Високочувствителен имунофлуоресцентен анализ за определяне на сулфадиметоксин в мляко

Светла Иванова, Катя Габровска, Цонка Годжевъргова

Highsensitive immunofluorescent assay for determination of sulfadimethoxine in milk:*A fluorescent immunoassay for determination of sulfadimethoxine in milk was developed. The assay was performed using sulfadimethoxine – specific antibody immobilized on magnetic nanoparticles. Sulfadimethoxinewas conjugated with ATTO 590 and used as fluorescent labeled antigen. The fluorescent signal of the unboundsulfadimethoxine – ATTO 590 conjugate in the supernatant was measured at 584/608nm and was inversely proportional to the concentration of sulfadimethoxine in the samples.*

Key words: *Sulfadimethoxine, antibody, fluorescence, magnetic nanoparticles, milk*

ВЪВЕДЕНИЕ

В последните десетилетия употребата на антибиотици (пеницилини, тетрациклини, сулфонамиди и други) за профилактика и лечение на инфекциозни болести във ветеринарната медициназначително нараства. Наличието на остатъци от тях в млякото и животински тъкани е опасно за здравето на консуматорите и може да предизвика алергични реакции. Освен това, антибиотиците могат да инхибират бактериалната закваска при производството на млечни храни, което ще доведе до големи икономически загуби за производителите.Според европейските стандарти максимално допустимите граници на остатъчни сулфонамиди в мляко, млечни продукти и други храни са 100 µg kg $^{-1}$. Необходимо е да се разработят бързи методи с висока чувствителност за определяне на остатъци от антибиотици в храни, за да се осигури високо качество и безопасности да се гарантира здравето на хората.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Реагенти и химикали

За провеждане на имобилизацията на антитялото върху магнитните наночастици със свободни аминогрупи(МНЧ–NH_2)и на имуноанализа са използвани следните реактиви: натриева сол на сулфадиметоксин (SDM) от Fluka; N-(3-диметиламинопропил)-N-етилкарбодиимид хидрохлорид (EDC) отFluka; ATTO 590 отSigma-Aldrich;поликлонално антитяло срещу сулфадиметоксин от Abcam;протеин А от Staphylococcus aureusот Diagnostic Consulting Network;N, N-диметилформамид (DMF),говежди серум албумин (BSA),Tween 80 иглутаров алдехид (GA) от Sigma-Aldrich.

Получаване на SDM-ATTO 590 конюгат (флуоресцентно белязан антиген)

2 mg SDM се разтварят в 0.5 mL 10mMфосфатен буфер (PB)с pH 6.0 и към тях се добавят 1.9 mg EDC.След пълното им разтваряне се добавят на капки 0.2mg ATTO 590, предварително разтворени в 50 µL DMF. Реакцията се извършва на тъмно в продължение на 1 час при стайна температура и разклащане(250 об/мин), след което се оставя цяла нощ при 4 ˚C. Полученият конюгат се пречиства чрез гел филтрация през Sephadex G-10 и чистотата му се доказва чрез високоефективна течна хроматография.Конюгатът се лиофилизира преди съхранение при – 20 ˚C.

Активиране на МНЧ–NH_2с глутаров алдехид

200 µL (25 mg/ml) МНЧ–NH_2 [1]се поставят в 1.5 mL микроцентрофужни епруветки, магнитните частици се отделят на дъното, супернатантата се отстраняваи към частиците се добавя 1 mL 5 % GAразтворен в 10mM PB (pH 8.0). Активирането се извършва на стайна температура в продължение на 4 часа при разклащане. Активираните МНЧ се промиват с 6x1 mL10 mM PB (pH 8.0) и се суспендират в 1 mL10 mMцитратен буфер (CB) с pH 5.0.

Ориентирана имобилизация на анти-сулфадиметоксин антитяло върху МНЧ

Разтворът на активираните МНЧ се сонифицира 10 мин на ултразвукова вана, след което към тях се добавят 0.6 mg протеин А. Имобилизацията се извършва на стайна температура в продължение на 30 мин при разклащане. След промиване на МНЧ с 3x1 mL10 mMCB (pH 5.0) се добавя 1 mL0.5 % разтвор на BSA в същия буфер, съдържащ 0.05 % Tween 80, за да се блокират нереагиралите активни NH_2 групи. Блокирането продължава 1 час при стайна температура и разклащане. МНЧ се промиват 6x1 mL10 mM PB (pH 7.4) и се суспендират в 1 mLот същия буфер. Добавят се10 µl 2.2 mg mL^{-1}поликлонално антитяло срещу сулфадиметоксин и реакционната смес се инкубира 1 час на стайна температура, след което се оставя цяла нощ при 4 ˚C. Накрая, МНЧ се промиват 3x1 mL 10 mM PB (pH 7.4) и се суспендират в 1 mLот същия буфер до крайна концентрация 5 mg mL^{-1}.

Имунологичен анализ

Към 75 µL МНЧ с имобилизирано антитяло се прибавят 50 µL стандартен разтвор на SDM (с концентрация 10 – 1000 $ngmL^{-1}$), приготвен в 10 mM PB (pH 6.0). Реакционната смес се инкубира 15 мин при 37 ˚C и разклащане с цел свързване на SDM към антитялото. Следва прибавяне на 100 µLSDM – ATTO 590 и инкубиране на реакционната смес за още 15 мин при същите условия с цел свързването му към незаетите антиген-свързващи сайтове на антитялото.Измерва се интензитетът на флуоресценцията в супернатантата (584/608nm) след довеждане на обема до 500 µL. Интензитетът на флуоресцентния сигнал на несвързания белязан антиген(SDM – ATTO 590) е обратнопропорционален на концентрацията на антигена (SDM) в пробата.

За да се докаже приложимостта на метода за анализ на проби в млечната промишленост, същият експеримент се провежда и за определяне на SDM в мляко.

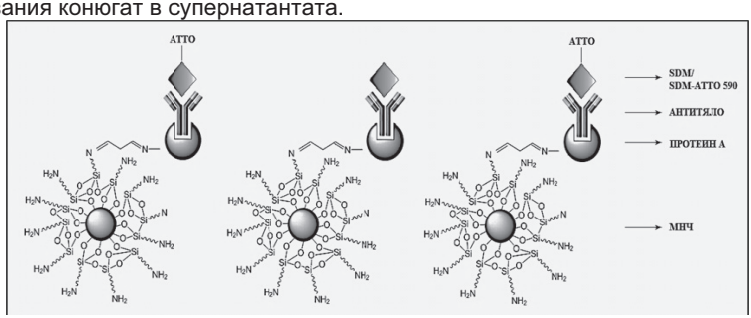
Нормализираният флуоресцентен сигнал (B/B_0) се изчислява чрез следното уравнение:

$$B/B_o = (Flu_o - Flu_n)/(Flu_o - Flu_1) \times 100, \% \quad (1)$$

където Flu_oе флуоресцентният сигнал на изходния разтвор на белязания антиген,Flu_n - флуоресцентният сигнал на разтвора съдържащSDM или на млечната проба,Flu_1- флуоресцентият сигнал на разтвора в отсъствието на SDM.

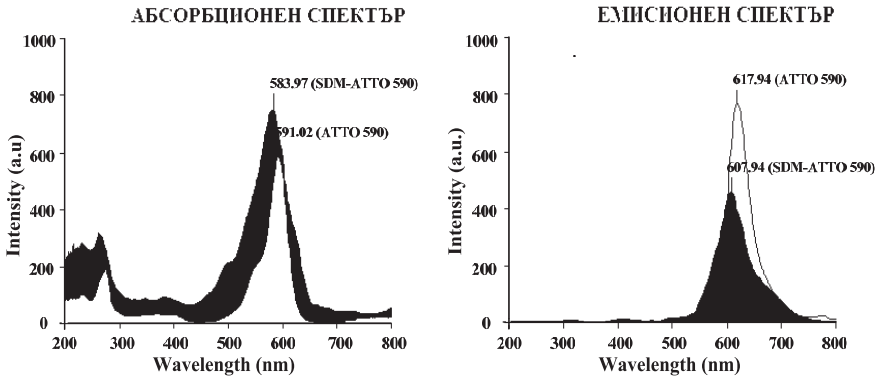
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Методът за определяне на SDM се основава на принципа на индиректен флуоресцентен имуноанализ (фигура 1). Небелязаният антиген (SDM) се състезава с флуоресцентно белязания антиген (SDM – ATTO 590) за свързване към ограничен брой антиген-свързващи сайтове на имобилизираното антитяло.Детекцията се извършва чрез измерване на интензитета на флуоресцентния сигнал на несвързания конюгат в супернатантата.



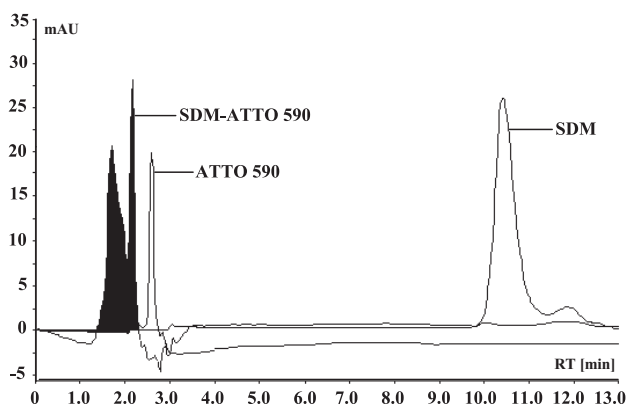
Фигура 1. Принцип на конкурентното свързване на SDM и SDM – ATTO 590 към имобилизираното антитяло

На фигура 2 са представени абсорбционният и емисионният спектри на конюгата сравнени с тези на чистото багрило. Вижда се, че има слабо изместване на пиковете на двата спектъра на конюгата към по-нискидължини на вълната в сравнение със спектрите на багрилото (от 591/618 на 584/608 nm). Затова детекцията нафлуоресцентния сигнална конюгата се извършва при 608nm след облъчване при 584 nm.



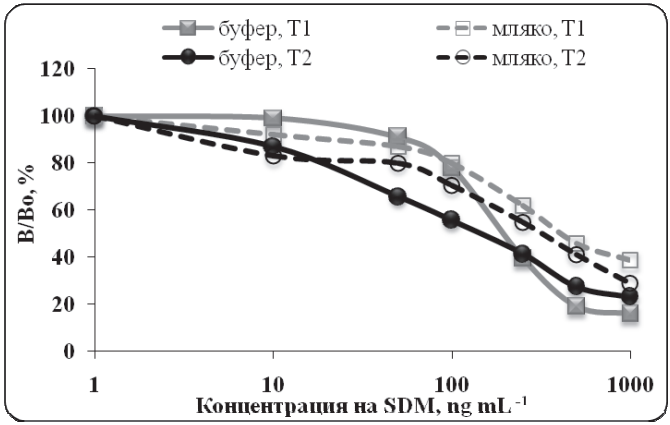
Фигура 2. Абсорбционен и емисионен спектър на ATTO 590 и SDM – ATTO 590 в 10 mM PB (pH 7.4)

Чистотата на получения конюгат е проверена чрез високоефективна течна хроматография (HPLC). 20 µL конюгат (разтворен в мобилната фаза) се инжектира и пропуска през Nucleosil® 100–5 C18 колона със скорост 1 mL min $^{-1}$. Съставът на мобилната фаза е 0.1M цитратен буфер (pH 5.0):ацетонитрил в съотношение 80:20 (v/v). На фигура 3е представена хроматограма на SDM – ATTO 590, която е сравнена с хроматограмите на SDM и ATTO 590, получени при същите хроматографски условия. Времената на задържане (RT, min) на чистия антибиотик, флуоресцентното багрило и конюгата са съответно 10.77, 2.52 и 2.00 мин.



Фигура 3. HPLC хроматограма на SDM, ATTO 590 и SDM – ATTO 590 конюгат;UV детекция съответно при 270, 584 и 591nm

Като носител за имобилизацията на поликлоналното антитяло срещу сулфадиметоксин са използвани МНЧ със свободни аминогрупи, получени чрез копреципитация на Fe^{2+}и Fe^{3+}и последващо силанизиране [1]. Имобилизацията на антитялото към активираните МНЧ се извършва чрез протеин А (ориентирана имобилизация), т.к. беше доказано, че този вид свързване осигурява по-добра активност на антитялото и съответно по – добра селективност и чувствителност на анализа в сравнение с директната имобилизация[1]. Определено е количеството на антителата имобилизирани към МНЧ (0.021 mg на mg МНЧ)по метода на Лоури [2]. Построена е графичната зависимост между концентрацията на SDM и нормализирания флуоресцентен сигнал на биосензора. Резултатите от определянето на SDM в PB буфер (pH 6.0) и мляко при 37 ˚C са представени на фигура 4и са сравнени с резултатите от провеждането на същия анализ при 20 ˚C.



Фигура 4. Калибрационна крива на SDM в мляко и буфер при 20 (T1) и 37 ˚C (T2)

От фигурата се вижда, че при провеждане на имунореакциятапри 37 ˚C могат да се определят по-ниски концентрации на SDM. Така при анализа на SDM в PB буфер (pH 6.0) при 37 ˚C най-ниската коцентрация, която се измерва е 10 ng mL^{-1}, докато при 20˚Стя е 100ng mL^{-1}. Подобно поведение се забелязва и при определяне концентрацията на SDM в мляко, но най-ниската концентрация при 37˚C е 50ng mL^{-1}, а при 20 ˚C тя се запазва същата - 100ng mL^{-1}. На табл. 1 са представени линейните концентрационни интервали на четирите анализа и уравненията на линейната област.

Таблица 1. Линейност и чувствителност на калибрационните прави за определяне на SDM в буфер и мляко при 20 и 37 ˚C

	Линейнаобласт, ng mL^{-1}	Уравнениена линейнатаобласт	R^2	LOD, ng mL^{-1}
Буфер при 20 ˚C	100 - 500	y = -36.75ln(x) + 245.65	0.9911	95
Мляко при 20 ˚C	100 - 500	y = -21.1ln(x) + 177.51	0.9984	95
Буфер при 37 ˚C	10 - 500	y = -15.02ln(x) + 123.23	0.9935	5
Мляко при 37 ˚C	50 - 1000	y = -17.3ln(x) + 148.99	0.9969	48

Установено е, че по-големи линейни концентрационни интервали са получени при имуноанализа проведен при 37˚C, но чувствителността на анализа на SDM в PB буфер (pH 6.0) е два пъти по-ниска в сравнение с чувствителността на имуноанализа проведен при 20˚C. При анализа на SDM в мляко, чувствителността на анализите при двете температури е много близка.В същата таблица са посочени лимитните концентрациина SDM и корелационните коефициенти.Получените високи корелационни коефициенти са гаранция, че и четирите анализа са точни.Стойностите за лимитните концентрации показват, че имуноанализът проведен при 37 ˚C може да измери 20 пъти по-ниски концентрации SDM в PB буфер (pH 6.0) и 2 пъти по-ниски концентрации SDM в мляко в сравнение с имуноанализа при 20˚C.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Създаден е чуствителен имунофлуоресцентен анализ на сулфонамиди в мляко на базата на имобилизирано антитяло върху магнитни наночастици, с ниска откриваема концентрация, с висока чуствителност и голям измерваем концентрационен интервал.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Gabrovska, K.; Ivanova, S.; Ivanov, Y.; Godjevargova, Tz.; Anal. Lett. 46, 2013, 1537 – 1552.

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

Законтакти:

Светла Иванова Иванова – редовен докторант, У-т „Проф.д-р Асен Златаров“,Бургас, тел.: 056/704508, e-mail: your.svetli@yahoo.com

Доц. д-р Катя Иванова Габровска, У-т „Проф.д-р Асен Златаров“, Бургас, тел.: 056/716348, e-mail: gabrovska@mail.bg

Проф.дтн Цонка Иванова Годжевъргова,У-т „Проф.д-р Асен Златаров“, Бургас, тел.: 056/716528, e-mail:godjevargova@yahoo.com

Докладът е рецензиран