

Разработване на имунофлуоресцентен биосензор за анализ на сулфадиметоксин в мляко на базата на магнитни наночастици

Катя Габровска, Светла Иванова, Цонка Годжевъргова

Immunofluorescent biosensor based on magnetic nanoparticles for analysis of sulfadimethoxine in milk. An analytical system was developed for detection of sulfadimethoxine residues in milk. The method is based on fluorescence immunoassay. Antibodies to sulfadimethoxine were immobilized on magnetic nanoparticles (MNPs), containing free NH₂ and COOH groups. Two immobilization methods were used – random and oriented method by protein A. The fluorochrome-antigen conjugates, contain FITC and ATTO 590 were obtained and show highest emission in the green and yellow regions of the visible light spectrum, respectively. The immunosensor was successfully applied for the determination of sulfadimethoxine milk and foods.

Key words: sulfadimethoxine, immunosensor, fluorescence, milk

ВЪВЕДЕНИЕ

Поради нарастващата необходимост от повишаване на контрола върху качеството и безопасността на храните е наложително разработването на модерни и бързи методи с висока чувствителност и селективност за детекция и количествено определяне на остатъци от антибиотици, нитрати, пестициди, тежки метали и други токсични компоненти в храните. Присъствието на остатъци от определени антибиотици (пеницилини, сулфонамиди, тетрациклини) в млякото, млечните продукти и храните представлява потенциален риск за консуматорите и може да доведе до алергични реакции, до взаимодействие с вътрешно стомашната флора и устойчива популация на бактериите. Освен това, остатъчните антибиотици водят до големи икономически загуби, свързани с инхибирането на бактериалните процеси при получаването на сиренето и млечните продукти [7].

С Наредба № 36 от 23.03.2006 и Наредба № 4 от 2008 г всички производители на мляко и млечни продукти в България се задължават да окачествяват млякото си по отношение на остатъци от антибиотици. У нас не се произвеждат биосензори за антибиотици, включително за сулфонамиди и в момента се работи само с вносни микробиални тестове, които са много бавни (3 часа). Високата цена на вносните анализи ги правят недостъпни за голям брой потенциални потребители и за провеждане на масови изследвания.

Рутинните методи използвани за определяне на антибиотици в храни най-често се основават на забавяне растежа на чувствителните микроорганизми *Bacillus stearothermophilus*, но тези анализи са много бавни (3 часа), [2]. HPLC е подходящ метод за анализ на остатъци от антибиотици, но изисква скъпа апаратура и добре обучен персонал [6]. За да се избегнат забавянията в пунктовете за прием на мляко е необходимо да се развият бързи, евтини и чувствителни методи за анализ. Такива са имунофлуоресцентните биосензори, тъй като те съчетават бързина и чувствителност, дължаща се на това, че реакцията между антиген (изследвания антибиотик) и съответното комплементарно антитяло е много селективна и бърза.

Целта на тази статия е да се получи имунофлуоресцентен биосензор за бърз анализ на сулфадиметоксин, който напълно да отговаря на изискванията за бърз и чувствителен биосензор, гарантиращ добър контрол върху качеството и безопасността на храните.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

Като носител за провеждане на имобилизацията на антителата срещу сулфадиметоксин, (Sigma-Aldrich, USA) се използват два вида магнитни наночастици (МЧ): съдържащи свободни COOH и NH₂ групи. Получаването на магнитните частици

се извършва чрез копреципитация на Fe^{3+} и Fe^{2+} йони [9]. За приготвяне на конюгатите: флуоресцентно багрило-антиген се използва тетраметилпродамин изотиоцианат (TRITC), [8], ATTO 590, [3] и сулфадиметоксин, (Sigma-Aldrich, USA). Имобилизацията на анти-сулфадиметоксина към функционализираните наночастици се осъществява по два начина: директна имобилизация (без използване на протеин А), [5] и ориентирана имобилизация (чрез използване на протеин А), [1].

2. Имунологичен анализ.

В епруветка се поставят 50 μL стандартен разтвор на сулфадиметоксин (с концентрация $10 \pm 1000 \text{ ng mL}^{-1}$). Прибавят се 75 μL магнитни наночастици с имобилизирано антитяло и получена смес се инкубира 15 минути, с цел свързване на сулфадиметоксина към антитялото. Следва прибавяне на 100 μL флуоресцентно белязан антибиотик и смесва се инкубира за още 15 минути при стайна температура и разбъркване. Несвързаният флуоресцентно белязан антибиотик, се отделя и се измерва флуоресценцията.

3. Кръстосана реактивност

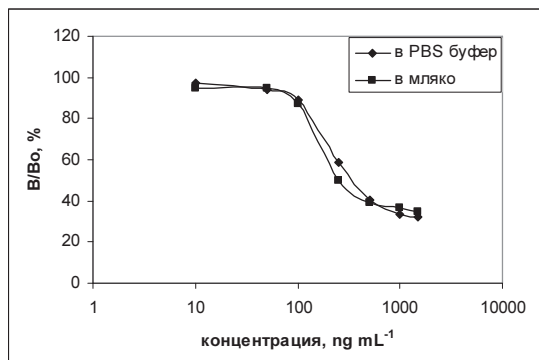
Кръстосана реактивност се изчислява по следното уравнение:

$$K P, \% = \frac{\text{Концентрация на сулфадиметоксина, даваща } 50\% \text{ } V/B_0 \times 100}{\text{Концентрация на друг сулфонамид, даваща } 50\% V/B_0}$$

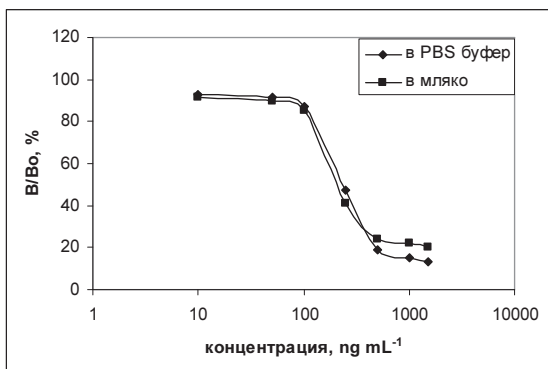
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

I. Разработване на имунофлуоресцентен биосензор за анализ на сулфадиметоксин в мляко на базата на СООН магнитни наночастици

Като носител за имобилизация на моноклонални антитела срещу сулфадиметоксин са използвани СООН - МЧ (2.5% w/v, 0.24 μm). Към тези наночастици ковалентно са имобилизирани антителата посредством два вида имобилизация: директна (без протеин А) и ориентирана (с протеин А). Количеството на имобилизираните към частиците антитела е определено по метода на Лоури [4] и е съответно 0.023 mg Ab на mg МЧ при ориентирана имобилизация и 0.031 mg Ab на mg МЧ при директния метод на имобилизация). На Фигура 1 е представена графичната зависимост между концентрацията на антибиотика сулфадиметоксин и флуоресцентния сигнал на биосензора (V/B_0) в PBS буфер и в мляко при използване на директна имобилизация. Установен е линеен интервал на калибрационната крива при концентрации на сулфадиметоксина от 100 до 500 ng mL^{-1} , ниска определяема лимитна концентрация (LOD) – 95 ng mL^{-1} и висок корелационен коефициент (Таблица 1).



Фигура 1. Калибрационна крива на стандартни разтвори на сулфадиметоксин в PBS буфер и в мляко при използване на директна имобилизация на моноклонално антитяло върху СООН - магнитни частици



Фигура 2. Калибрационна крива на стандартни разтвори на сулфадиметоксин в PBS буфер и в мляко при използване на ориентирана имобилизация на моноклонално антитяло върху COOH - магнитни частици

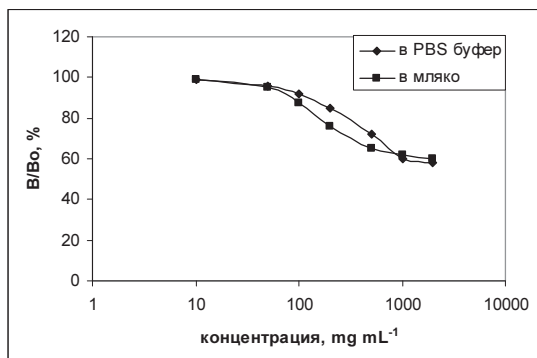
Когато определянето на антибиотика се проведе с антителата, имобилизирани чрез Pro A (Фигура 2) линейността на получените стандартни криви е същата ($100 + 500 \text{ ng mL}^{-1}$), но наклона на стандартните криви в този случай е 1.5 пъти по-голям от наклона на кривите, получени при използване на директна имобилизация. Границата на откриване е 95 ng mL^{-1} . Постигнати са добри коефициенти на корелация R^2 (таблица 1).

Таблица 1
Линейност и чувствителност на калибрационните криви на имуофлуоресцентния анализ за определяне на сулфадиметоксин в PBS буфер и в мляко

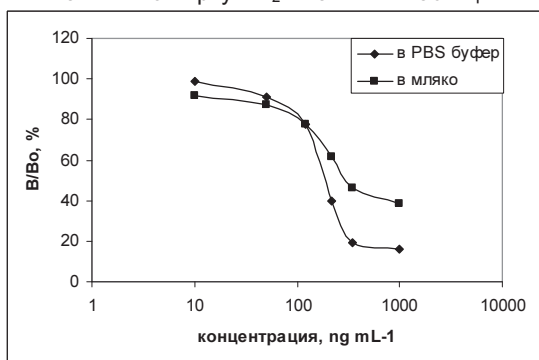
Метод на имобилизация	R^2	Уравнение на линейната област
Директна имобилизация, PBS буфер	$R^2 = 0,9222$	$y = -0,1172x + 96,170$
Директна имобилизация, мляко	$R^2 = 0,8149$	$y = -0,1125x + 90,511$
Ориентирана имобилизация, PBS буфер	$R^2 = 0,9421$	$y = -0,1644x + 97,618$
Ориентирана имобилизация, мляко	$R^2 = 0,8552$	$y = -0,1435x + 90,825$

II. Разработване на имуофлуоресцентен биосензор за анализ на сулфадиметоксин в мляко на базата на NH_2 магнитни наночастици

Като носител за имобилизация на поликлонални антитела срещу сулфадиметоксин са използвани NH_2 - МЧ с диаметър 30 nm. Имобилизацията на анти-сулфадиметоксина се извършва по два начина: директна имобилизация и ориентирана имобилизация. Ефективността на имобилизацията е определена по метода на Лоури [4] (0.021 mg Ab на mg МЧ при ориентирана имобилизация и 0.029 mg Ab на mg МЧ при директния метод на имобилизация). Построени са графичните зависимости между концентрацията на антибиотика сулфадиметоксин и флуоресцентния сигнал на биосензора (V/Bo). На фигура 3 са представени резултатите от определяне на сулфадиметоксин в буфер и в мляко чрез директна имобилизация на поликлонално антитяло към NH_2 -магнитните наночастички. Работният диапазон е от 10 до 1000 ng mL^{-1} , а границата на откриваемост (LOD) е 95 ng mL^{-1} . Линейността на получените стандартни криви в буфер и мляко е $100+500 \text{ ng mL}^{-1}$. Постигнати са добри корелационни коефициенти R^2 (Таблица 2).



Фигура 3. Калибрационна крива на стандартни разтвори на сулфадиметоксин в PBS буфер и в мляко при използване на директна имобилизация на моноклонално антияло върху NH₂ - магнитни частици



Фигура 4. Калибрационна крива на стандартни разтвори на сулфадиметоксин в PBS буфер и в мляко при използване на ориентирана имобилизация на моноклонално антияло върху NH₂ - магнитни частици

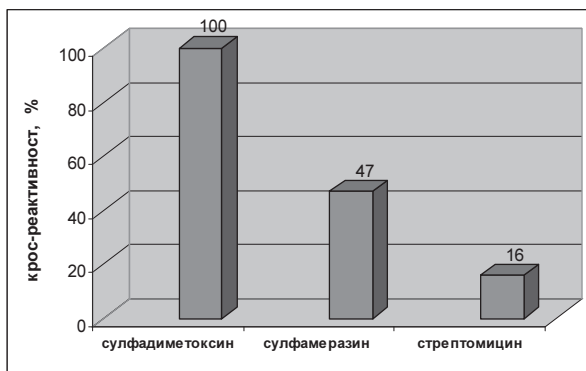
Когато определянето на антибиотика се проведе с антителата, имобилизирани чрез Pro A (фиг. 4) линейността на получените стандартни криви е същата (100 ± 500 ng mL⁻¹), но техния наклон е над пет пъти по-голям от наклона на кривите, получени при използване на директна имобилизация. Границата на откриване е 95 ng mL⁻¹. Постигнати са добри коефициенти на корелация R² (таблица 2).

Таблица 2

Линейност и чувствителност на калибрационните криви на имунофлуоресцентния анализ за определяне на сулфадиметоксин в PBS буфери в мляко

Метод на имобилизация	R ²	Уравнение на линейната област
Директна имобилизация, PBS буфер	R ² = 0.9918	y = -0.0485x + 95.850
Директна имобилизация, мляко	R ² = 0.915	y = -0.0517x + 89.838
Ориентирана имобилизация, PBS буфер	R ² = 0.9988	y = -0.3864x + 124.66
Ориентирана имобилизация, мляко	R ² = 0.9667	y = -0.2014x + 102.69

Определена е селективността на получения биосензор чрез определяне на кръстосаната реактивност със сулфамеразин и стрептомицин, съединения със структура близка до тази на анализа.



Фигура 5. Кръстосана реактивност на анти-сулфадиметоксин в мляко

От Фигура 5 се вижда, че тези две съединения имат ниска кръстосана реактивност срещу използваните антитела, съответно 47% и 16%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Създаден е бърз, селективен имунофлуоресцентен метод за анализ на сулфадиметоксин в храни при използване на два вида имобилизация. Постигнати са много ниски концентрации за измерване на сулфонамиди и високи корелационни коефициенти.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Bae, Y.; Oh, B.; Lee, W.; Lee, W.; Choi, J.; Biosens. Bioelectron. 21, 2005, 103–110.
- [2] Korsrud, G.; Boison, J.J. Assoc. Off. Anal. Chem. (81), 1998, 21–24.
- [3] Lakaye, B.; Damblon, C.; Jamin, M.; Galleni M.; Lepage, S. Biochem. J. 300, 1994, 141-145.
- [4] Lowry H., N. Rosenbough, H. Farr, J. Chem., 193, 1951, 265.
- [5] Medina, M. B.; J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 3231-3236 3231
- [6] Reeves, V. B. J. Chromatogr. B 723 (1–2), 1999, 127–137.
- [7] Schiffmann, A. P.; Schütz, M.; Wiesner, H. U. Milchwissenschaft 47 (11), 1992, 712–715.
- [8] Schwenzer, K., Anhalt, J.; Antimicrob. Agents Chemother. 23 (5), 1983, 683-687.
- [9] Yamaura, M.; Camilo, R.L.; Sampaio, L.C.; Macedo, M.A.; Nakamura, M.; Toma, H.E. Journal of Magnetism and Magnetic Materials 279, 2004, 210–217

Благодарности: Това изследване е осъществено с финансова помощ по договор НИХ- 235/ 2011 г. от Университет „Проф. д-р Асен Златаров”.

За контакти:

доц. д-р Катя Иванова Габровска, У-т „Проф.д-р Асен Златаров”, Бургас, тел.: 056/858471, e-mail: gabrovska@mail.bg

Светла Иванова Иванова – редовен докторант, У-т „Проф.д-р Асен Златаров”, Бургас, тел.: 056/858333, e-mail: your.svetli@yahoo.com

проф. д-р Цонка Иванова Годжевъргова, У-т „Проф.д-р Асен Златаров”, Бургас, тел.: 056/858353, e-mail: godjevargova@yahoo.com

Докладът е рецензиран.