

## КОНЬЮГАТЫ ИММУНОГЛОБУЛИН-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК – НАНОЧАСТИЦА ЗОЛОТА: ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА И ПРИМЕНЕНИЕ В ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ СУЛЬФОНИЛАМИДА

© 2022 г. Д. В. Сотников<sup>1</sup>, Л. В. Баршевская<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: dzantiev@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 12.05.2021 г.

После доработки 30.07.2021 г.

Принята к публикации 02.09.2021 г.

Предложена новая методика определения состава конъюгатов белков с наночастицами, основанная на использовании флуорескамина в качестве флуоресцентной метки и позволяющая получать результаты с высокой точностью при минимальной продолжительности и трудоемкости. Охарактеризованы по составу и связыванию иммуноглобулинов конъюгаты наночастиц золота со стрептококковым белком G. Установлены оптимальные концентрации белка G 8 мкг/мл и золотых наночастиц – 2.5 нМ (ОП<sub>520</sub> = 5) со средним диаметром 25 нм. Полученные конъюгаты применили для разработанного иммунохроматографического анализа антибиотика сульфониламида – важного контролируемого загрязнителя пищевой продукции. Непрямое мечение специфических антител позволило использовать в анализе неочищенную кроличью антисыворотку. Визуальный и инструментальный пределы обнаружения сульфониламида составили 100 и 0.3 нг/мл соответственно. Продолжительность анализа – 10 мин. Проведена апробация тест-систем для характеристики проб мёда.

**Ключевые слова:** иммунохроматография, наночастицы золота, флуорескамин, сульфониамиды, мед

**DOI:** 10.31857/S0555109922010081

Уникальные физико-химические и биологические свойства способствовали применению наночастиц золота (НЧЗ) и их модифицированных производных в разнообразных областях науки и техники [1, 2]. Особенно востребованы комплексы НЧЗ с различными белками, используемые для направленного транспорта лекарств [3, 4], иммунизации [5], биоимиджинга [6, 7], в качестве маркерных агентов в аналитических системах [8–10]. Несмотря на накопленный опыт и большое количество работ, посвященных конъюгированию белков с наночастицами, полученные данные остаются неоднозначными и в ряде случаев противоречащими друг другу [11]. Открытым также остается вопрос зависимости функциональной активности конъюгатов от их состава.

Для изучения структуры и состава конъюгатов белок–НЧЗ используются различные методы: дифференциальная центробежная седиментация [12], спектрофотометрия [13–15], флуориметрия [11, 16–18], модификации иммуноферментного анализа [19, 20], высокоэффективная жидкостная хроматография [21], просвечивающая электронная микроскопия [22] и др. Однако у этих методов есть ряд недостатков: недостаточная чувствитель-

ность, сложная пробоподготовка, необходимость дорогостоящего оборудования, большое количество манипуляционных стадий и, как следствие, низкая точность и воспроизводимость результатов. Некоторые методы, например, измерение триптофановой флуоресценции, пригодны лишь для белков определенного состава [11], поэтому актуальна разработка универсального и нетрудоемкого метода определения состава конъюгатов наночастиц с белками.

Предлагаемый в данной работе метод основан на мечении белков флуорескамином с последующей регистрацией флуоресценции. Флуорескамин – флуорогенный краситель с длиной волны возбуждения 390 нм, используемый в генетических исследованиях, в тонкослойной и бумажной хроматографии, при измерениях протеолитической активности и др. При взаимодействии флуорескамина с первичными аминогруппами белка образуются интенсивно флуоресцирующие производные [23–25]. Поскольку практически все белки содержат лизин, флуорескамин – универсальный реагент для мечения белков. Преимуществом флуорескамина является то, что его исходная форма не флуоресцирует, флуоресцен-

ция появляется только после взаимодействия с аминок группой и поэтому измерения характеризуются низким фоновым сигналом. Реакция с аминок группами протекает за несколько секунд. К тому же флуорескамин устойчив лишь в органических растворителях, а в воде гидролизуеться с выпадением продукта в осадок в течение 1–2 мин, что исключает необходимость отделять продукт реакции от несвязанной метки. Отсутствие дополнительных стадий обуславливает высокую производительность измерений. Разработанная методика обеспечивает инструментарий для простого и быстрого количественного определения белка, сорбированного на поверхности наночастиц. В качестве такого белка в экспериментах использовали иммуноглобулин-связывающий стрептококковый белок G, который часто применяется в иммунохимических методах для непрямого мечения антител [26, 27].

На основании предложенной методики были выбраны препараты золотых наночастиц с иммобилизованным белком G с оптимальной нагрузкой, использованные для разработки иммунохроматографического анализа (ИХА) сульфонамидного антибиотика сульфониламида (СА). Сульфонамиды широко используются в сельском хозяйстве для борьбы с инфекционными заболеваниями. Остаточные количества сульфонамидов в пищевых продуктах животного происхождения могут привести к развитию ряда заболеваний и аллергических реакций у людей, а также к возникновению резистентных штаммов микроорганизмов, что требует постоянного контроля и предотвращения чрезмерного употребления антибиотиков данного класса [28, 29].

**Цель работы** – разработка методики определения состава конъюгатов белков с наночастицами и ее применение для создания иммунохроматографической тест-системы на сульфониламид.

## МЕТОДИКА

**Получение наночастиц золота.** НЧЗ синтезировали согласно методу Френса [30]. 1 мл 1%-ного водного раствора  $\text{HAuCl}_4$  (“Sigma-Aldrich”, США) вносили в 97.5 мл воды, нагревали смесь до кипения, а затем при активном перемешивании добавляли 1.5 мл 1%-ного водного раствора цитрата натрия (“Химмед”, Россия). Раствор кипятили 15 мин, затем охлаждали и хранили при 4°C.

**Определение размеров наночастиц золота методом просвечивающей электронной микроскопии.** Снимки препаратов НЧЗ получали с помощью микроскопа CX-100 (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении 33000. Фотографии сканировали и анализировали с помощью программы Image Tool (“UTHSCSA”, США),

характеризуя не менее 120 изображений одиночных частиц.

**Определение состава конъюгатов НЧЗ–белок.** Раствор НЧЗ разливали в 10 пробирок по 2.0 мл, двукратно центрифугировали при 10000 g, затем отбирали надосадочную жидкость. Осадок взбалтывали (объем оставшейся в пробирке жидкости доводили надосадочной жидкостью до 0.2 мл). Стоковый раствор белка G (“Имтек”, Россия) с концентрацией 240 мкг/мл разводили надосадочной жидкостью для достижения конечных концентраций белка 24, 16, 10, 7, 5 и 3 мкг/мл. По 0.2 мл данных растворов белка в надосадочной жидкости добавляли к 0.2 мл растворов НЧЗ, полученных после центрифугирования, а оставшиеся растворы белка использовали для построения градуировочной зависимости. Белок G инкубировали с НЧЗ 30 мин при комнатной температуре, двукратно центрифугировали при 10000 g, отбирали 0.2 мл надосадочной жидкости и переносили в микропланшет (“Roskilde”, Дания). Градуировочные растворы также переносили в микропланшет по 0.2 мл. К полученным растворам добавляли по 10 мкл раствора флуорескамина (“Sigma-Aldrich”, США) в ацетоне (100 мг/мл), инкубировали 10 мин при комнатной температуре и измеряли флуоресценцию. Спектры флуоресценции регистрировали с помощью фотометра Perkin Elmer En Spire 2300 (“Waltham”, США) при длине волны возбуждающего света 390 нм в диапазоне длин волн испускаемого света 450–550 нм.

**Получение конъюгата НЧЗ с белком G для использования в ИХА.** Раствор НЧЗ (оптическая плотность при 520 нм:  $D_{520} = 1$ ) доводили карбонатом калия до pH 8.5–9.0, после чего вносили в этот раствор белок G до концентрации 8 мкг/мл. Смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре, затем вносили 10%-ный раствор БСА (“Boval Biosolutions”, США) и выдерживали еще 10 мин при интенсивном перемешивании. Полученный раствор центрифугировали 15 мин при 10000 g. Осадок отбирали и вносили 1%-ный раствор БСА до конечного объема 1 мл. Полученный раствор хранили при 4°C.

**Получение антисывороток против СА.** Для синтеза использовали производное СА с карбоксильной группой  $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ , предоставленное А.А. Формановским (Институт биоорганической химии РАН, Россия). Конъюгат данного производного и бычьего сывороточного альбумина (СА-БСА) синтезировали карбодиимидным методом [31] и использовали для иммунизации кроликов породы шиншилла массой 3–4 кг согласно [32].

Для первой иммунизации раствор иммуногена в фосфатно-солевом буфере (ФБС; 50 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7.4, с 0.1 М NaCl) эмульгировали с равным объемом полного адьюванта

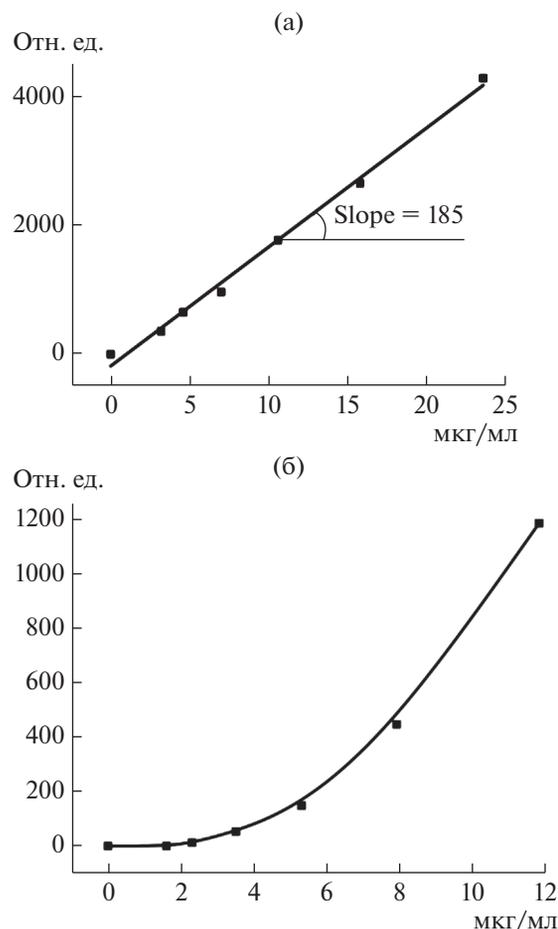
Фрейнда до конечной концентрации 1 мг/мл (по белку). Эту смесь (1.0 мл) вводили внутривенно и подкожно. Впоследствии кролики получали бустерные инъекции, содержавшие 0.5 мг иммуногена на животное, подкожно в ФБС с равным объемом неполного адьюванта Фрейнда и внутривенно в ФБС. Через неделю у кроликов отбирали кровь. Циклы реиммунизации повторяли с 5-недельным интервалом.

**Изготовление иммунохроматографических тест-систем.** Комплектация тест-полосок включала рабочую мембрану, мембраны для нанесения образца и конъюгата, а также конечную впитывающую мембрану. В качестве рабочей использовали нитроцеллюлозную мембрану UniSart CN95 (“Sartorius”, Германия), впитывающей – мембрану CFSP 223000 (“Millipore”, США), мембраны для нанесения конъюгата – непередобработанную мембрану PT-R5 (“Advanced Microdevices”, Индия). С помощью автоматического диспенсера IsoFlow (“Imagene Technology”, США) на рабочей мембране формировали аналитическую зону с иммобилизованным конъюгатом СА-БСА (3 мг/мл) в ФБС и контрольную зону с иммобилизованным антителами козы против иммуноглобулинов кролика (“Имтек”, Россия) в концентрации 5 мг/мл. Конъюгат НЧЗ с белком G наносили на мембрану для конъюгата ( $D_{520} = 10$ , объем нанесения – 13 мкл/мм). После нанесения реагентов мембраны сушили на воздухе при 20–22°C не менее 20 ч. Собирали мультимембранный композит, из которого получали полоски шириной 3.5 мм, используя автоматический гильотинный нарезчик Index Cutter-1 (“A-Point Technologies”, США). Нарезку и упаковку проводили в помещении с относительной влажностью воздуха не более 30%. Упакованные тест-полоски хранили при комнатной температуре.

**Проведение иммунохроматографического анализа СА.** ИХА проводили при комнатной температуре. В ФБС, содержащий 1% детергента твин-20 (ФБСТ), или в контаминированные пробы мёда, разбавленные ФБСТ в соотношении 1 : 4, вносили раствор СА для достижения его конечных концентраций в диапазоне 0.8–100 нг/мл, а также антисыворотку в разведении 1 : 800. Тест-полоски вносили в пробы в вертикальном положении, инкубировали 10 мин, а затем извлекали и оценивали результат ИХА визуально. С помощью программного обеспечения TotalLab TL120 (“Nonlinear Dynamics”, Великобритания) проводили оцифровку изображений тест-полосок и определяли интенсивности окрашивания контрольной и аналитической зон.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

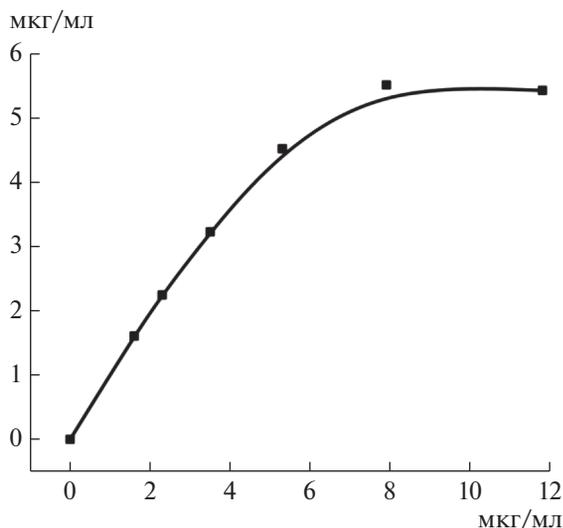
**Размерная характеристика наночастиц золота.** Для определения среднего диаметра и гомоген-



**Рис. 1.** Зависимости интенсивности флуоресценции (отн. ед., I) от добавленной концентрации белка G (мг/мл) в калибровочных растворах (а) и в реакционных растворах после центрифугирования (б).

ности НЧЗ использовали метод просвечивающей электронной микроскопии. Согласно полученным данным, синтезированные наночастицы характеризовались сферической формой и гомогенным распределением по размерам. Длина большей оси наночастиц составила  $25 \pm 3$  нм, меньшей оси –  $23 \pm 4$  нм, средний диаметр –  $25 \pm 5$  нм.

**Характеристика состава конъюгатов белок G–НЧЗ.** Для определения состава конъюгатов использовали метод флуоресцентной спектроскопии, вводя флуорескамин в качестве метки в градуировочные и реакционные растворы. Получали зависимости интенсивности флуоресценции при 490 нм от концентрации добавленного белка для градуировочных растворов (рис. 1а) и надосадочных жидкостей (рис. 1б). На основании линеаризованной градуировочной зависимости (R-фактор был больше 0.99) по величинам флуоресценции вычисляли содержание белка в надосадочных жидкостях. Затем рассчитывали количество свя-



**Рис. 2.** Зависимость концентрации белка G (мкг/мл) в составе конъюгата с НЧЗ от концентрации добавленного белка.

занного белка в конъюгатах как разницу между добавленным и несвязавшимся белком.

Полученная зависимость между количествами добавленного и связанного с НЧЗ белка G представлена на рис. 2. Плато на кривой отражает насыщение поверхности НЧЗ иммобилизованным белком.

При выборе оптимального состава конъюгата белок G–НЧЗ и протокола его получения исходили из критерия максимального связывания иммобилизуемого белка. Выбор этого критерия определялся использованием не прямой схемы ИХА, в которой рост реакционной способности конъюгата обеспечивал большую интенсивность сигнала и более чувствительное выявление аналита. При этом для других форматов ИХА ранее отмечалась оправданность использования конъюгатов НЧЗ–антител с меньшей нагрузкой. Так, в сэндвич-ИХА сокращение нагрузки антител в 2–4 раза снижало расход специфических реагентов без значимых изменений аналитических параметров [33], а в конкурентном ИХА приводило к сдвигу рабочего диапазона градуировочных кривых в область более низких концентраций [34]. При выборе оптимальных составов конъюгатов для данных форматов ИХА также может быть использована предложенная в данной работе методика со взаимодействием иммуноглобулинов с флуорескаминном.

Следует отметить, что такое решение позволило работать даже с нефракционированной поликлональной антисывороткой. Поскольку иммуноглобулиновая фракция антисыворотки содержит небольшую долю антител против использованного антигена (как правило, менее 5% [35]), то боль-

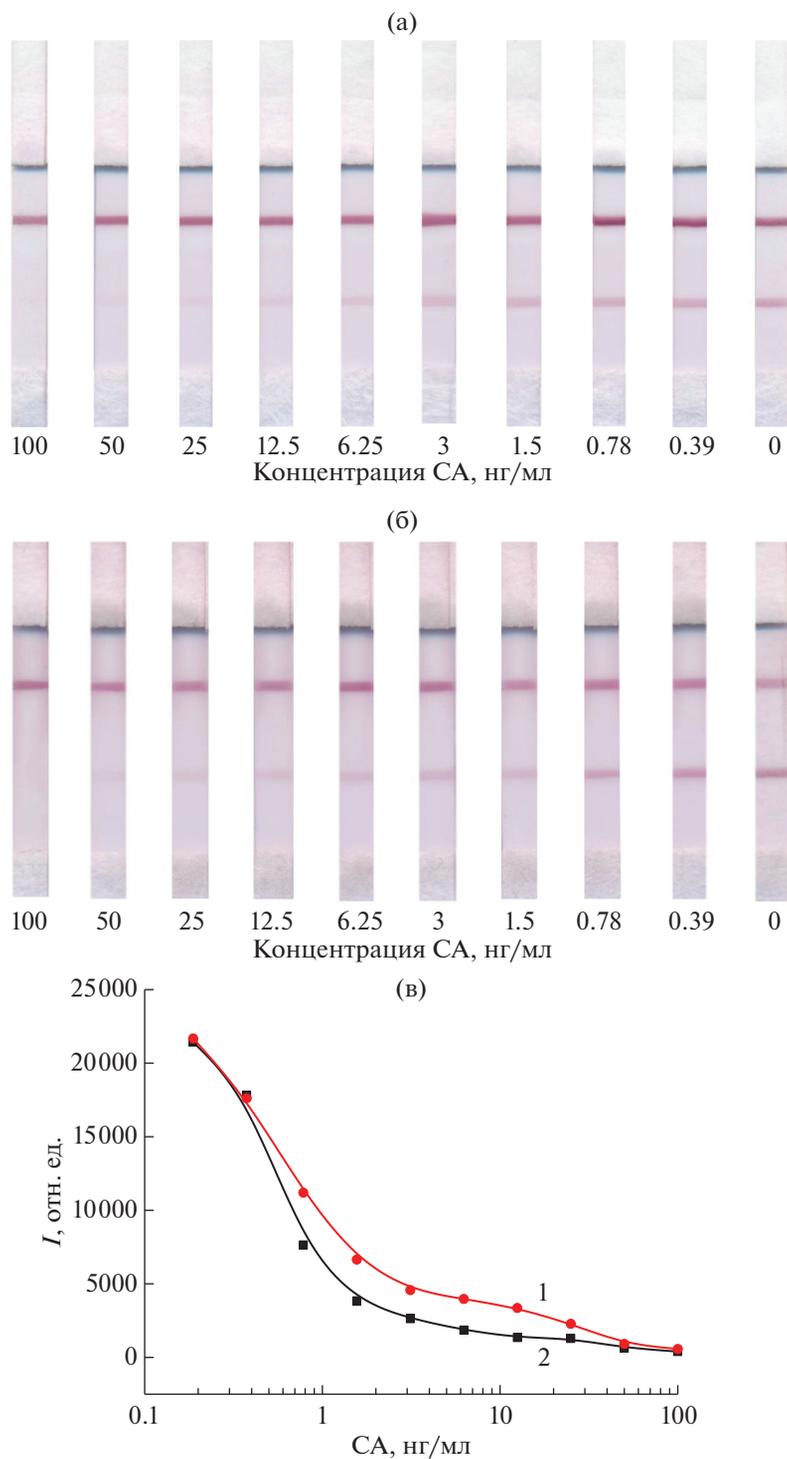
шая часть иммуноглобулинов в сыворотке будет блокировать реакционные центры конъюгата НЧЗ с белком G, препятствуя эффективному связыванию маркера в аналитической зоне. Тем не менее, использование установленной максимальной нагрузки иммобилизуемых антител обеспечило возможность эффективной регистрации результатов анализа и выявления аналита в низких концентрациях.

Выбранная оптимальная концентрация белка G для синтеза конъюгата составила 8 мкг/мл, что соответствовало ранее установленным требованиям для конъюгата белок G–НЧЗ, используемого в серодиагностике [36]. При данной концентрации обеспечивается иммобилизация 133 молекул белка G на одну НЧЗ диаметром 25 нм.

**Иммунохроматографический анализ СА.** Конкурентный ИХА был реализован в формате с непрямым введением маркера. Ранее для ряда систем отмечалось, что не прямое мечение антител с помощью аффинных взаимодействий (например, с использованием антивидовых антител, стафилококкового белка A, стрептококкового белка G или других иммуноглобулин-связывающих молекул) дает значительное преимущество в иммуноанализе по сравнению с использованием антител, непосредственно иммобилизованных на маркерных частицах [37–40]. Преимущества непрямого мечения состоят в возможности независимо варьировать концентрацию маркера (для интенсивного сигнала) и специфических антител (для эффективной конкуренции), используя для этого два разных реагента. В традиционном же ИХА с прямым мечением изменять концентрации специфических антител и маркера можно только одновременно и однонаправленно.

Для проведения анализа пробу смешивали с препаратом специфических антител, инкубируя в течение 1 мин, после чего в эту смесь погружали тест-полоску. В результате происходило двухступенчатое взаимодействие – образование комплекса специфических антител с антигеном и его выявление сорбированным на подложке конъюгатом белка G с меткой (НЧЗ). Продолжительность иммунохроматографии составляла 10 мин, после чего проводили регистрацию результатов.

Аналитические параметры тест-системы были установлены по результатам определения СА в ФБСТ и в искусственно контаминированных пробах мёда. На рис. 3 представлены отсканированные изображения тест-полосок после анализа. При цифровой регистрации предел обнаружения СА, определявший по статистически достоверному снижению интенсивности окрашивания относительно окрашивания в отсутствие СА, был равен 0.3 нг/мл, рабочий диапазон – 0.6–1.0 нг/мл в ФБСТ. Предел обнаружения в мёде составил 0.37 нг/мл, рабочий диапазон – 0.37–1.5 нг/мл.



**Рис. 3.** Иммунохроматографическое определение СА: внешний вид тест-полосок при тестировании проб в ФБСТ (а), в меде (б) и градуировочные кривые (в; 1 – в меде, 2 – в ФБСТ).

Визуальный предел обнаружения СА, соответствовавший исчезновению окрашивания в аналитической зоне, составил 100 нг/мл, что связано с сохранением относительно стабильного низкого сигнала в широком диапазоне концентраций (от 3 до

50 нг/мл) за рамки рабочего диапазона количественного анализа.

Полученные результаты соответствуют установленным нормам по максимально допустимому содержанию сульфонамидов в пищевой про-

дукции (0.1 мг/кг) [41, 42]. Использование в тест-системе конъюгата наночастиц золота с белком G подтверждает его эффективность для обеспечения высокочувствительного анализа, а универсальность данного маркера позволяет его использовать для детекции различных соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-76-10033).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dykman L.A., Khlebtsov N.G. // *Biomed. Opt. Express*. 2019. V. 10. № 7. P. 3152–3182.
2. Mieszawska A.J., Fayad Z.A., Cormode D.P. // *Mol. Pharm.* 2013. V. 10. № 3. P. 831–847.
3. Han G., Ghosh P., Rotello V.M. // *Nanomedicine*. 2007. V. 2. № 1. P. 113–123.
4. Arvizo R., Bhattacharya R., Mukherjee P. // *Expert. Opin. Drug. Deliv.* 2010. V. 7. № 6. P. 753–763.
5. Dykman L.A. // *Expert Rev. Vaccines*. 2020. V. 19. № 5. P. 465–477.
6. Klein S., Petersen S., Taylor U., Rath D., Barcikowski S. // *J. Biomed. Opt.* 2010. V. 15. № 3. Article 036015. doi.org/https://doi.org/10.1117/1.3461170
7. Mahan M.M., Doiron A.L. // *J. Nanomater.* 2018. V. 2018. Article 5837276. https://doi.org/10.1155/2018/5837276
8. Baptista P., Pereira E., Eaton P., Doria G., Miranda A. et al. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. V. 391. № 3. P. 943–950.
9. Bailes J., Mayoss S., Teale P., Soloviev M. // *Methods Mol. Biol.* 2012. V. 906. P. 45–55.
10. Li, Z., Sheng W., Liu Q., Li S., Shi Y. et al. // *Anal. Methods*. 2018. V. 10. № 28. P. 3506–3513.
11. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 16. P. 907–923.
12. Wang R., Chen L., Li D., Liu R., Ge G. // *Part. Part. Syst. Charact.* 2017. V. 34. № 12. Article 1700134. https://doi.org/10.1002/ppsc.201700134
13. Iosin M., Toderas F., Baldeck P.L., Astilean S. // *J. Mol. Struct.* 2009. V. 924–926. P. 196–200.
14. Kaur K., Forrest J.A. // *Langmuir*. 2012. V. 28. № 5. P. 2736–2744.
15. Oliverio R., Liberelle B., Murschel F., Garcia-Ac A., Banquy X., De Crescenzo G. // *ACS Appl. Nano Mater.* 2020. V. 3. № 10. P. 10497–10507.
16. Duan Y., Liu Y., Shen W., Zhong W. // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. № 22. P. 12160–12167.
17. Kozłowski R., Ragupathi A., Dyer R.B. // *Bioconjug. Chem.* 2018. V. 29. № 8. P. 2691–2700.
18. Zhang L., Hu D., Salmain M., Liedberg B., Boujday S. // *Talanta*. 2019. V. 204. № 8. P. 875–881.
19. Sotnikov D.V., Radchenko A.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Eurasian J. Anal. Chem.* 2016. V. 11. № 3. P. 169–179.
20. Tripathi K., Driskell J.D. // *ACS Omega*. 2018. V. 3. № 7. P. 8253–8259.
21. Liu S., Horak J., Höldrich M., Lämmerhofer M. // *Anal. Chim. Acta*. 2017. V. 989. P. 29–37.
22. Busch R.T., Karim F., Weis J., Sun Y., Zhao C., Vasquez E.S. // *ACS Omega*. 2019. V. 4. № 12. P. 15269–15279.
23. Udenfriend S., Stein S., Böhlen P., Dairman W., Leimgruber W., Weigele M. // *Science*. 1972. V. 178. № 4063. P. 871–872.
24. Weigele, M., De Bernardo S., Leimgruber W., Cleeland R., Grunberg E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1973. V. 54. № 3. P. 899–906.
25. Duan Y., Liu Y., Shen W., Zhong W. // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. № 22. P. 12160–12167.
26. Choe W., Durgannavar T.A., Chung S.J. // *Materials*. 2016. V. 9. № 12. Article 994. doi.org/https://doi.org/10.3390/ma9120994
27. Nezlin R. In: *The Immunoglobulins*. Academic Press: N.Y., 1998. P. 219.
28. Baran W., Adamek E., Ziemiańska J., Sobczak A. // *J. Hazard. Mater.* 2011. V. 196. P. 1–15.
29. Jiang J., Wang G. // *IOP Conf. Ser. Earth Envir. Sci.* 2017. V. 100. Article 012040. https://doi.org/10.1088/1755-1315/100/1/012040
30. Frens G. // *Nat. Phys. Sci.* 1973. V. 241. № 105. P. 20–22.
31. Eremin S.A., Murtazina N.R., Ermolenko D.N., Zherdev A.V., Martianov A.A. et al. // *Anal. Lett.* 2005. V. 38. № 6. P. 951–969.
32. Mar'ianov A.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Dzantiev B.B. // *Int. J. Envir. Anal. Chem.* 2004. V. 84. № 13. P. 965–978.
33. Byzova N.A., Safenkova I.V., Slutskaya E.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Bioconjugate Chem.* 2017. V. 28. № 11. P. 2737–2746.
34. Zvereva E.A., Byzova N.A., Sveshnikov P.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Anal. Methods*. 2015. V. 7. № 2. P. 6378–6384.
35. Radunz A. // *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C, Biosciences*. 1983. V. 38. № 3–4. P. 297–301.
36. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Biointerface Res. Appl. Chem.* 2020. V. 10. № 2. P. 4988–4992.
37. Urusov A.E., Petrakova A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Biosens. Bioelectron.* 2016. V. 86. P. 575–579.
38. Берлина А.Н., Бартош А.В., Сотников Д.В., Жердев А.В., Ху Ч., Дзантиев Б.Б. // *Российские нанотехнологии*. 2018. Т. 13. № 7–8. С. 80–87. (Berlina A.N., Bartosh A.V., Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Xu C., Dzantiev B.B. // *Nanotechnologies in Russia*. 2018. V. 13. № 7–8. P. 430–438.)
39. Majdinasab M., Zareian M., Zhang Q., Li P.W. // *Food Chem.* 2019. V. 275. P. 721–729.
40. Di Nardo F., Cavallera S., Baggiani C., Giovannoli C., Anfossi L. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2019. V. 11. № 36. P. 32758–32768.
41. Технический регламент Таможенного Союза “О безопасности пищевой продукции” ТР ТС 021/2011. М.: Центрмг, 2021. 261 с.
42. European Union Council Regulation 2377/90/EEC, C.R. // *Off. J. Eur. Commun.* 1990. V. L224. P. 1–8.

## Conjugates of Immunoglobulin-Binding Protein and Gold Nanoparticle: Determination of Composition and Application in Immunochromatographic Analysis of Sulfonylamide

D. V. Sotnikov<sup>a</sup>, L. V. Barshevskaya<sup>a</sup>, A. V. Zherdev<sup>a</sup>, and B. B. Dzantiev<sup>a, \*</sup>

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

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

A new method for determining the composition of conjugates between proteins with nanoparticles is proposed, based on the use of fluorescamine as a fluorescent label and which allows obtaining results with high accuracy with a minimum duration and laboriousness. Conjugates of gold nanoparticles with streptococcal protein G were characterized by the composition and binding of immunoglobulins. The synthesis was found to be optimal at protein G concentration of 8 µg/mL and a concentration of gold nanoparticles with an average diameter of 25 nm equal to 2.5 nM ( $OD_{520} = 5$ ). The resulting conjugates were used in the developed immunochromatographic assay of the antibiotic sulfonylamide, an important controlled contaminant of food products. Indirect labeling of specific antibodies allowed the use of crude rabbit antiserum in the assay. The visual and instrumental limits of detection for sulfonylamide were 100 and 0.3 ng/mL, respectively. The duration of the analysis is 10 min. The test systems were applied for the characterization of honey samples.

*Keywords:* immunochromatography, gold nanoparticles, fluorescamine, sulfonamides, honey