345283. <https://www.hindawi.com/journals/jt/2019/2345283/>
2. Pham T.L., Utsumi M. // J. Environ. Manage. 2018. V. 213. P. 520–529.
3. Rastogi R.P., Sinha R.P., Incharoensakdi A. // Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 2014. V. 13. № 2. P. 215–249.
4. Flores N.M., Miller T.R., Stockwell J.D. // Front. Mar. Sci. 2018. V. 5. № 30. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2018.00030/full>
5. Abeysiriwardena N.M., Gascoigne S.J.L., Anandappa A. // Yale J. Biol. Med. 2018. V. 91. № 2. P. 129–142.
6. Fessard V., Le Hegarat L. // Anal. Bioanal. Chem. 2010. V. 397. № 5. P. 1715–1722.
7. Preece E.P., Hardy F.J., Moore B.C., Bryan M. // Harmful Algae. 2017. V. 61. P. 31–45.
8. Anfossi L., Baggiani C., Giovannoli C., D'Arco G., Giraudi G. // Anal. Bioanal. Chem. 2013. V. 405. № 2–3. P. 467–480.
9. Kim Y.M., Oh S.W., Jeong S.Y., Pyo D.J., Choi E.Y. // Environ. Sci. Technol. 2003. V. 37. № 9. P. 1899–1904.
10. Zhang Y., Ding X.L., Guo M.M., Han T.T., Huang Z.J., Shang H.T., Huang B. // Anal. Methods. 2017. V. 9. № 45. P. 6430–6434.
11. Sun J., Li Y., Pi F., Ji J., Zhang Y., Sun X. // Anal. Bioanal. Chem. 2017. V. 409. № 8. P. 2213–2220.
12. Liu Y., Ji J., Cui F., Sun J., Wu H., Pi F., Zhang Y., Sun X. // Food Control. 2019. V. 95. P. 34–40.
13. Akter S., Kustila T., Leivo J., Muralitharan G., Vehniainen M., Lamminmaki U. // Biosensors. 2019. V. 9. № 2. P. 14672–14685.
14. Pyo D.J., Kim T. // Algae. 2013. V. 28. P. 289–296.
15. Pyo D., Choi J., Hong J., Oo H.H. // J. Immunoas. Immunochem. 2006. V. 27. № 4. P. 291–302.
16. Liu L., Xing C., Yan H., Kuang H., Xu C. // Sensors. 2014. V. 14. № 8. P. 14672–14685.
17. Xing C., Liu L., Song S., Feng M., Kuang H., Xu C. // Biosens. Bioelectron. 2015. V. 66. P. 445–453.
18. Melnik S., Neumann A.C., Karongo R., Dirndorfer S., Stubler M., Ibl V., Niessner R., Knopp D., Stoger E. // Plant Biotechnol. J. 2018. V. 16. № 1. P. 27–38.
19. Eustis S., el-Sayed M.A. // Chem. Soc. Rev. 2006. V. 35. P. 209–217.
20. Petrakova A.V., Urusov A.E., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // Anal. Biochem. 2019. V. 568. P. 7–13.
21. Zvereva E.A., Hendrickson O.D., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // Anal. Methods. 2020. V. 12. P. 392–400.
22. Frens G. // Nat. Phys. Sci. 1973. V. 241. P. 20–22.
23. Uhrovicik J. // Talanta. 2014. V. 119. P. 178–180.
24. Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г. // Успехи биол. химии. 2016. Т. 56. С. 411–450.
25. Huang X., Aguilar Z.P., Xu H., Lai W., Xiong Y. // Biosensors & Bioelectronics. 2016. V. 75. P. 166–180.

## Immunochromatographic Test Systems for the Detection of Microcystin-LR in Seafood

E. A. Zvereva<sup>a</sup>, O. D. Hendrickson<sup>a</sup>, A. V. Zherdev<sup>a, \*</sup>, and B. B. Dzantiev<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

*\*e-mail: zherdev@inbi.ras.ru*

For the rapid control of the highly toxic phycotoxin microcystin-LR in seafood, immunochromatographic test systems have been developed and compared using two types of gold nanoparticles as markers – spherical particles and particles with a developed surface (“nanoflowers”). The functioning of the test systems is based on an indirect competitive assay, in which the detectable immune complexes include native microcystin-specific microcystin-LR antibodies and nanoparticle-labeled anti-species antibodies. The developed test systems allow the detection of microcystin-LR for 18 min with instrumental detection limits equal to 0.2 and 0.1 ng/mL when using spherical nanoparticles and gold nanoflowers, respectively. The visual detection limit was 1 ng / ml for both regimens. The parameters of nanoparticles, which determine the analytical characteristics of test systems with their use, are characterized. The suitability of the developed test systems for the control of contamination of fish and seafood samples (shrimp, octopus, squid, mussels), combining rapid stages of sample preparation and immunochromatography, has been shown.

*Keywords:* phycotoxins, microcystin-LR, immunochromatographic analysis, food safety