

# ИММУНО-РКК ДЛЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ДЕТЕКЦИИ КОМПЛЕКСА «АНТИГЕН-АНТИТЕЛО» НА МОДЕЛИ АНТИГЕНОВ ГРУППЫ КРОВИ

Рязанцев Д.Ю., Габриелян Н.Г., Полякова С.М., Завриев С.К.

ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»  
Российской академии наук, Москва, Россия

**Резюме.** Проблему детекции малых количеств аналитов иммунохимическими методами пытаются решить давно. Одним из подходов является использование методов амплификации нуклеиновых кислот для усиления сигнала от единичного акта взаимодействия антиген-антитело. Методом амплификации, подходящим для использования на микрочипах, является реакция амплификации катящимся кольцом.

Принцип метода заключается в использовании конъюгата детектирующего антитела с праймером и последующей изотермической амплификации. После добавления к иммобилизованному праймеру кольцевых олигонуклеотидов, которые служат матрицей для амплификации (либо олигонуклеотидов, которые могут гибридизоваться с праймером и быть лигированы в кольцевую матрицу) и полимеразы фага phi29 с необходимыми для начала амплификации компонентами, начинается образование протяженного (до сотен тысяч нуклеотидов) одноцепочечного продукта реакции. Продукт представляет собой повторы нуклеотидной последовательности, комплементарной кольцевой матрице. Флуоресцентный ДНК-зонд может гибридизоваться с каждым повтором на молекуле продукта, таким образом уровень флуоресценции становится значительно выше, чем при использовании систем проявки с применением флуоресцентно-меченных антител или стрептавидина. Кроме того, продукт реакции остается иммобилизованным на поверхности, что позволяет использовать данный подход при детекции взаимодействий антиген-антитело в других твердофазных системах анализа, таких как микрочипы. Общей проблемой таких подходов является неспецифическая сорбция компонентов иммунохимической реакции либо реакции амплификации, приводящая к высокому фону. Очевидно, что каким бы высокочувствительным анализ ни был в теории, высокий фон сведет весь потенциал метода на нет.

В настоящей работе мы разработали метод, позволяющий детектировать малые количества антител к гликанам в сыворотке крови и в смывах с опухолевых клеток в формате микрочипа на модели антигенов группы крови. Удалось получить 30–70 кратный прирост флуоресценции от специфического взаимодействия по сравнению с использованием флуоресцентно-меченного стрептавидина. Разрабатываемый нами метод является перспективным, так как позволяет значительно увеличить сигнал

---

**Адрес для переписки:**

Рязанцев Дмитрий Юрьевич  
ФГБУН «Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»  
Российской академии наук  
117997, Россия, Москва, ГСП-7,  
ул. Миклухо-Маклая, 16/10.  
Тел.: 8 (906) 726-99-29.  
E-mail: d.yu.ryazantsev@gmail.com

**Address for correspondence:**

Dmitriy Yu. Ryazantsev  
Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences  
16/10 Miklouho-Maclay St, GSP-7  
Moscow  
17997 Russian Federation  
Phone: +7 (906) 726-99-29.  
E-mail: d.yu.ryazantsev@gmail.com

**Образец цитирования:**

Д.Ю. Рязанцев, Н.Г. Габриелян, С.М. Полякова,  
С.К. Завриев «Иммуно-РКК для высокочувствительной  
детекции комплекса "антиген-антитело" на  
модели антигенов группы крови» // Российский  
иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 4. С. 781–787.  
doi: 10.46235/1028-7221-16921-IRF

© Рязанцев Д.Ю. и соавт., 2024  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

**For citation:**

D. Yu. Ryazantsev, N.G. Gabrielyan, S.M. Polyakova,  
S.K. Zavriev "Immuno-RCA for highly sensitive detection  
of the antigen-antibody complex in the blood group antigen  
model", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy  
Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 4, pp. 781–787.  
doi: 10.46235/1028-7221-16921-IRF

© Ryazantsev D. Yu. et al., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16921-IRF

от специфического взаимодействия антиген-антитело в формате гликочипа, что позволит детектировать антитела к гликанам в образцах с очень небольшой концентрацией антител, например, в смывах с опухолевых клеток.

*Ключевые слова:* иммуно-РКК, амплификация катящимся кольцом, высокочувствительная детекция, микрочип, антигены группы крови, антитела к гликанам, гликочип

## IMMUNO-RCA FOR HIGHLY SENSITIVE DETECTION OF THE ANTIGEN-ANTIBODY COMPLEX IN THE BLOOD GROUP ANTIGEN MODEL

Ryazantsev D.Yu., Gabrielyan N.G., Polyakova S.M., Zavriev S.K.

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** The problem of detecting tiny quantities of analytes by immunochemical methods has been tried for a long time. One approach is to use nucleic acid amplification methods to amplify the signal from a single antigen-antibody interaction. An amplification method suitable for microarrays is the rolling circle amplification reaction. The principle of the method is usage of a conjugate of a detecting antibody with a primer and subsequent isothermal amplification. The generation of a huge single-stranded reaction product starts after adding the necessary components for amplification reaction: circular oligonucleotides, which serves as a template for amplification and phage phi29 polymerase with the other components. This reaction product consists of a lot of repeats of a nucleotide sequence, that is complementary to the circular template. The fluorescent DNA probe can hybridize to each repeat on the product molecule, resulting in a significantly higher level of fluorescence than with fluorescently labeled antibody or streptavidin development systems. In addition, the reaction product remains immobilized on the surface, allowing usage of this approach for the detection of antigen-antibody interactions in other solid-phase analysis systems, such as microarrays. A common problem with such approaches is the nonspecific sorption of components of the immunochemical reaction or amplification reaction, leading to a high background. It is obvious that no matter how highly sensitive the analysis is in theory, a high background will reduce the entire potential of the method to nothing. Herein, we have developed a method that makes it possible to detect small amounts of antibodies to glycans in blood serum and in swabs from tumor cells in a microarray format using a model of blood group antigens. It was possible to obtain a 30 to 70-fold increase of fluorescence level from a specific interaction compared to the use of fluorescently labeled streptavidin. The method we are developing is promising, as it allows us to significantly increase the signal from the specific antigen/antibody interaction in the glycochip format, which will make it possible to detect antibodies to glycans in samples with a very low concentrations of antibodies, for example, in washes from tumor cells.

*Keywords:* immuno-RCA, rolling circle amplification, high-sensitivity detection, microarray, blood group antigens, anti-glycan antibodies, glycoarray

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00396.

### Введение

Проблему детекции малых количеств аналитов иммунохимическими методами пытаются решить давно. Одним из подходов является использование методов амплификации нуклеиновых кислот для усиления сигнала от единичного акта взаимодействия антиген-антитело, так как, например, метод ПЦР позволяет детектировать десятки молекул ДНК в реакционной пробирке.

Первый подход (иммуно-ПЦР) и был разработан в 1992 году Sano T. с соавт. [6] и основывался на использовании полимеразной цепной реакции для детекции ДНК, каким-либо образом связанной с детектирующим антителом. Метод получил развитие в формате иммуно-ПЦР в реальном времени на 96-луночных планшетах [2], однако он не подходит для использования в других твердофазных системах анализа, например, на микрочипах, так как амплифицируемая ДНК не иммобилизована и амплификацию от отдельных сайтов связывания невозможно иден-

тифицировать. Этого недостатка лишен подход на основе реакции катящегося кольца (РКК), впервые описанный в работе [7], поскольку при его использовании амплифицируемая ДНК остается иммобилизованной. Принцип метода заключается в использовании конъюгата детектирующего антитела с праймером и последующей изотермической амплификации. После добавления к иммобилизованному праймеру кольцевых олигонуклеотидов, которые служат матрицей для амплификации (либо олигонуклеотидов, которые могут гибридизоваться с праймером и быть лигированы в кольцевую матрицу), полимеразы фага phi29 с необходимыми для начала амплификации компонентами начинается образование протяженного (до сотен тысяч нуклеотидов) одноцепочечного продукта реакции, представляющего собой повторы нуклеотидной последовательности, комплементарной кольцевой матрице. На следующем этапе добавляют флуоресцентный ДНК-зонд, который связывается с каждым повтором на молекуле продукта, таким образом уровень флуоресценции становится значительно выше, чем при использовании систем проявления с применением флуоресцентно-меченных антител или стрептавидина. Кроме того, продукт реакции остается иммобилизованным на поверхности, что позволяет использовать данный подход при детекции взаимодействий антиген-антитело в других твердофазных системах анализа, таких как микрочипы.

Общей проблемой таких подходов является неспецифическая сорбция компонентов иммунохимической реакции либо реакции амплификации, приводящая к высокому фону. Очевидно, что каким бы высокочувствительным анализ ни был в теории, высокий фон сведет весь потенциал метода на нет [5].

В настоящей работе мы разработали метод, позволяющий детектировать малые количества антител к гликанам в сыворотке крови и в смывах с опухолевых клеток в формате микрочипа (гликочип, эррей из гликановых лигандов, иммобилизованный на подложке). В работе использовали гликочип, несущий тетрасахариды А тип 2 и В тип 2 (GalNAc $\alpha$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-2) Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$  и Gal $\alpha$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-2) Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ ) – антигены А и В группы крови системы АВ0 соответственно.

## Материалы и методы

### Антитела

В исследовании была использована плазма крови донора группы крови А (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ).

Донором было подписано информированное согласие.

Мышиное моноклональное антитело, узнающее IgG человека клон XG36 (Хема), биотинилировали следующим образом: 0.5 мг/мл раствор антитела переводили в 0,1 М гидрокарбонатный буфер pH 8,3 гелем-фильтрацией на колонке NAP-5 (GE Healthcare). После спектрофотометического контроля содержания (SmartSpec Plus Bio-Rad,  $\lambda = 280$  нм) белка к раствору антитела прибавляли 5-кратный мольный избыток biotin-X-NHS (Lumiprobe) в DMSO, инкубировали 1 час при комнатной температуре, после чего очищали биотинилированное антитело на колонке NAP-10.

### Олигонуклеотиды

В работе были использованы следующие олигонуклеотиды производства Люмипроб:

beacWoC3 [Cy3]CCGGGTATCTATTCACCTA  
TTTATTCACCCGG[BHQ2];

Reg58WoCt [p]CATTTATCTATTCACCTATTT  
ATTCACCCACTTACTTACACCCACTCACTTAT  
TTACC;

pr25WoCtBio  
[biotin]TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGATAAAT  
GGGTAAATAAGTGAGTGG;

lockWoC GATAAATGGGTAAATA [Alkyne].

### Ферменты

Рекомбинантную полимеразу фага phi29 получали в клетках *E. coli*. Плазмидой pQE60, несущей ген, кодирующий полимеразу фага phi29 с введенным на N-конец участком, кодирующим 6xHis таг, трансформировали клетки *E. coli* штамма M15. Индукцию экспрессии проводили по стандартному протоколу, полимеразу выделяли согласно руководству Qiagen Expression-ist на Ni-NTA агарозе. После проводили гелем-фильтрацию на колонке Superde 10/300 Increase (GE Healthcare) в буфере 100 mM Tris-HCl, pH 7,2, 100 mM KCl, 0,2% Tween-20, добавляли DTT до концентрации 0,5 mM.

Для анализа эффективности реакции РКК анализировали кинетику накопления флуоресценции в ходе реакции в сравнении с полимеразой фага phi29 от Thermo Fisher Scientific. Анализируя линейный участок роста флуоресценции, по тангенсу угла наклона прямой, мы сравнивали скорость прохождения реакции при изменении состава смеси. Кольцевые матрицы получали лигированием, как описано в статье [1], с использованием линейных «заготовок» кольцевых матриц и олигонуклеотида lockWoC. После удаления остатков линейных олигонуклеотидов с помощью экзонуклеазы III *E. coli* (Сибэнзим) и пересаживания, концентрацию кольцевых матриц определяли с использованием набора QuDye ssDNA Assay Kit (Lumiprobe, Россия).

### Флуоресцентно-меченные белки

Стрептавидин (МЕВЕР Bio Science, Китай) и BSA (НПП «ПанЭко», Россия) метили следующим образом: белок растворяли в 0,1 М гидрокарбонатном буфере pH 8,3 до концентрации 5 мг/мл, добавляли 5-кратный мольный избыток sulfo-Cy3-NHS (Lumiprobe, Россия) и инкубировали 1 час при комнатной температуре. После чего очищали меченый белок на колонке NAP-10.

### Гликочипы

Лиганды А тип 2 и В тип 2 наносили бесконтактным способом (SciFlexArrayer S5, Scienion, Германия) на эпокси-активированный слайд СемиглассЭпокси (ООО «Семиотик», Россия) как описано в [4] в виде 8 блоков, в которых каждый лиганд был напечатан в диапазоне концентраций 25-200 мкМ. Для контроля неспецифического связывания в каждом блоке были напечатаны буфер для печати без лигандов и буфер для печати, содержащий 25 мМ этаноламин. Количество повторов в одном блоке для каждого лиганда в различных концентрации – 2. Для контроля системы детекции – флуоресцентно-меченные Cy3 стрептавидин и BSA в диапазоне концентраций 0,025-0,5 мкг/мл.

### Эксперимент на гликочипе

Схема эксперимента представлена на рисунке 1 (см. 3-ю стр. обложки).

После блокировки оставшихся активированных групп, на гликочип наносили плазму крови здорового донора разбавленную в 15 раз в буфере TBS (50 мМ Tris-HCl буфере pH 7,5, содержащем 150 мМ хлорид натрия) с добавлением 0,05% Tween20 (Sigma-Aldrich, США) 1% BSA (TBSTB) и инкубировали при повышенной влажности и небольшом перемешивании в течение 1 ч при 30 °С. Затем гликочипы промывали TBST (буфер TBS с добавлением 0,05% Tween 20) и наносили раствор биотинилированных антител мыши, узнающих IgG человека, в концентрации 0,1-10 мкг/мл в TBSTB, инкубировали, как описано выше, и промывали. Для стандартного выявления (контроль) связавшихся антител гликочипы инкубировали с раствором Cy3-меченного стрептавидина (0,1-10 мкг/мл в TBSTB), после чего промывали как описано выше, включая дополнительную стадию ополаскивания водой и высушивания с помощью центрифугирования на центрифуге для микрочипов Galaxy MiniArray (VWR, США).

Для контрольных блоков процесс на этом заканчивается, а в блоки с иммуно-РКК добавляли биотинилированный праймер в буфере TBS с добавлением 10 мкг/мл дрожжевой РНК (Sigma) (TBSTY) и после промывки проводили гибридизацию кольцевых матриц с одновременным лигированием. Далее в этих блоках проводили РКК

с добавлением флуоресцентного ДНК-зонда типа «молекулярный маячок» [3]. Особенностью данных зондов является вторичная структура – зонд, не сгибридизовавшийся с целевой ДНК, имеет шпильчатую конформацию, при которой 5' и 3' концы зонда сближены и тушитель эффективно гасит флуоресценцию. При появлении в растворе целевой ДНК зонд гибридизуется с ней, при этом 5' и 3' концы зонда расходятся и зонд ярко флуоресцирует.

### Детальная методика

1. Блокировка незанятых сайтов связывания 50 мМ этаноламином в боратном буфере pH 8,5 в течение ночи при +4 °С.
  2. Промывка TBST (TBS, 0,05% Tween 20) 150 мкл 1 раз.
  3. Нанесение 100 мкл плазмы PRh в буфере TBSTB (TBS pH 7,5, 0,05% Tween 20, 1% BSA), в разведении 1/15, инкубация 1 час при комнатной температуре.
  4. Промывка 5 раз по 150 мкл TBST (стандартная промывка).
  5. Нанесение 100 мкл XG36-biotin 1 мкг/мл в буфере TBSTB (при отработке условий концентрации варьировали от 0,2 до 10 мкг/мл), инкубация 1 час при комнатной температуре.
  6. Стандартная промывка.
  7. Нанесение 100 мкл 1 мкг/мл стрептавидина или стрептавидина-Cy3 (концентрации варьировали 0,2-5 мкг/мл) в буфере TBSTB, инкубация 1 час при комнатной температуре.
  8. Стандартная промывка.
  9. В лунки со стрептавидином (где в последствии будет проходить RCA) добавляли: праймер pr25WoCtBioT 0,1 мкМ в буфере TBSTY (TBS pH 7,5, 0,05% Tween 20, дрожжевая РНК 10 мкг/мл), инкубировали 40 мин при комнатной температуре.
  10. Стандартная промывка.
  11. Лигирование: в лунки добавляли олигонуклеотид reg58WoCt 0,3 мкМ; 1x буфер для лигазы T4 (Thermo Fisher, США); ДНК-лигазу T4 0,5 ед. (Thermo Fisher, США) Инкубировали 1 час при комнатной температуре.
  12. Стандартная промывка.
  13. Проведение реакции РКК:  
На 1 реакцию:  
Буфер для полимеразы фага phi29 10 (Thermo Fisher, США) – 10 мкл, dNTPs 3,3 мМ – 21 мкл, полимеразы фага phi29 (10 ед/мкл) – 4 мкл, зонд beacWoC2, 100мкМ – 3 мкл, вода mQ – до 100 мкл.  
Инкубация 3 ч при 30 °С.
  14. Стандартная промывка.
- После проведения анализа гликочип сканировали на сканере InnoScan 1100 (Innopsys, Франция) с разрешением 10 мкм, полученные изо-

бражения анализировали в программе ScanArray Express (Perkin Elmer, США) с последующей обработкой в Microsoft Excel. Интенсивность взаимодействия оценивали по величине относительных единиц флуоресценции (RFU).

## Результаты и обсуждение

Так как в нашем случае над поверхностью гликоципа будет проходить амплификация ДНК с образованием большого количества продукта (одноцепочечной ДНК), потенциально способного неспецифически связаться с поверхностью, было решено протестировать различные блокирующие агенты с целью выявить тот, при котором фоновая флуоресценция будет минимальной. Кроме того, в ранних экспериментах с иммуно-РКК мы наблюдали неспецифическое связывание компонентов с некоторыми сайтами, где были напечатаны либо антиген А, либо буферы для печати и блокировки даже при относительно низких концентрациях антител. Очевидно, что, если неспецифика наблюдается только при РКК, за ее появление отвечают какие-то компоненты амплификационной смеси. С целью уменьшить неспецифическое связывание

компонентов, был протестирован ряд реагентов для блокировки чипа (25 мМ этаноламин, глицин, аргинин, ОН-PEG3-NH<sub>2</sub>, аспарагин, BSA, таурин, см. табл. 1), а также протестировано влияние олигонуклеотида d(T)<sub>40</sub> и дрожжевой РНК (10 мкг/мл) на сорбцию праймера или кольцевой матрицы на стадии инкубации с праймером, кольцевой матрицей и РКК. В результате экспериментов было показано, что лучшим блокирующим агентом является этаноламин, который аминокислотной группой связывается с эпокси группой на поверхности гликоципа, а для этапов инкубации с нуклеиновыми кислотами лучшим блоком является дрожжевая РНК.

В подобранных условиях было проведено сравнение стандартной проявки комплекса «гликан-антитело» плазмы крови и использования иммуно-РКК. Полученные результаты приведены на рисунке 2 (см. 3-ю стр. обложки). Антитела плазмы ожидаемо узнавали антиген В группы крови, наблюдается усиление сигнала в 30-70 раз (для 200 мкМ концентрации) несмотря на несколько большую флуоресценцию сайтов, где был напечатан антиген А (с 400 RFU до 500-700 RFU). В настоящий момент методи-

ТАБЛИЦА 1. ЗНАЧЕНИЯ ФОНОВОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ РАЗНЫХ ПЕРВИЧНЫХ БЛОКИРУЮЩИХ АГЕНТОВ

TABLE 1. BACKGROUND FLUORESCENCE VALUES FOR DIFFERENT PRIMARY BLOCKING AGENTS

Блокирующий агент Blocking agents	Флуоресценция RFU (иммуно-РКК) Fluorescence, RFU (immuno-RCA)		Флуоресценция RFU (стрептавидин-Су3) Fluorescence, RFU (streptavidin-Cy3)	
	Фоновая флуоресценция Background fluorescence	Неспецифическое связывание (+ – есть, – – нет) Nonspecific interaction (+, yes; -, no)	Фоновая флуоресценция Background fluorescence	Неспецифическое связывание (+ – есть, – – нет) Nonspecific interaction (+, yes; -, no)
Этаноламин Ethanolamine	533±123	+	390±76	–
BSA	976±69	–	358±45	–
Глицин Glycine	815±130	+	388±37	–
Аспарагиновая кислота Aspartic acid	998±221	–	390±46	–
Таурин Taurine	654±69	+	394±96	–
NH <sub>2</sub> -PEG3-COOH	837±360	–	531±37	–
NH <sub>2</sub> -PEG3-OH	1638±130	+	635±119	–

Примечание. Фоновая флуоресценция – это сигналы от поверхности, не содержащие лиганды, неспецифическим взаимодействием считали отсутствие дифференцировки в сигналах от лигандов в разной концентрации.

Note. Background fluorescence is fluorescence from the surface that do not contain ligands; the nonspecific interaction was considered the lack of differentiation in signals from ligands at different concentrations.

ка недостаточно обработана, есть значительный разброс значений флуоресценции по дублям для образцов с иммуно-РКК, а также нелинейность уровня сигнала в зависимости от концентрации раствора антигена, взятого для печати. Оба этих фактора будут затруднять количественный анализ уровня антител и задают направление дальнейшей оптимизации метода. Кроме того, длина продукта амплификации может достигать до сотен тысяч нуклеотидов [1], с продуктом такой длины теоретически могут связаться более 1000 молекул флуоресцентно меченного зонда, что может позволить еще больше повысить прирост сигнала от единичных событий взаимодействия антиген-антитело. Еще одним недостатком при-

веденного метода является его длительность, мы планируем снизить время анализа путем использования пресобранных и очищенных заранее комплексов детектирующее антитело/праймер/кольцевая матрица.

## Заключение

Таким образом, разрабатываемый нами метод является перспективным, так как позволяет значительно увеличить сигнал от специфического взаимодействия антиген-антитело в формате гликочипа, что позволит детектировать антитела к гликанам в образцах с очень небольшой концентрацией антител, например, в смывах с опухлевых клеток.

## Список литературы / References

1. Goryunova M.S., Arzhanik V.K., Zavriev S.K., Ryazantsev D.Y. Rolling circle amplification with fluorescently labeled dUTP-balancing the yield and degree of labeling. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2021, Vol. 413, no. 14, pp. 3737-3748.
2. Niemeyer C., Adler M., Wacker R. Detecting antigens by quantitative immuno-PCR. *Nat. Protoc.*, 2007, Vol. 2, pp. 1918-1930.
3. Nilsson M., Gullberg M., Dahl F., Szuhai K., Raap A.K. Real-time monitoring of rolling-circle amplification using a modified molecular beacon design. *Nucleic Acids Res.*, 2002, Vol. 15, no. 30, e66. doi: 10.1093/nar/gnf065.
4. Obukhova P.S., Ziganshina M.M., Shilova N.V., Chinarev A.A., Pazynina G.V., Nokel A.Y., Terenteva A.V., Khasbiullina N.R., Sukhikh G.T., Ragimov A.A., Salimov E.L., Butvilovskaya V.I., Polyakova S.M., Saha J., Bovin N.V. Antibodies against unusual forms of sialylated glycans. *Acta Naturae*, 2022, Vol. 14, no. 2, pp. 85-92.
5. Ryazantsev D.Y., Voronina D.V., Zavriev S.K. Immuno-PCR: Achievements and Perspectives. *Biochemistry (Mosc.)*, 2016, Vol. 81, no. 13, pp. 1754-1770.
6. Sano T., Smith C.L., Cantor C.R. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science*, 1992, Vol. 258, no. 5079, pp. 120-122.
7. Schweitzer B., Wiltshire S., Lambert J., O'Malley S., Kukanskis K., Zhu Z., Kingsmore S.F., Lizardi P.M., Ward D.C. Immunoassays with rolling circle DNA amplification: a versatile platform for ultrasensitive antigen detection. *PNAS*, 2000, Vol. 97, no. 18, pp. 10113-10119.

### Авторы:

**Рязанцев Д. Ю.** — к.х.н., старший научный сотрудник ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Габриелян Н.Г.** — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Полякова С.М.** — к.х.н., младший научный сотрудник лаборатории углеводов ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Завриев С.К.** — д.б.н., член-корр. РАН, заведующий лабораторией молекулярной диагностики ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

### Authors:

**Ryazantsev D. Yu.**, PhD (Chemistry), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Diagnostics, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Gabrielyan N.G.**, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Diagnostics, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Polyakova S.M.**, PhD (Chemistry), Junior Research Associate, Laboratory of Carbohydrates, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Zavriev S.K.**, PhD, MD (Biology), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Diagnostics, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Поступила 03.04.2024

Отправлена на доработку 04.04.2024

Принята к печати 17.04.2024

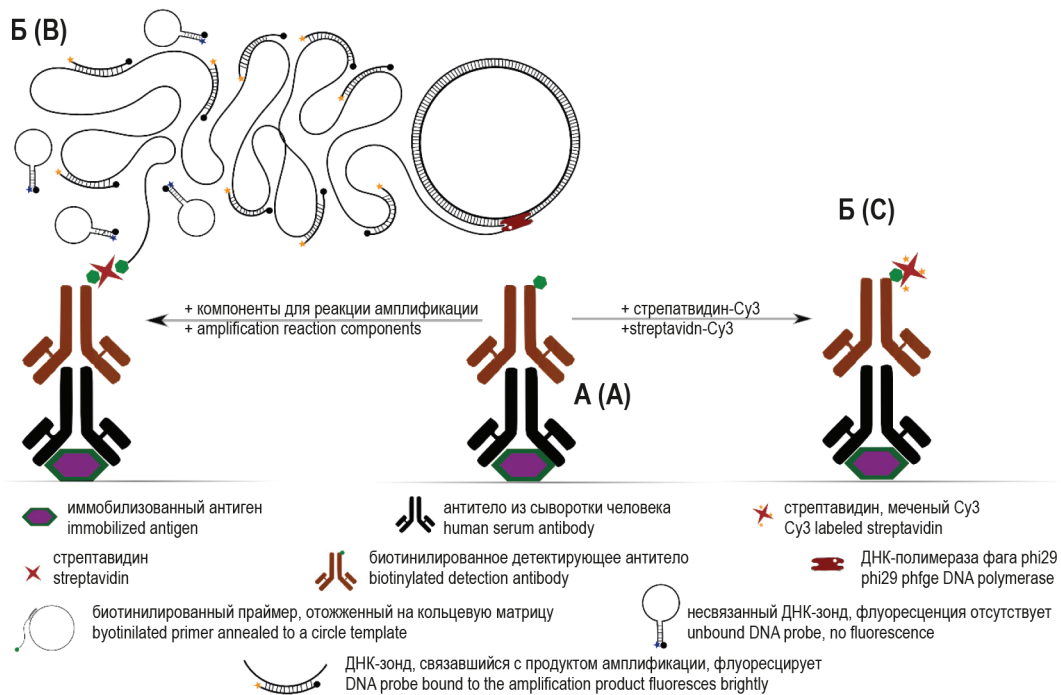
Received 03.04.2024

Revision received 04.04.2024

Accepted 17.04.2024

**ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ИММУНО-РКК ДЛЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ДЕТЕКЦИИ КОМПЛЕКСА АНТИГЕН-АНТИТЕЛО НА МОДЕЛИ АНТИГЕНОВ ГРУППЫ КРОВИ» (АВТОРЫ: РЯЗАНЦЕВ Д.Ю., ГАБРИЕЛЯН Н.Г., ПОЛЯКОВА С.М., ЗАВРИЕВ С.К. [с. 781-786])**

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE «IMMUNO-RCA FOR HIGHLY SENSITIVE DETECTION OF THE ANTIGEN-ANTIBODY COMPLEX IN THE BLOOD GROUP ANTIGEN MODEL» (AUTHORS: RYAZANTSEV D.YU., GABRIELIAN N.G., POLYAKOVA S.M., ZAVRIEV S.K. [pp. 781-786])

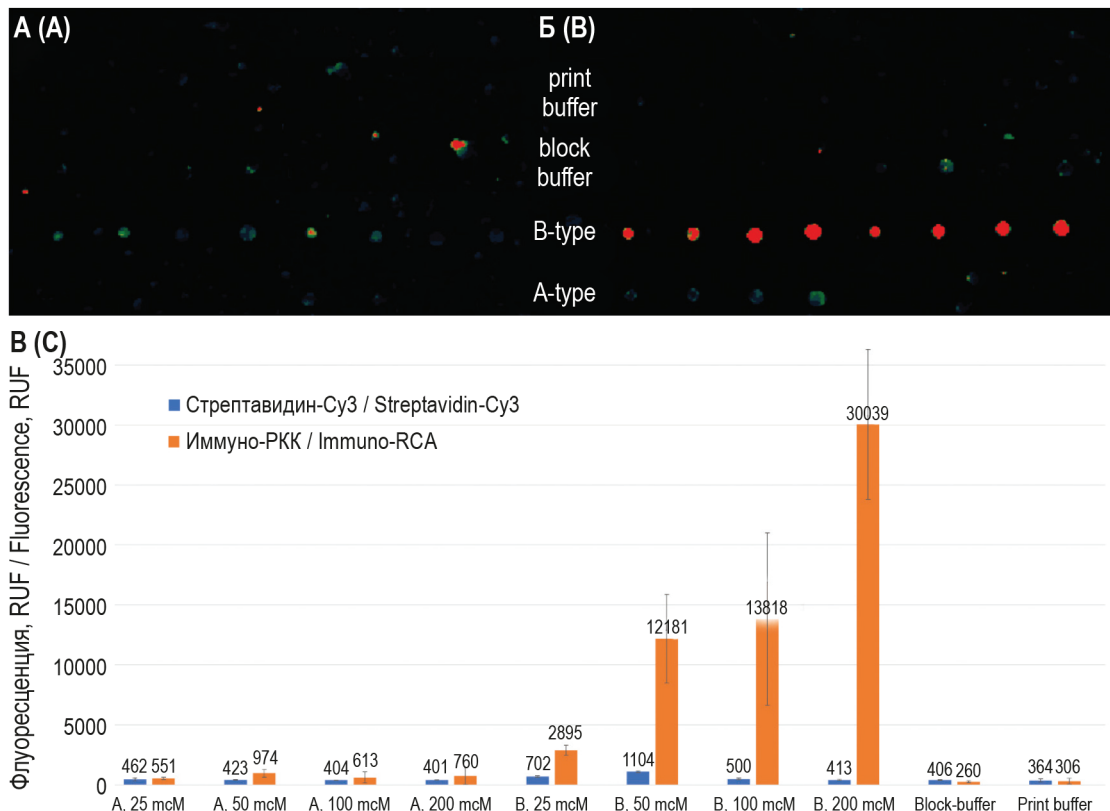


**Рисунок 1. Упрощенная (без стадии лигирования, используется уже готовая кольцевая матрица) схема иммуноанализа с использованием иммуно-РКК**

Примечание. А – иммобилизованные гликан, антитело из сыворотки и детектирующее биотинилированное антитело. Б – детекция с использованием иммуно-РКК. В – детекция с использованием флуоресцентно-меченного стрептавидина.

Figure 1. Simplified (without the ligation stage, a ready-made circle matrix is used) immunoassay scheme using immuno-RCA

Note. A, immobilized glycan, serum antibody and biotinylated detection antibody. B, detection using immuno-RCA. C, detection using fluorescently labeled streptavidin.



**Рисунок 2. Результаты экспериментов на гликочипе**

Примечание. Детекция результата с использованием флуоресцентно-меченного стрептавидина (А) и с проведением иммуно-РКК (Б), полученная при одинаковых параметрах сканирования. Переход цвета «синий – зеленый – красный» соответствует повышению уровня флуоресценции. Интенсивность взаимодействия антител плазмы с гликанами, выявляемое разными методами (В).

Figure 2. Results of experiments on a glycoarray

Note. Detection of the result using fluorescently labeled streptavidin (A) and with immuno-RCA (B), obtained with the same scanning parameters. The color transition from blue to green to red corresponds to an increase in the level of fluorescence. The intensity of interaction of plasma antibodies with glycans, detected by different methods (C).