

Имунофлуоресцентен биосензор за бърз анализ на сулфонамиди в храни

Катя Габровска, Руска Ненкова, Светла Иванова, Цонка Годжевъргова

Immunofluorescent biosensor for rapid analysis of sulfonamides in food. A new fluorescence immunoassay for the determination of sulfadimethoxine sodium salt (SDX) was developed. Anti-sulfadimethoxine antibody (Anti-SDX) was immobilized to the inside surface of a functionalized capillary column and the antigen-binding sites of Anti-SDX saturated with TRITC-labeled SDX (TRITC - SDX). Analyte SDX was circulated through the column in a closed loop and the steady-state fluorescence of the TRITC-SDX displaced from the immobilized antibody was recorded after 6 min. The TRITC - SDX fluorescence emission intensity was directly related to the concentration of the SDX analyte over a broad range of up to 1000 ng.mL⁻¹ with a linear range up to 500 ng.mL⁻¹ and lower detection limit of 60 ng.mL⁻¹. A technique developed to resaturate the antigen binding sites of the immobilized antibody with TRITC-labeled SDX was successful in regenerating the capillary column without affecting its performance, thus enhancing the economic viability of the immunosensor. The immunosensor was successfully applied for the determination of SDX milk and foods.

Key words: sulfonamides, immunosensor, fluorescence

ВЪВЕДЕНИЕ

През последните десетилетия, остатъци от сулфонамиди са открити в значителна концентрации в мляко и млечни храни [1,2,5]. За да се гарантира здравето на обществото, са установени максимално допустимите граници на остатъчни сулфонамиди (МДГ) в различни проби. Европейският съюз, Канада, и САЩ са определили като МДГ - 100 µg.kg⁻¹ сулфонамиди в мляко, млечни продукти и други видове храни [3,9]. От друга страна, остатъците от антимикробни вещества в млякото водят до икономически загуби в млечната промишленост, поради инхибиране на ферментационните процеси при производството на сирене, кашкавал и други млечни продукти [8].

Сулфонамидите са важна група антимикробни вещества, чиито химична структура съдържа функционален 4-аминобензенсулфонамид с различни хетероцикли, свързани към-N1 позиция на сулфонамидния мост. След пеницилините и тетрациклините, сулфонамидите намират много голямо приложение като антимикробно средство при лечение на животните. Обикновено, остатъци от сулфонамиди са анализирани в проби от мляко, черен дроб, месо, яйца и фураж. Традиционно повечето от тестовите, използвани за откриване на остатъци от антибиотици се основават на тяхната антибактериална активност. На базата на отчетеното инхибиране на растежа на микроорганизми се определя концентрацията на сулфонамидите, но тези тестове са продължителни и на тяхна основа не могат да се направят заключения относно идентификацията на антибиотика и тяхната концентрация [4]. Други методи за анализ на сулфонамиди са HPLC и GC методи [7], но това са много специфични техники, изискват продължителна подготовка на образците, специфично оборудване и квалифициран лабораторен персонал. Като алтернатива, за анализ на остатъчни антимикробни вещества в различни матрици с успех се използват имунохимични техники за откриване на антибиотици, в частност сулфонамиди в сложни биологични проби, при които се избягва продължителния етап на подготовката им.

Целта на тази статия е да се получи имунофлуоресцентен биосензор за анализ на остатъци от антибиотици, 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 се използва капилярна колонка от метилметакрилат. Функционализирането на колонката се осъществява чрез плазмена модификация в атмосфера на O_2 при налягане 1.5 Pa за 15 мин. Вследствие на модификацията на вътрешната повърхност на колонката се въвеждат кислородни радикали, които са необходими за имобилизацията на антитялото. Антитяло срещу сулфодиметоксин (Anti-SDX), (Sigma-Aldrich, USA) се имобилизира в колонката и след това се блокират незаетите активни центрове с телешки албумин (BSA), Sigma-Aldrich, USA. За приготвяне на конюгата: флуоресцентно багрило-антиген се използва тетраметилпродамин изотиоцианат (TRITC), (Sigma-Aldrich, USA) и сулфодиметоксин, (SDX), (Sigma-Aldrich, USA).

2. Получаване на конюгат: сулфодиметоксин – TRITC (SDX–TRITC).

TRITC (10 mg в 240 μ L диметилформамид) се прибавя към разтвор на сулфодиметоксин (20 mg в 240 μ L вода) и се разбърква на тъмно в продължение на 1 нощ при стайна температура. Полученият конюгат се пречиства чрез HPLC.

3. Иmobилизация на антитялото Anti-SDX към активираната капилярна колонка.

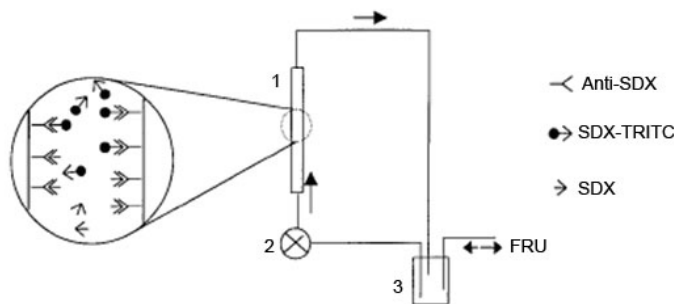
Разтвор на Anti-SDX (40 μ g.mL⁻¹) се пропуска през колонката в продължение на 3 часа при стайна температура. След това колонката се промива с фосфатен буфер, (PBS, pH 7.5), с цел отстраняване на всички несвързани антитела. Незаетите с антитялото сайтове се блокират чрез циркулиране на 0.5% разтвор на BSA в продължение на 1 час. Количеството на свързаното антитяло по вътрешната повърхност на колонката се определя по метода на Lowry et al. [6].

4. Насищане на Anti-SDX -сайтовете на колонката с конюгат.

Антиген-специфичните сайтове на имобилизираните антитела, се насищат с разтвор на конюгат (30 μ g.mL⁻¹), циркулиращ в продължение на 5 часа при 20 °C. След това колонката се промива с PBS буфер, pH 7.5, до отсъствие на флуоресценция в промивния буфер.

5. Имунологичен анализ.

На фигура 1 е показана експерименталната схема на биосензора, използвана в този експеримент. Тя се състои от наситена с Anti -SDX конюгат колонка с размери: вътрешен диаметър - 0.8 mm и дължина – 200 mm; съд за пробата (контейнер) и перисталтична помпа (EVA-помпа, Eppendorf, Медисън, Уисконсин), чрез която циркулира работния разтвор.



Фигура 1. Експериментална схема на флуоресцентния биосензор: 1-капилярна микроколонка, 2 - перисталтична помпа, 3 - проба.

Експериментът започва с пропускане на буфер (PBS, pH 7.5) за промиване на колонката. Промиването продължава до отсъствие на флуоресценция (λ 572 nm). След това през колонката се пропускат разтвори на сулфонамид с нарастваща концентрация ($10 \div 1000 \text{ ng.mL}^{-1}$). Флуоресцентният сигнал се отчита след 6 минути, тъй като това е времето необходимо за изместване на конюгата и за достигане на флуоресценцията до равновесно състояние. Аналогични експерименти са проведени и с реални проби от мляко.

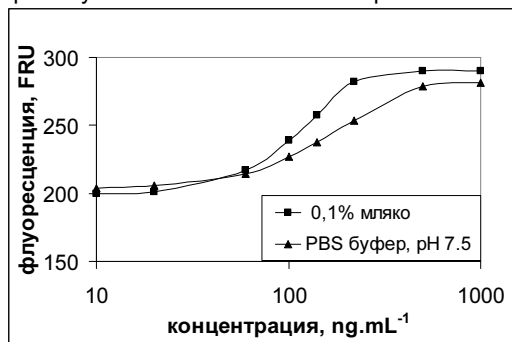
6. Регенерация на капилярната колонка

Регенерацията на колонката се осъществява чрез пропускане на 100 mL 50 mM цитратен буфер, pH 2.8, със скорост $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$, след това колонката се промива с PBS буфер pH 7,5 и накрая се насища с конюгат по метода, описан по-горе.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Като носител за провеждане на имобилизацията на Anti-SDX се използва функционализирана чрез плазмена полимеризация капилярна колонка от полиметилметакрилат. Количеството на имобилизираното анти тяло по вътрешната и повърхност е 0.259 mg . Антиген-свързващите сайтове на Anti-SDX са наситени с конюгат: SDX-TRITC. Антигенът съдържащ проби от сулфодиметоксин с нарастващи концентрации от 10 до 1000 ng.mL^{-1} се пропуска да циркулира през колонката. Отчита се флуоресценцията на измественият от антигена конюгат от сайтовете на имобилизираното анти тяло. На Фигура 2 е представена графичната зависимост между концентрацията на антибиотика сулфодиметоксин и флуоресцентния сигнал на биосензора. Установен е линеен интервал на калибровачната крива при концентрации на сулфодиметоксина от 60 до 500 ng.mL^{-1} , ниска определяема лимитна концентрация – 60 ng.mL^{-1} и висок корелационен коефициент $R=0.926$ ($n=5$).

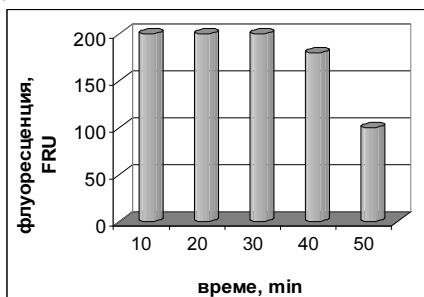
Изготвеният имунобиосензор е приложен и за определяне на сулфодиметоксини в реални проби от мляко (Фигура 2). В този случай установеният линеен интервал е по-малък: от 100 до 250 ng.mL^{-1} , но е получен по-висок корелационен коефициент $R=0.979$ ($n=5$). Наклонът на линейната област е по-голям, което показва по-добрата чувствителност на биосензора за анализ на реални проби.



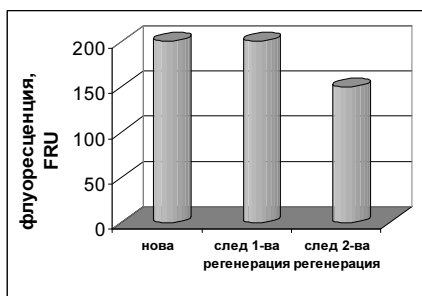
Фигура 2. Калибрационна крива на стандартни разтвори на SDX в PBS буфер (pH 7,5) и в мляко.

Важна характеристика на един биосензор е неговата операционна стабилност и възможността му за повторна употреба (регенерация). Операционната стабилност на полученият имунобиосензор е определена чрез измерване на флуоресцентния сигнал след многократно пропускане на сулфодиметоксин с концентрация 60 ng.mL^{-1} . Като е илюстрирано на Фигура 3, флуоресцентният отговор е стабилен за

първите три измервания, след това намалява, като на 50 min запазва 50% от първоначалния си сигнал.



Фигура 3. Операционна стабилност на имунофлуоресцентния биосензор по отношение на SDX



Фигура 4. Регенерация на имунофлуоресцентния биосензор по отношение на SDX

Възможността за повторна употреба на антителата, фиксирани по вътрешната повърхност на капилярната колона е желателно тъй намалява разходите за анализа в значителна степен. Направен е опит за регенерация в колонката на сайтовете за свързване със сулфодиметоксина. Установено е, че измиването на колоната с 100 mL 50 mM цитратен буфер, pH 2.8 води до разкъсване на връзката между антигена и антитялото и отделянето на сулфодиметоксина. Резултатите от регенерацията на колоната са представени на Фигура 4. Те показват, че в резултат на една такава обработка имуноаналитичната система може да функционира без значителна загуба на ефективност.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Създаден е бърз, селективен имунофлуоресцентен метод за анализ на сулфонамиди в храни. Постигнати са много ниски концентрации за измерване на сулфонамиди от 100 до 250 ng.mL⁻¹ и висок корелационен коефициент R=0.979.

ЛИТЕРАТУРА:

- [1] Brady, M. S.; Katz, S. E. Antibiotic/antimicrobial residues in milk. *J. Food Prot.* 51, 1988, 8–11.
- [2] Charm, S. E.; Zomer, E.; Salter, R. Confirmation of widespread sulfonamide contamination in northeast U.S. market milk. *J. Food Prot.* 51, 1988, 920–924.

[3] Commission Regulation (EC) no. 508/1999, *Off. J. Eur. Commun. L60*, 1999, 16–52.

[4] Korsrud, G.; Boison, J. Bacterial inhibition tests used to screen for antimicrobial veterinary drug residues in slaughtered animals. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* (81), 1998, 21–24.

[5] Larocque, L.; Carigman, G.; Sved, S. Sulfamethazine (sulfadimidine) residues in Canadian consumer milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73, 1990, 365–367.

[6] Lowry H., N. Rosenbough, H. Farr, J. Chem., 193, 1951, 265.

[7] Reeves, V. B. Confirmation of multiple sulfonamide residues in bovine milk by gas chromatography-positive chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 723 (1–2), 1999, 127–137.

[8] Schiffmann, A. P.; Schütz, M.; Wiesner, H. U. False negative and positive results in testing for inhibitory substances in milk. *Milchwissenschaft* 47 (11), 1992, 712–715.

[9] Sulfonamides (2) Summary Report, EMEA/MRL/026/95. EMEA, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products; 1995.

За контакти:

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

ас. д-р Руска Димова Ненкова, У-т „Проф.д-р Асен Златаров“, Бургас, тел.: 056/858471, e-mail: rdnenkova@abv.bg

Светла Иванова Иванова – магистър биотехнолог, У-т „Проф.д-р Асен Златаров“, Бургас, тел.: 056/858363, e-mail: your.svetli@yahoo.com

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

Докладът е рецензиран

