

УДК 543.066:57.083.3

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНЬЮГАТА АНТИВИДОВЫЕ АНТИТЕЛА – КОЛЛОИДНОЕ ЗОЛОТО: ОСОБЕННОСТИ И ПРЕИМУЩЕСТВА НА ПРИМЕРЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОХРАТОКСИНА А

М.К. Губайдуллина, А.Е. Урусов, А.В. Жердев, Ч. Ху¹, Б.Б. Дзантиев*

*(Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия; *e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru)*

На примере детекции охратоксина А (ОТА) проведено сопоставление традиционного иммунохроматографического анализа (с использованием конъюгата наночастиц золота со специфическими антителами к ОТА) и нового формата анализа с непрямым мечением (сочетание свободных антител и конъюгата наночастиц золота с антивидами антителами). В предлагаемом варианте специфические антитела включены в состав буфера для разбавления тестируемых проб, что увеличивает время их взаимодействия с антигеном, тогда как конъюгат антивидовых антител с маркером нанесен на тест-полоску. Анализ апробирован для выявления ОТА в экстрактах кукурузы. Показано, что переход к непрямому мечению снижает предел детекции ОТА на два порядка – до 0,12 нг/мл. Рассмотрены причины данного выигрыша. Высокая чувствительность иммунохроматографии с непрямым мечением позволяет рассматривать ее как перспективный подход для детекции различных низкомолекулярных антигенов.

Ключевые слова: иммуноанализ, тест-полоски, коллоидное золото, комплексы антитело–наночастица, микотоксины.

Иммунохроматографический анализ (ИХА) в настоящее время широко используется для скринингового контроля проб в медицинской диагностике, контроле качества сырья и продуктов питания [1, 2]. Высокая скорость и простота использования ИХА обеспечивается благодаря предварительному нанесению всех аналитических реагентов на мембраны тест-полоски. Контакт с пробой инициирует все необходимые иммунохимические реакции, приводящие к окрашиванию определенных участков тест-полоски, по которому можно через 10–15 мин визуально или с помощью прибора регистрировать результат анализа. Для детекции низкомолекулярных соединений используется конкурентный формат ИХА, в котором содержащийся в пробе антиген реагирует со специфическими антителами, конъюгированными с окрашенным маркером, чаще всего с наночастицами золота (НЧЗ), и препятствует связыванию маркера с антигеном, иммобилизованным в аналитической зоне тест-полоски.

Однако создание высокочувствительных систем по такой схеме осложнено внутренним про-

тиворечием – невозможно одновременно обеспечить достаточную интенсивность аналитического сигнала (окрашивания аналитической зоны) и высокую чувствительность анализа, поскольку происходит ослабление сигнала при низких концентрациях детектируемого антигена. Таким образом, для достоверного анализа концентрация конъюгата специфические антитела с НЧЗ должна быть максимально высокой, а для высокочувствительного определения – предельно низкой.

Отметим, что в используемых для проведения ИХА конъюгатах на одну НЧЗ приходится от нескольких десятков до сотен молекул антител. Поэтому, когда антигеном заблокирована только часть антител на поверхности наночастицы, конъюгат сохраняет способность связываться в аналитической зоне. Интенсивность ее окрашивания снижается лишь при полной или почти полной блокировке антител, т.е. при высоких концентрациях антигена в пробе. Кроме того, поливалентный конъюгат связывается с антигеном в аналитической зоне (также поливалентным) с большей аффинностью, чем со свободным ана-

¹ Школа продовольственной науки и техники, Университет Джиангнан, Вукси, Цзянсу, Китай.

литом пробы, что также препятствует эффективной конкуренции.

Для решения этой проблемы нами было предложено использование в ИХА специфических антител и маркера как двух независимых реагентов [3]. Схема ИХА с непрямым мечением предполагает применение свободных специфических антител для конкурентного взаимодействия и конъюгата антивидовых антител с НЧЗ для мечения образующихся специфических иммунных комплексов. Такая замена позволяет независимо варьировать содержание специфических антител и маркера, обеспечивая оптимальные условия как для высокочувствительного, так и для достоверного анализа. Применение этого подхода позволило нам снизить предел обнаружения афлатоксина В1 в 40 раз [3], зеараленона – в 1500 раз [4], Т-2 токсина – в 6 раз [5].

В данной работе реализован вариант ИХА с непрямым мечением, отличающийся тем, что специфические антитела перенесены в буфер для разбавления пробы. Благодаря этому взаимодействие антител и антигена происходит в гомогенном растворе (а не в потоке, движущемся вдоль тест-полоски) и за минимальное время достигает равновесия, необходимого для высокочувствительного анализа.

Данный вариант ИХА был реализован на примере детекции охратоксина А (ОТА). Этот микотоксин (метаболит плесневых грибов *Aspergillus*, *Penicillium* и др.) представляет собой токсичный широко распространенный контаминант сельскохозяйственных культур (пшеницы, ячменя, ржи и др.), опасный для здоровья человека [6–8]. Регламент ЕС № 1881/2006 от 19.12.2006 и Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 015/2011 устанавливают предельный уровень содержания ОТА в зерне, равный 5 нг/г. Значимость контроля ОТА для безопасности продуктов питания обуславливает необходимость экспрессных и высокочувствительных методов его детекции.

Экспериментальная часть

Материалы и реагенты. В работе использовали золотохлористоводородную кислоту, цитрат натрия, бычий сывороточный альбумин (БСА), детергенты Тритон X-100 и Твин-20, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), азид натрия производства «Sigma-Aldrich», США. Охратоксин А производства ООО «Хромресурс», Россия. Моноклональные антитела против ОТА и конъюгат ОТА-БСА получены и охарактеризованы в рамках предыдущих исследований профессора Ч. Ху и его сотрудников [9]. Антитела козы против

иммуноглобулинов мыши производства «Arista Biologicals», США. Меченные пероксидазой антитела козы против иммуноглобулинов мыши представлены филиалом «Медгамал» Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (Россия). Остальные реагенты (растворители, компоненты буферных растворов и др.) имели марку «ч.д.а.» и выше.

Буферы для иммуноанализа:

ФБ – 50 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,4), содержащий 100 мМ хлорида натрия;

ФБТр – ФБ, содержащий 0,05% Тритона X-100;

ФБТв – ФБ, содержащий 0,05% Твин-20;

ТБСА – 10 мМ Трис-буфер, рН 8,5, содержащий 1% БСА, 1% сахарозы и 0,05% азида натрия;

ТТБСА – ТБСА, содержащий 0,05% Твин-20.

Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили в прозрачных 96-луночных полистироловых микропланшетах с высокой сорбционной емкостью производства «Corning», США. Оптическую плотность продуктов ферментативной реакции измеряли с помощью микропланшетного фотометра «Zenyth 3100» («Anthos Labtec Instruments», Австрия).

Для изготовления иммунохроматографических тест-систем использовали рабочие нитроцеллюлозные мембраны Hi-Flow Plus, стекловолоконные и впитывающие мембраны («Millipore», США). Иммунореагенты наносили с помощью диспенсера «IsoFlow» («Imagene Technology», США). Для нарезки собранных мультимембранных композиций на тест-полоски применяли резак «Guillotine Cutter ZQ4200» («Shanghai Kinbio Tech», Китай).

Иммуноферментный анализ ОТА. В лунках микропланшета в течение ночи при 4 °С сорбировали конъюгат ОТА-БСА в концентрации 1 мкг/мл из 100 мкл ФБ. После четырехкратной отмывки лунок ФБТр вносили по 50 мкл раствора ОТА в ФБТр, разбавленного до концентрации 500–0,03 нг/мл, добавляли по 50 мкл раствора МАт в концентрации 300 нг/мл в ФБТр и инкубировали 1 ч при 37 °С. Проводили такую же процедуру отмывки, после чего добавляли меченные пероксидазой антивидовые антитела в разведении 1:3000 в ФБТр по 100 мкл на лунку и инкубировали 1 ч при 37 °С. Для определения активности пероксидазы, связанной с поверхностью лунок, в них после отмывки вносили раствор субстрата – 0,42 мМ ТМБ и 1,8 мМ H₂O₂ в 0,1 М натрий-цитратном буферном растворе (рН 4,0, 100 мкл на лунку). После 15 мин инкубации при комнатной температуре реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М H₂SO₄. Оптическую плотность продукта окисления ТМБ

измеряли при 450 нм. Эксперименты проводили в трех повторностях.

Зависимость A_{450} от концентрации ОТА в пробе аппроксимировали сигмоидной 4-параметрической функцией, используя программу Origin 7.5 («OriginLab», США). Предел детекции, рассчитанный, как описано в [10, 11], соответствовал 10%-му снижению A_{450} .

Синтез конъюгатов антитела – наночастицы золота. НЧЗ со средним диаметром 30 нм получали, восстанавливая золотохлористоводородную кислоту цитратом натрия по методу Френса [12] с некоторыми изменениями [13].

Для конъюгирования использовали раствор НЧЗ с концентрацией 50 мкг/мл ($A_{520} = 1$); pH раствора доводили до 8,9–9,0 добавлением 0,1 М карбоната натрия. Затем к НЧЗ добавляли антивидовые или специфичные к ОТА антитела (10 мкг на 1 мл). Полученную смесь инкубировали 45 мин при комнатной температуре. После этого добавляли 10%-й водный раствор БСА ($V_{\text{НЧЗ}}:V_{\text{БСА}} = 40:1$) и 15 мин интенсивно перемешивали. Полученный конъюгат осаждали центрифугированием (15 мин, 15 000 г) при 4 °С. Осадок перерастворяли в ТБСА и хранили конъюгат при 4 °С.

Изготовление иммунохроматографических тест-полосок. На стекловолоконную мембрану наносили конъюгат НЧЗ с антителами к ОТА, $A_{520} = 0,25$ (для традиционной схемы анализа) или с антивидовыми антителами, $A_{520} = 3$ (для схемы с непрямым мечением). В обоих случаях расход растворов конъюгатов в ТБСА составлял 3,2 мкл на 1 мм мембраны. На рабочую нитроцеллюлозную мембрану наносили раствор конъюгата ОТА-БСА в ФБ с концентрацией 1 мг/мл, расход составил 0,1 мкл на 1 мм. Рабочую, стекловолоконную и впитывающую мембраны закрепляли на пластиковой подложке и нарезали на полоски шириной 3,5 мм. Полученные тест-полоски хранили при 20–22 °С в запаянном фольгированном пакете с силикагелем.

Подготовка и характеристика проб. Измельченные зерна кукурузы смешивали с экстрагирующим раствором ($V_{\text{метанол}}:V_{\text{вода}} = 70:30$) в соотношении 1:5 и инкубировали при осторожном перемешивании при комнатной температуре в течение 30 мин ([14] с модификациями). После 15 мин центрифугирования (15 000 г) надосадки собирали и хранили при 4 °С.

В результате анализа полученных экстрактов, согласно [15], с использованием жидкостного хроматографа с масс-спектрометрическим детектором типа тройной квадруполь «Agilent 6460» («Agilent Technologies», США) установлено отсутствие в

них ОТА. Растворы ОТА добавляли к экстрактам в день проведения иммуноанализа.

Проведение ИХА (традиционная схема анализа). Пробу (стандартный раствор ОТА или экстракт кукурузы) и ФБТв смешивали в соотношении 1,0:2,5. Вынутую из пакета тест-полоску в строго вертикальном положении погружали на 5–7 мм в пробу (100 мкл) на 15 мин при комнатной температуре, после чего извлекали и помещали на горизонтальную поверхность. Эксперименты проводили в трех повторностях.

Проведение ИХА (схема с непрямым мечением). Пробу (стандартный раствор ОТА или экстракт кукурузы) и ФБТв, содержащий антитела в концентрации 125 нг/мл, смешивали в соотношении 1,0:2,5. Тест-полоску инкубировали с пробой, как описано выше, после чего извлекали и помещали на горизонтальную поверхность. Эксперименты проводили в трех повторностях.

Регистрация результатов ИХА. Оценку окрашивания в аналитической зоне тест-полоски проводили либо визуально, либо приборно, регистрируя изображение на сканере Lide 90 («Canon») с разрешением 600 точек на дюйм, без автоматического контрастирования и цветокоррекции. Интенсивность окрашивания рассчитывали с помощью программы TotalLab v2.01 («Nonlinear Dynamics», Великобритания) в соответствии с [16].

Аппроксимацию получаемых концентрационных зависимостей и расчет приборного предела обнаружения для ИХА проводили так же, как для ИФА (см. выше).

Результаты и их обсуждение

Характеристика антител. Антитела против ОТА были предварительно охарактеризованы методом ИФА. Предел обнаружения ОТА составил 1 нг/мл (рис. 1). Высокая аффинность используемых антител позволяет рассматривать их как подходящие реагенты для разрабатываемой иммунохроматографической системы.

Схема ИХА с непрямым мечением. Для высокочувствительной детекции ОТА принцип непрямого мечения антител был реализован следующим образом (рис. 2). Конъюгат ОТА-БСА наносили и высушивали на нитроцеллюлозной мембране, а конъюгат антивидовых антител и НЧЗ – на стекловолоконной мембране. Антитела к ОТА вносили в пробу в свободном виде в составе буфера для разбавления. Детектируемый комплекс, образующийся в ходе иммунохроматографии, включает ОТА-БСА, антитела к ОТА, антивидовые антитела и НЧЗ. Наличие ОТА в пробе препятствует формированию данного комплекса, приводя к снижению

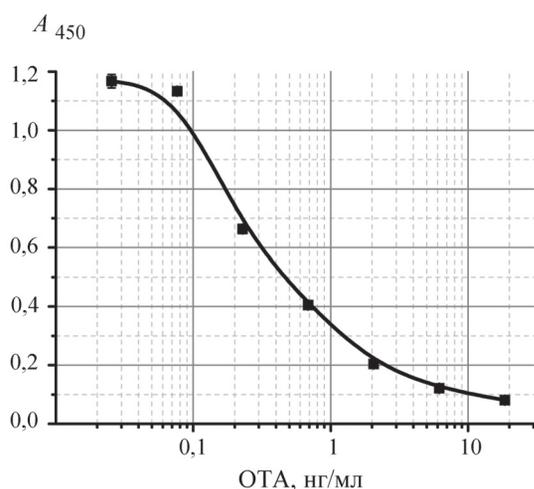


Рис. 1. Концентрационная зависимость детекции ОТА методом ИФА

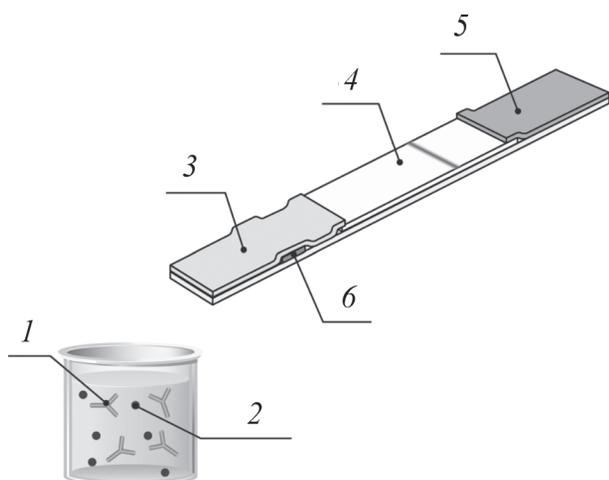


Рис. 2. Схема разработанной аналитической системы, состоящей из лунки для разведения пробы и тест-полоски: 1 – специфические антитела против ОТА, 2 – ОТА, 3 – впитывающая мембрана для пробы, 4 – рабочая нитроцеллюлозная мембрана с нанесенным конъюгатом ОТА-БСА, 5 – конечная впитывающая мембрана, 6 – стекловолоконная мембрана с нанесенным конъюгатом антивидовых антител – НЧЗ

интенсивности окрашивания вплоть до ее полного исчезновения.

Благодаря тому, что на стадии разведения пробы осуществляется предынкубация антигена с антителами, время их взаимодействия увеличивается, что повышает чувствительность анализа. Кроме того, упрощается изготовление тест-полоски и появляется возможность быстрой замены специфических антител и оптимизации их концентрации.

Оптимизация концентраций иммунореагентов. Для обеспечения высокочувствительности ИХА варьировали концентрацию иммуноаналити-

ческих реагентов. Проведено сравнение связывания маркера в системе при разных концентрациях специфических антител (от 1000 до 8 нг/мл). На основании полученных результатов (рис. 3) была выбрана концентрация, равная 125 нг/мл, которая обеспечивает необходимую интенсивность окрашивания и не приводит к перерасходу антител, препятствующему чувствительной конкурентной детекции.

ИХА с непрямым мечением проводили для данной оптимальной концентрации антител к ОТА, а также установленных в аналогичных экспериментах концентраций конъюгата ОТА-БСА (1 мг/мл) и конъюгата НЧЗ с антивидовыми антителами ($A_{520} = 3$).

Характеристика ИХА с непрямым мечением.

Выбранные концентрации иммунореагентов использованы для тестирования серии растворов ОТА с концентрацией от 1 до 0,01 нг/мл. На рис. 4 представлены результаты, полученные в этом эксперименте при варьировании времени инкубации пробы и специфических антител.

В ИХА без предынкубации (рис. 4, нижний ряд) не происходит полного ингибирования связывания метки, что препятствует визуальной оценке получаемых результатов. Оптимальна трехминутная продолжительность предынкубации, обеспечивающая максимальную чувствительность ИХА при небольшом вкладе в его суммарную продолжительность.

В табл. 1 представлены аналитические характеристики разработанного ИХА с непрямым мечением и традиционного формата ИХА, реализованного также в оптимальных условиях. Как видим, переход к непрямому мечению сдвигает предел детекции анализа почти на два порядка как для визуальной, так и для приборной регистрации. Однако на результаты анализа потенциально может оказывать существенное влияние матрикс тестируемых проб. Поэтому для окончательной характеристики предложенный формат ИХА был опробован на экстрактах зерен кукурузы.

Проверка новой системы на образцах растительных экстрактов. Полноту выделения ОТА из растительных матриксов можно обеспечить, применяя экстрагирующий раствор, содержащий 70% метанола. Однако известно, что высокие концентрации органических растворителей денатурируют антитела и препятствуют проведению иммуноанализа [17, 18]. Поэтому требуется разбавление пробы перед проведением ИХА. Сравнительный анализ показал, что предельное содержание метанола после разбавления, не вызывающее снижения связывания маркера в ИФА, составляет 20%

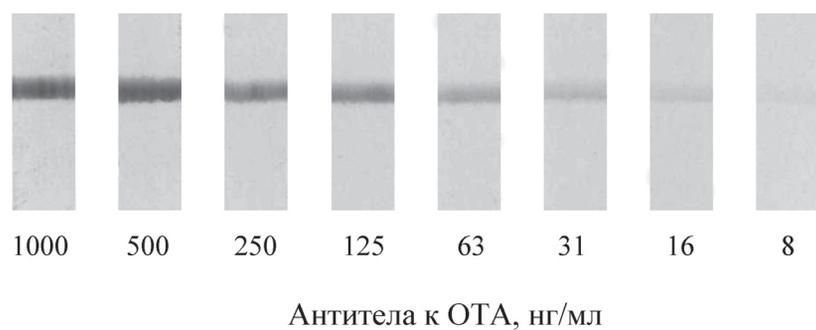


Рис. 3. Связывание маркера в аналитической зоне тест-полоски при использовании антител к ОТА в разных концентрациях

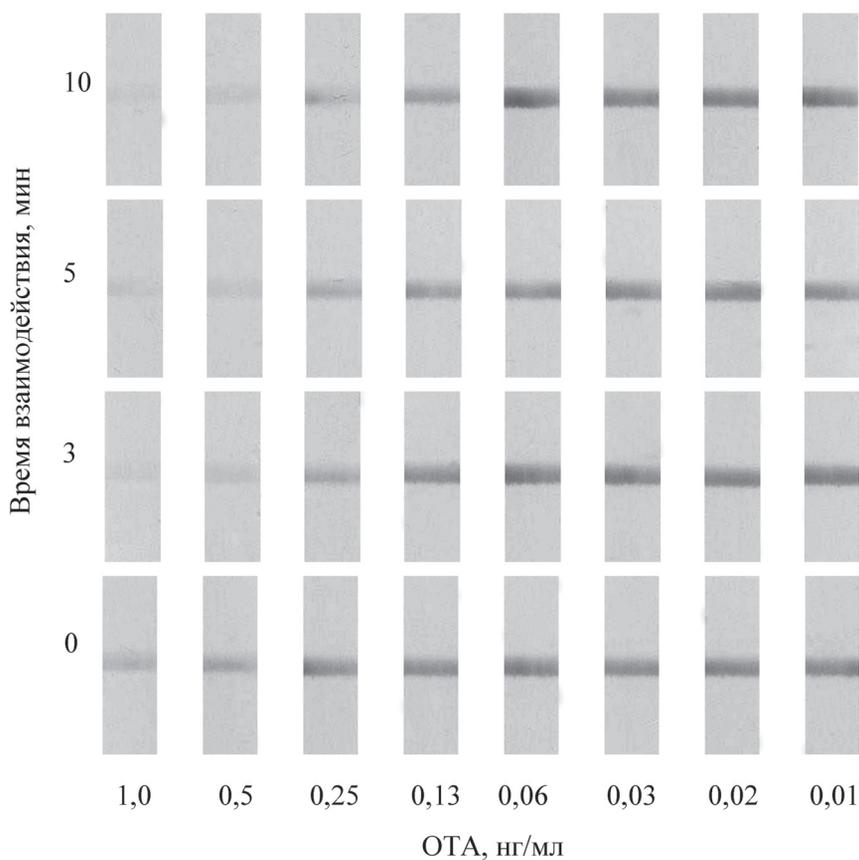


Рис. 4. Результаты ИХА при разном времени взаимодействия пробы со специфическими антителами

Т а б л и ц а 1

Характеристики двух форматов иммунохроматографического анализа ОТА

Параметр	Традиционный формат	Формат с непрямым мечением
Максимальная интенсивность окрашивания, отн. ед.	20,2	14,6
Приборный предел обнаружения ОТА, нг/мл	10	0,06
Визуальный предел обнаружения ОТА, нг/мл	125	0,5
Продолжительность анализа, мин	15	20

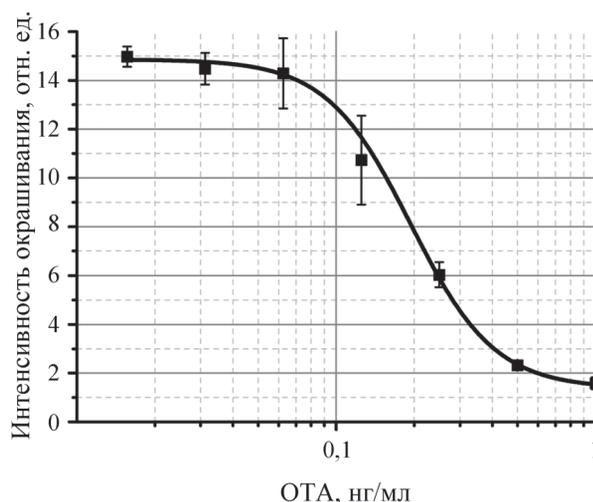


Рис. 5. Калибровочная кривая ИХА ОТА в реальных пробах (экстракты зерен кукурузы)

(данная величина соответствует оптимуму, установленному нами для ИХА других микотоксинов [19, 20]). Поэтому исходный экстракт разбавляли в 3,5 раза буфером, содержащим антитела к ОТА в необходимой концентрации. Калибровочная кривая, полученная для ИХА ОТА в реальных пробах,

представлена на рис. 5. Предел обнаружения ОТА при фотометрической регистрации составляет 0,12 нг/мл, т.е. негативного влияния матрикса на аналитические характеристики тест-системы не наблюдается. Данный предел соответствует исходным пробам с содержанием ОТА (2,4 нг/г), более низким, чем нормативные предельные уровни контаминации. Эксперименты по схеме «введено-найденно» показали высокую степень выявления аналита – от 95 до 114% (табл. 2). Таким образом, разработанная тест-система удовлетворяет практическим требованиям и представляется перспективной для использования в контроле контаминации сельскохозяйственной продукции.

Выводы

Разработана высокочувствительная иммунохроматографическая тест-система для определения охратоксина А. Показано, что переход к непрямому мечению антител снижает на два порядка предел детекции аналита. Предложенная тест-система сочетает экспрессность анализа и необходимую чувствительность, что определяет ее практическую значимость.

Таблица 2

Полнота выявления ОТА в экстрактах кукурузы разработанным методом ИХА

Внесено ОТА, нг/мл	Найдено ОТА, нг/мл	Степень выявления, %
1	0,95	95
0,5	0,51	102
0,25	0,24	96
0,125	0,142	114

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 15-08-07913_a). При проведении исследований использовали оборудование Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V. // TRAC-Trends in Analytical Chemistry. 2014. Vol. 55. P. 81.
2. Gubala V., Harris L.F., Ricco A.J., Tan M.X., Williams D.E. // Analytical Chemistry. 2012. Vol. 84. N 2. P. 487.
3. Urusov A.E., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // Microchimica Acta. 2014. Vol. 181. N 15-16. P. 1939.
4. Urusov A.E., Petrakova A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // Biosensors and Bioelectronics. 2016. Vol. 86. P. 575.
5. Урусов А.Е., Петракова А.В., Бартош А.В., Губайдуллина М.К., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 5. С. 528.
6. Ziegler A., Kadis S., Ajl S.J. Microbial Toxins, Volume VI: Fungal Toxins / N.Y., 1971.
7. Шугалей И.В., Илюшин М.А., Судариков А.М. // Экологическая химия. 2014. Т. 23. № 1. С. 22.
8. Heussner A.H., Bingle L.E.H. // Toxins. 2015. Vol. 7. N 10. P. 4253.
9. Kong D.Z., Liu L.Q., Song S.S., Suryoprawowo S., Li A.K.,

- Kuang H., Wang L.B., Xu C.L.* // *Nanoscale*. 2016. Vol. 8. N 9. P. 5245.
10. *Tijssen P.* Practice and Theory of Enzyme Immunoassays / Elsevier Science, 1985.
11. *Sitta Sittampalam G., Smith W.C., Miyakawa T.W., Smith D.R., McMorris C.* // *Journal of Immunological Methods*. 1996. Vol. 190. N 2. P. 151.
12. *Frens G.* // *Nature (London), Physical Science*. 1973. Vol. 241. N 105. P. 20.
13. *Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Dzantiev B.B.* // *Talanta*. 2010. Vol. 81. N 3. P. 843.
14. *Malone R.J.* Extraction Efficiency Studies for Mycotoxins in Naturally Contaminated Commodities / 2009. P. 223.
15. *Li P.W., Zhang Z.W., Hu X.F., Zhang Q.* // *Mass Spectrometry Reviews*. 2013. Vol. 32. N 6. P. 420.
16. *Urusov A.E., Petrakova A.V., Kuzmin P.G., Zherdev A.V., Sveshnikov P.G., Shafeyev G.A., Dzantiev B.B.* // *Analytical Biochemistry*. 2015. Vol. 491. P. 65.
17. *Chen X.J., Xu L.G., Ma W., Liu L.Q., Kuang H., Wang L.B., Xu C.L.* // *Food and Agricultural Immunology*. 2014. Vol. 25. N 3. P. 341.
18. *Thiphom S., Prapamontol T., Chantara S., Mangklabruks A., Suphavitai C., Ahn K.C., Gee S.J., Hammock B.D.* // *Journal of Environmental Science and Health Part B*. 2014. Vol. 49. N 1. P. 15.
19. *Urusov A.E., Petrakova A.V., Gubaydullina M.K., Zherdev A.V., Eremin S.A., Kong D.Z., Liu L.Q., Xu C.L., Dzantiev B.B.* // *Biotechnology Letters*. 2017. Vol. 39. N 5. P. 751.
20. *Петракова А.В., Урусов А.Е., Возняк М.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.* // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2015. Т. 51. № 6. С. 616.

Поступила в редакцию 23.11.17

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEMS USING THE CONJUGATE ANTI-SPECIES ANTIBODIES – COLLOID GOLD: FEATURES AND BENEFITS ON THE EXAMPLE OF DETERMINATION OF OCHRATOXIN A

M.K. Gubaidullina, A.E. Urusov, A.V. Zherdev, C. Xu, B.B. Dzantiev*

(*A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of The Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; *e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru*)

In the present work, new format of immunochromatographic analysis with indirect labeling was compared with a traditional analysis for the case of ochratoxin A (OTA). In the proposed scheme specific antibodies are included in the dilution buffer, while the anti-species antibody conjugate with the marker is applied to the test strip. The assay is realized for the detection of OTA in maize extracts. The indirect labeling reduces the detection limit of OTA by two orders of magnitude (up to 0.12 ng/mL). The reasons for this gain are considered. The approach can be applied to various low molecular weight compounds.

Key words: immunoassay, test-strips, colloidal gold, antibody – nanoparticle complexes, mycotoxins.

Сведения об авторах: *Губайдуллина Миляуша Камилловна* – мл. науч. сотр. ФИЦ биотехнологии РАН (*milya.kamilovna@gmail.com*); *Урусов Александр Евгеньевич* – ст. науч. сотр. ФИЦ биотехнологии РАН, канд. хим. наук (*urusov.alexandr@gmail.com*); *Жердев Анатолий Виталиевич* – вед. науч. сотр. ФИЦ биотехнологии РАН, канд. биол. наук (*zherdev@inbi.ras.ru*); *Чуанлай Ксу* – руководитель лаборатории пищевых наук и технологий Университета Джиангнан, г. Вукси, Китай, профессор (*xcl@jiangnan.edu.cn*); *Дзантиев Борис Борисович* – зам. директора по научной работе, зав. лабораторией иммунобиохимии ФИЦ биотехнологии РАН, докт. хим. наук, профессор (*dzantiev@inbi.ras.ru*).