

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

RYCHLÁ DETEKCE THIABENDAZOLU V LATERÁLNÍM TOKU NA MEMBRÁNĚ S NANOČÁSTICEMI ZLATA

SANDRA GÖSELOVÁ, BARBORA HOLUBOVÁ, MARTINA BLÁŽKOVÁ a LADISLAV FUKAL

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
Ladislav.Fukal@vscht.cz

Došlo 15.5.13, přijato 18.6.13.

Klíčová slova: thiabendazol, laterální tok, LFIA, nanočástice zlata, imunochromatografie

Úvod

Z původní role doplňujícího nástroje biochemického výzkumu se imunochemické metody v průběhu několika minulých desetiletí etablovaly jako jedna z alternativ chemické analytiky v řadě oborů^{1–4}. Jejich největší rozšíření je vidět v klinické diagnostické praxi. V současnosti narůstá napříč obory poptávka po tzv. rychlých testech – semikvantitativním formátu, který by byl jednodušší než klasické uspořádání enzymové imunanalýzy (ELISA) ve zkumavkách či mikrotitračních destičkách, tzn. byl snadněji proveditelný, rychlejší, aplikovatelný v místě odběru vzorku (event. nevyžadoval použití přístroje ani uživatele odborníka specialistu). Pro rychlou detekci velkých molekul (bílkovin) nebo buněk v jednom nebo několika málo vzorcích bez použití fotometru je nejpohodlnější sendvičové provedení ELISA v podobě ponořovacích tyčinek (na aktivní zónu s imobilizovaným imunoreaktantem se postupně aplikují další reaktanty ponořováním tyčinky do roztoků příslušného složení, přebytky nezachycených substancí se odstraňují opláchnutím) nebo kartiček s aktivními zónami z porézního materiálu (všechny složky aplikovaných roztoků protékají skrz tenkou porézní pevnou fázi s imobilizovaným imunoreaktantem, zachytí se pouze imunokompatibilní substance). Po aplikaci imunoreaktantů a testovaného vzorku je přidán substrát pro enzymovou reakci a po příslušné inkubaci je vytvořený odstín zbarvení aktivní zóny vizuálně porovnáván se standardní stupnicí.

Jako vhodnější formát se ukázala imunochromatografická technika podélného toku reagentů proužkem porézní membrány (angl. Lateral Flow Immunoassay; zkr. LFIA), která umožňuje konstruovat také kompetitivní formát pro

detekci malých molekul typu haptenu. Kombinace vhodného značení jednoho z partnerů interakce a toku označené látky společně s analytem přes zónu se zakotveným druhým reaktantem umožňuje imunoafinitní zachycení analytu a jeho jednoduchou a rychlou detekci. Z důvodu urychlení detekce se nepoužívá jako značka enzym, ale jiný marker (nejčastěji nanočástice koloidních kovů^{5,6}), který nevyžaduje k produkci signálu dodatečné, časově náročné chemické reakce. Vertikální uspořádání v podobě namáčečích proužků obvykle neobsahuje všechna činidla předem zasušená na membráně^{7,8}, jako je tomu v horizontální LFIA, kde je membrána uložena v kazetě, která ji chrání před poškozením a zajišťuje její stabilní polohu při vlastní detekci⁹. Pro některé analyty se LFIA testy komerčně vyrábějí. Nejznámější se stala jejich aplikace v rámci tzv. těhotenského testu (detekce choriogonadotropinu). Vedle rozsáhlých diagnostických aplikací v klinické medicíně se LFIA testy začínají uplatňovat i při monitorování potravinových surovin a produktů, kde mají potenciál ke snížení nákladů na provedení analýzy i k omezení výdajů na skladování neproověřeného materiálu či minimalizaci prodlev ve výrobě nebo prodeji hotových výrobků. Rychlé a dostatečně přesné testy by umožnily zvýšit rozsah kontroly kvality a zdravotní nezávadnosti.

V této práci popisujeme sestavení a optimalizaci LFIA testu pro thiabendazol (zkr. TBZ; 2-(thiazol-4-yl)benzimidazol) – široce používaný fungicid, jehož rezidua v potravinách jsou sledována kontrolními laboratořemi a v ČR patří četností pozitivních nálezů v kontrolovaném ovoci opakovaně na přední místa mezi sledovanými pesticidy¹⁰. Tradičně se TBZ stanovuje v extraktech vzorků sofistikovanými postupy (GC/MS, LC/MS) po sérii purifikačních kroků^{11,12}. V literatuře jsou popsány i tři rychlé imunochemické postupy^{13–15}. Žádný z nich však nepředstavuje nejednodušší jedнокrokovou detekci pouhou aplikací tekutého vzorku (surového extraktu) do analytického systému, tak jako LFIA. Jednoduchý LFIA test by mohl umožňovat rychlé terénní použití a být tak úspěšným komplementárním nástrojem ke stávajícím velmi nákladným instrumentálním postupům.

Experimentální část

Materiál

Thiabendazol (TBZ) – 98,5%, HPLC/DAD, 5-hydroxy-thiabendazol (99,5%, HPLC/DAD), stejně jako albendazol, benzimidazol, fenbendazol, flubendazol, mebendazol, oxibendazol, 2-aminobenzimidazol a 1-naftol (97,0–99,5 %, HPLC/DAD) byly koupeny od firmy Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, SRN). Myši anti-thiabendazolové monoklonální protilátky (McAb), stejně jako konjugát thiabendazolového haptenu s ovalbuminem

(TBZ-OVA) dodala Universidad Politécnic de Valencia, Španělsko. Označuje je LIB-TN3C13 a OVA-TN3C ve shodě s publikací, kde je podrobně charakterizuje¹³. IgG-fraze z prasečího antiséra proti myším IgG (SwAM), i z králičího proti prasečím (RASw) dodala firma Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Nizozemí. Koloidní částice zlata (40 nm, OD = 1) od firmy BBIInternational (Cardiff, UK), hovězí sérový albumin (BSA), Tween 20, Triton X100 a polyethylenglykol 20000 od Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA). Ostatní chemikálie čistoty p.a. byly od Lachema, a.s., Brno, nebo Penta, a.s., Praha. Nitrocelulosa membrána AE 98 a celulosová podložka pro vzorek CF1 byly od Whatman GmbH, SRN; podložka pro konjugát (ze skleněných vláken) GFCP 103000 a celulosová absorpční podložka CF SP 223000 od Millipore Corporation, USA. Plastovou výztuž membrány, ARcare® 8192, dodala firma Adhesives Research, Limerick, Irsko.

Metody

Příprava konjugátu protilátek s částicemi zlata

K 4 ml suspenze zlatých nanočástic (absorbance = 1) byl přidán 0,1M K₂CO₄, aby hodnota pH byla 8,8. K této suspenzi bylo za míchání přikapáno 100 µl protilátky (roztok v 5mM borátovém pufru, pH 8,8) o celkovém množství 0,8–20 µg (McAb) nebo 50 µg (SwAM). Po 2 h mírného míchání přidáno 200 µl 5% BSA a suspenze míchána 30 min. Následovalo odstředění (13 000 rpm, 5 °C, 15 min), supernatant byl odstraněn, pelety resuspendovány v 8 ml 5mM borátového pufru (s 0,1% BSA) a suspenze opět 15 min odstředěna. Toto bylo opakováno ještě dvakrát, finální resuspendace ve 2 ml 10mM borátového pufru (s 1% BSA, 2% sacharosu, 0,02% NaN₃). Takto připravený konjugát (absorbance = 1,5) byl uchováván v tmavé lahvi při 4 °C.

Příprava podložky pro konjugát a podložky pro vzorek

Podložka pro konjugát byla namočena do 10mM PBS pufru pH 7,4 (1% BSA, 0,25% Tween 20, 1% sacharosa, 0,02% NaN₃) a usušena při 37 °C. (Podložka pro vzorek byla upravena stejným způsobem, ale bez přidavku sacharosy). Dále byl nanášen konjugát Au-protilátka (anti-TBZ McAb nebo SwAM) ředěný 1:2 s 10mM PBS pufrům pH 7,4 (1% BSA, 1% sacharosa, 0,02% NaN₃) v množství 30 µl cm⁻¹, a ev. volná McAb (3 ng na 1 test). Podložka usušena při 37 °C.

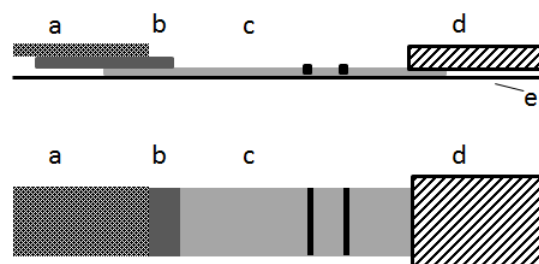
Příprava nitrocelulosové membrány a kompletace detekčního proužku

Nitrocelulosová membrána (2,5 × 20 cm) byla vyztužena polyesterovou podložkou (ARcare® 8192). Liniovým dávkovačem Linomat V (Camag AG, Švýcarsko) byly na membránu nanášeny reagenty (1 µl cm⁻¹) do dvou detekčních linek: roztok OVA-TN3C o koncentraci 50 µg ml⁻¹ do vzdálenosti 15 mm od spodního okraje, jako tzv. testovací linie (TL); roztok RASw (ev. SwAM) o koncentraci 200 µg ml⁻¹ jako tzv. kontrolní linie (KL) o 3 mm výše. Po

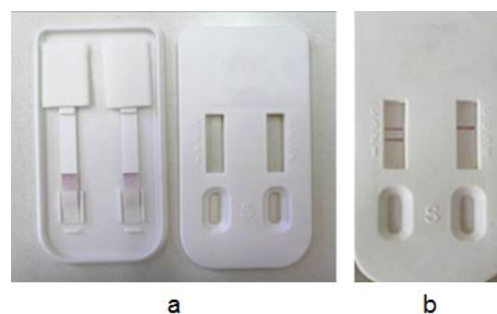
usušení membrány 2 h při 37 °C byla na spodní okraj membrány přilepena podložka pro konjugát se zasušeným konjugátem Au-Ab a dále připravená podložka pro vzorek. Takto připravená membrána byla nastříhána na jednotlivé proužky o šířce 5 mm pomocí Economic Cutter ZQ2000 (Shanghai Kinbio Tech Co., Ltd., Čína). Vzájemné uspořádání membrán v LFIA testu ukazuje obr. 1. Po vložení detekčního proužku do předlisovaného lože spodního dílu kazety byla na jeho horní konec nalepena absorpční podložka a kazeta byla uzavřena horním dílem (viz obr. 2). Kazeta nesoucí stacionární fázi (multimembránový proužek) je opatřena portem na nanášení vzorku a vyhodnocovacím okénkem s testovací a kontrolní zónou.

Provedení detekce LFIA testem

100 µl (pufrům ředěný tekutý vzorek či jeho extrakt, ev. roztok standardu TBZ) je aplikováno na port. Po vsáknutí do podložky pro vzorek se v laterálním toku pohybuje směrem k absorpční podložce, přičemž z podložky pro konjugát uvolní zde zasušené složky testu. Po 10 min lze vyhodnotit výsledek testu. Pro semikvantitativní posouzení obsahu TBZ se intenzita zbarvení TL a KL vyhodnocuje vizuálně. Vzorky, při jejichž analýze bylo dosaženo stejné



Obr. 1. Schéma uspořádání membrán v LFIA testu (nárys a půdorys); a – podložka pro vzorek, b – podložka pro konjugát, c – membrána s testovací a kontrolní linkou v detekční zóně, d – absorpční podložka, e – plastová výztuž membrány



Obr. 2. Ukázka membránového testu v kazetě; a – uspořádání membrán v kazetě, b – výsledek testu standardního roztoku bez analytu a s vysokou koncentrací analytu

intenzity TL jako v případě negativní kontroly, byly považovány za negativní (–) s obsahem TBZ nižším než detekční limit (LOD). V případě, že intenzita barvy TL byla slabší než u negativní kontroly, byl výsledek hodnocen jako slabě pozitivní (\pm). V případě, že se v testovací zóně neobjevilo zbarvení, byl vzorek vyhodnocen jako silně pozitivní (+). Pro kvantitativní vyhodnocení byly skenerem zaznamenány digitální obrazy jednotlivých LFIA-proužků a na nich byla intenzita zbarvení kvantifikována programem TotalLab TL100. Naměřené hodnoty pro roztoky standardu byly vyneseny proti logaritmu koncentrace a standardní křivka sigmoidního charakteru byla proložena pomocí čtyřparametrové logistické funkce¹⁶. LOD potom odpovídá průměrné hodnotě signálu při nulové koncentraci standardu minus $3 S_d$.

Ověřovací stanovení TBZ v modelových vzorcích potravin bylo provedeno metodou ELISA dříve popsaným postupem¹³ v mikrotitračních destičkách. Standardní křivka metody měla následující charakteristiku: LOD $0,05 \text{ ng ml}^{-1}$, I_{50} $0,4 \text{ ng ml}^{-1}$, lineární oblast $0,2\text{--}9,7 \text{ ng ml}^{-1}$.

Výsledky a diskuse

LFIA test je multimembránový detekční nástroj (schéma viz obr. 1 a 2a). Princip detekce analytu spočívá ve dvou současně probíhajících jevech: (i) kapilární migrace reaktantů horizontálně proužkem membrány následovaná imunoafinitním zachytem v detekční zóně; (ii) inhibice imunochemické interakce mezi TBZ předem zakotveným v testovací lince a migrující primární protilátkou prostřednictvím volného TBZ ze vzorku. Po aplikaci analyzovaného vzorku na podložku pro vzorek započne migrace všech složek roztoku až do absorpční podložky na opačném konci testu. Při průchodu podložkou pro konjugát (částice zlata – protilátka) je tento roztokem uvolněn z podložky a dále unášen společně s komponentami vzorku. Při absenci analytu ve vzorku migruje značená protilátka přes detekční zónu, kde je zachycena imobilizovaným ekvivalentem analytu (TBZ-OVA) v testovací lince za vzniku výrazné červené linie (zbarvení nanočástic Au). V přítomnosti analytu ve vzorku jeho volné molekuly v migračním toku interagují se značenou protilátkou a inhibují její interakci

s TBZ-OVA (viz obr. 2b). Intenzita zbarvení testovací linky je tak nepřímě úměrná koncentraci analytu (v určitém rozmezí koncentrací). Vedle toho vznik zbarvení kontrolní linky není ovlivňován přítomností analytu. Slouží jako pozitivní kontrola k ujištění, že značená protilátka migruje membránou očekávaným způsobem.

Konjugace protilátek (Ab) s nanočásticemi zlata (AuNP)

Pro získání homogenního konjugátu AuNP s Ab a následně ostrých linek na membráně testu jsou nezbytné sférické monodispersní částice uniformní velikosti a tvaru. To jejich dodavatel v našem případě deklaruje. Negativní náboje obklopující povrch částic potlačují jejich samovolnou agregaci. S rostoucí velikostí jsou ale AuNP citlivější na přítomnost elektrolytů v prostředí a náchylnější k agregaci. Imunoglobuliny, stejně jako ostatní makromolekuly, se spontánně adsorbují na povrch AuNP prostřednictvím elektrostatických a hydrofóbních interakcí¹⁷, a tím je vlastně stabilizují proti agregaci¹⁸. Nejintenzivnější sorpce je dosaženo při hodnotách pH blízko jejich pI. Jelikož IgG představují izoelektricky heterogenní proteiny (pI = 5,5–8,7), nemůže být aplikován na jejich konjugaci s AuNP jednotný postup, ale pro konkrétní Ab a AuNP (vliv náboje, tvaru povrchu) je nutné jej optimalizovat především z hlediska pH, doby inkubace a množství přidaného proteinu^{19,20}. Příliš vysoká koncentrace vede k vícevrstvé sorpci a eventuálnímu uvolňování IgG z konjugátu během skladování^{20,21}. Citlivost imunometod je do značné míry dána afinitou Ab. U kompetitivních imunoeanalýz lze velice zlepšit citlivost minimalizací množství Ab v reakci; u LFIA tedy množstvím Ab na jednu částici zlata a ev. následně množstvím konjugátu AuNP-Ab. Většina autorů^{22–26} pro LFIA používá ke konjugaci experimentálně zjištěné minimální množství Ab zajišťující stabilizaci sólu zlata vůči koagulaci při zvýšené koncentraci NaCl¹⁹. Protože jsme s konjugátem připraveným tímto způsobem nedosáhli následně při LFIA požadované citlivosti, snížili jsme množství McAb přidávané do konjugace (viz tab. I). Z velikosti molekuly IgG plyne, že i při aplikaci $0,2 \mu\text{g}$ na 1 ml koloidu zlata připadá na 1 částici 9 molekul IgG. To je 5–30krát méně, než uvádějí

Tabulka I

Detekční limity testů dosažené s konjugáty AuNP-McAb lišícími se přídatkem množství anti-thiabendazolové McAb do sólu zlata při přípravě konjugátu

Detekční limit	Množství McAb na 1 ml AuNP		
	5 μg	1 μg	0,2 μg
„Cut-off“ (ng ml^{-1}) ^a	200	200	50
LOD pro kvantitativní hodnocení (ng ml^{-1}) ^b	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,05$

^a Nejnižší koncentrace thiabendazolu, při které se ve vizuálně hodnoceném testu neobjevila testovací linka, ^b detekční limit odečtený ze standardní křivky, AuNP – nanočástice zlata, McAb – monoklonální protilátka

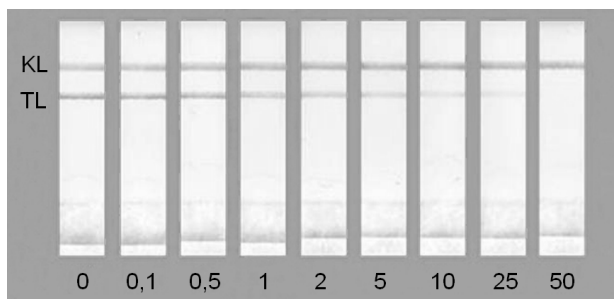
zmiňované práce^{22–26}. Pokud je průměrný průmět molekuly IgG do plochy 65 nm^2 (cit.^{27–29}), potom je teoreticky potřeba na jednovrstvé pokrytí povrchu částice maximálně 78 molekul IgG. Je otázka, zda takové množství není pro daný účel kontraproduktivní: (i) spotřebuje se větší množství cenného reaktantu; (ii) nedosáhne se tím lepší citlivosti; (iii) při nízkých koncentracích Ab se tyto sorbují na povrch AuNP s výrazně vyšší účinností ve srovnání s vyššími koncentracemi (až 98 % po 15 min inkubace)^{20,30}; (iv) koloidní stabilita sólu zlata je každopádně i v případě použití menšího množství Ab pro konjugaci zajištěna následným přidáním přebytku inertního BSA. Z tab. I je zřejmé, že s konjugátem připraveným s nejnižším množstvím Ab bylo dosaženo nejlepší citlivosti LFIA. Intenzita zbarvení kontrolní linky ale byla slabá, vizuálně špatně patrná, což nevyhovuje požadavkům na terénní test.

Proto bylo experimentálně prověřeno následující řešení. AuNP byly konjugovány s vyšším množstvím tzv. sekundární protilátky (SwAM) a k získanému konjugátu přidáváno do LFIA malé množství anti-TBZ McAb.

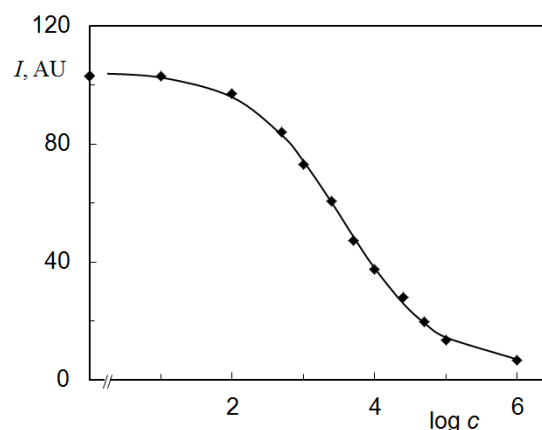
Konstrukce a charakterizace LFIA testu

Při použití konjugátu AuNP se sekundární Ab (SwAM) byla na kontrolní linku membrány testu imobilizována terciární Ab (RASw, protilátka proti sekundární Ab). Po optimalizaci množství všech reaktantů v testu byl v tomto uspořádání zjištěn vizuální LOD 2 ng ml^{-1} (obr. 3). Také při kvantitativním vyhodnocení testu LFIA bylo dosaženo parametrů (standardní křivka viz obr. 4), které vyhovují požadavkům na screeningovou detekci TBZ v terénních podmínkách (LOD = $0,1 \pm 0,02 \text{ ng ml}^{-1}$, $I_{50} = 2,2 \text{ ng ml}^{-1}$, lineární část standardní křivky $0,4\text{--}20 \text{ ng ml}^{-1}$).

Sestavený a charakterizovaný test byl prověřen při detekci TBZ v uměle kontaminovaných vzorcích potravin – ovocných džusech (pomarančový, banánový, jablečný), ovoci, dětské výživě. Maximální limity reziduí (MLR) thiabendazolu jsou 5 mg kg^{-1} v uvedeném ovoci (džusech), a $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ v dětské výživě, což jsou koncentrace výrazně nad LOD testu dosaženými pro roztoky standardu



Obr. 3. Testovací proužky po aplikaci ředící řady standardních roztoků thiabendazolu (ng ml^{-1}); TL – testovací linka, KL – kontrolní linka



Obr. 4. Standardní křivka testu pro thiabendazol; I – intenzita zbarvení testovací linky (arbitrární jednotky), c – koncentrace thiabendazolu (pg ml^{-1}), $S_d = 3,4\text{--}11,7 \%$ ($n=5$)

TBZ v pufru. Možnost aplikace kapalných vzorků nebo surových extraktů pevných vzorků do analýzy bez jakéhokoliv předchozího čištění je jednou z výhod imunometod. Různé typy matrice vzorku však mohou s různou intenzitou v analýze interferovat. Nejjednodušší způsob odstranění takových interferencí je naředění vzorku (filtrátu z homogenátu). V našem případě odstranění vlivu matrice na výsledky testu představovalo pro všechny typy vzorků stonásobné naředění pufrům a následně nutnost prokázat LFIA testem 100krát nižší koncentrace než uvedené hodnoty MLR. Detekční limity dosažené LFIA testem v naředěných maticích po přepočtu na neředěný vzorek jsou uvedeny v tab. II. Je z nich patrné, že uvedený LFIA test je vhodný pro kontrolu obsahu reziduí TBZ v ovoci a ovocných džusech. Variační koeficienty (inter-assay) pro koncentrace TBZ 5 mg kg^{-1} byly menší než 16 % s průměrnou výtěžností 91–112 %. V případě dětské výživy jsou ale dosažené hodnoty LOD vyšší než je MLR daný hygienickými předpisy (tab. II). Proto by bylo nutné před použitím LFIA testu pro tento typ vzorků nejprve TBZ v roztoku nakoncentrovat. Např. vzorky jednoduše extrahovat v ethylacetátu, odparek organické fáze rozpustit v menším objemu methanolového roztoku (methanol-voda

Tabulka II
Detekční limity LFIA testů dosažené v maticích ředěných vzorků (přepočteno na neředěný vzorek)

Druh vzorku	Detekční limit (mg kg^{-1})	
	vizuální	kvantitativní
Ovocné džusy	0,5	0,05
Ovoce	1,0	0,2
Dětská výživa	0,5	0,05

3:7) a tento surový extrakt analyzovat LFIA (výsledky nejsou uvedeny).

Závěr

Byl sestaven jedнокrokový imunochemický membránový test pro rychlou detekci thiabendazolu. Po optimalizaci konjugace protilátek s částicemi zlata a množství jednotlivých reaktantů v testu bylo dosaženo dobrých analytických parametrů při jeho aplikaci na roztok standardu thiabendazolu. Aby i pro terénní aplikaci testu byl naplněn požadavek na jednoduchost a rychlost detekce, byla ověřena možnost analyzovat vzorky potravin na bázi ovoce bez předchozí extrakční a čistící procedury. Sestavený test při analýze modelově kontaminovaných vzorků poskytl výsledky, které ukazují na jeho možné použití k terénní screeningové kontrole vzorků typu ovocných džusů a homogennátů ovoce po jejich pouhém naředění.

LITERATURA

- Ullman E. F., Schwarzberg M., Rubenstein K. E.: *J. Biol. Chem.* 251, 4172 (1976).
- Blake C., Gould B. J.: *Analyst* 109, 533 (1984).
- Fukal L., Káš J., Paluska E.: *J. Chromatography* 285, 365 (1984).
- Worsfold P., Townshend A., Poole C. (ed.): *Encyclopedia of Analytical Science*, 2. vyd. Elsevier Ltd., Amsterdam 2005.
- Sádecká J., Labuda J., Uričková V.: *Chem. Listy* 106, 739 (2012).
- Ackerson C. J., Jadzinsky P. D., Jensen G. J., Kornberg R. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 128, 2635 (2006).
- Javůrková B., Blažková M., Fukal L., Rauch P.: *Chem. Listy* 105, 193 (2011).
- Blažková M., Javůrková B., Fukal L., Rauch P.: *Biosens. Bioelectron.* 26, 2828 (2011).
- Posthuma-Trumpie G. A., Korf J., Van Amerongen A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 569 (2009).
- Státní zemědělská a potravinářská inspekce, souhrnné zprávy za r. 2008-2012, <http://www.szpi.gov.cz/lstDoc.aspx?nid=11386&cpi=1>, staženo 15.5.13.
- Stupák M., Kalachová K., Pulkrabová J., Hajšlová J.: *Chem. Listy* 106, S123 (2012).
- Křížová R., Urbanová J., Hajšlová J.: *Chem. Listy* 105, S33 (2011).
- Abad A., Manclús J. J., Moreno M. J., Montoya A.: *J. AOAC Int.* 84, 156 (2001).
- Blažková M., Rauch P., Fukal L.: *Biosens. Bioelectron.* 25, 2122 (2010).
- Estevez M. C., Belenguer J., Gomez-Montes S., Miralles J., Escuela A. M., Montoya A., Lechuga L. M.: *Analyst* 137, 5659 (2012).
- Karpinski K. F.: *Biometrics* 46, 381 (1990).
- Kaur K., Forrest J. A.: *Langmuir* 28, 2736 (2012).
- Zhao W., Brook M. A., Li Y.: *ChemBioChem* 9, 2363 (2008).
- Horisberger M., Rosset J.: *J. Histochem. Cytochem.* 25, 295 (1977).
- Geoghegan W. D.: *J. Histochem. Cytochem.* 36, 401 (1988).
- Volden S., Trinh L. T. T., Kjoniksen A. L., Yasuda M., Nystrom B., Glomm W.: *J. Phys Chem.* 115, 11390 (2011).
- Thobhani S., Attree S., Boyd R., Kumaraswami N., Noble J., Szymanski M., Porter R. A.: *J. Immunol. Methods* 356, 60 (2010).
- Tippkoetter N., Stuckmann H., Kroll S., Winkelmann G., Noack U., Scheper T., Ulber R.: *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 863 (2009).
- Guo Y. R., Liu S. Y., Gui W. J., Zhu G. N.: *Anal. Biochem.* 389, 32 (2009).
- Byzova N. A., Zvereva E. A., Zherdev A. V., Eremin S. A., Sveshnikov P. G., Dzantiev B. B.: *Anal. Chim. Acta* 701, 209 (2011).
- Hua X., Yang J., Wang L., Fang Q., Zhang G., Liu F.: *PLoS ONE* 7(12), e53099 (2012).
- Pease L. F., Elliott J. T., Tsai D. H., Zachariah M. R., Tarlov M. J.: *Biotechnol. Bioeng.* 101, 1214 (2008).
- Lee K. B., Park S. J., Mirkin C. A., Smith J. C., Mrksich M.: *Science* 295, 1702 (2002).
- Tan Y. H., Liu M., Nolting B., Go J. G., Gervay-Hague J., Liu G. Y.: *ACS Nano* 2, 2374 (2008).
- Urusov A. E., Kostenko S. N., Sveshnikov P. G., Zherdev A. V., Dzantiev B. B.: *J. Anal. Chem.* 66, 770 (2011).

S. Göselová, B. Holubová, M. Blažková, and L. Fukal (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Colloidal Gold-Based Lateral Flow Assay for The One-Step Rapid Detection of Thiabendazole**

A rapid strip test for semiquantitative or quantitative screening of thiabendazole in some fruit foods (fruits, fruit juices, baby foods) was developed, which is based on lateral flow immunoassay (LFIA). Test parameters such as membranes and buffers types, the amount and type of antibodies for labeling with gold nanoparticles, and dilution of gold-labeled antibodies and samples were optimized. The strip contains all the necessary reagents dried on membranes. The test can be accomplished within 10 min. The visual limit of detection was 2 ng ml^{-1} . For quantitative assessment a standard curve of LFIA was produced with detection limit of $0.1 \pm 0.02 \text{ ng ml}^{-1}$, the IC_{50} value of 2.2 ng ml^{-1} , and the linear working range of $0.4\text{--}20 \text{ ng ml}^{-1}$. In the test, spiked samples were analyzed. Samples of fruit juices or fruit homogenate filtrates were diluted with buffer and analysed directly without any purification. The coefficients of inter-assay variation were below 16 %, with recoveries ranging from 91 to 112 %. The proposed LFIA test enables a sensitive, rapid, and facile on-site screening of thiabendazole.