

УДК 31.23.25:62.41.99:65.63.01

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ЭКСПРЕССНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМПИЦИЛЛИНА В МОЛОКЕ И КИСЛО-МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ

© 2011 г. Н. А. Бызова, Е. А. Зверева, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071

e-mail: nbyzova@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 16.05.2011 г.

Разработан иммунохроматографический метод определения β -лактамного антибиотика ампициллина. Метод основан на конкурентном взаимодействии молекул антибиотика, содержащихся в пробе, и иммобилизованного на мембране конъюгата пенициллин-белок со специфическими антителами, мечеными коллоидным золотом, которое происходит при движении вдоль мембраны реагентов и тестируемой пробы. Комплектация тест-системы обеспечивает контроль превышения предельно допустимого содержания антибиотика в молоке и молочных продуктах – 10 нг/мл. Показана возможность тестирования молока-сырья, молочных и кисло-молочных продуктов в течение 10 мин при комнатной температуре без пробоподготовки.

В настоящее время антибиотики широко используются как для борьбы с заболеваниями человека, так и для профилактики и лечения болезней животных. Существенным фактором риска становятся контаминация антибиотиками пищевых цепей и их нетерапевтическое поступление в организм человека с продуктами питания, которое может вызывать развитие устойчивых форм микроорганизмов, дисбактериозы, аллергические реакции, подавление активности некоторых ферментов и т.д. [1–5]. В связи с этим содержание антибиотиков является важным параметром при оценке безопасности продуктов питания. Для контроля антибиотиков наиболее интенсивно используются микробиологические и химические методы [4].

Микробиологическое тестирование основано на подавлении антибиотиками, содержащимися в пробе, роста тестового микроорганизма (обычно это стрептококки, микрококки или спорообразующие аэробы) или синтеза этим микроорганизмом определенного фермента. Добавление тестового микроорганизма к образцам молока может вызвать сдвиг pH, контролируемый растворами лакмуса, бромкрезолового пурпурного и др., и окислительно-восстановительные реакции, ход которых тестируют с помощью метиленового синего или трифенилтетразолия [6–9]. Хотя микробиологические методы дают адекватную информацию о содержании в пробе физиологически активных молекул антибиотиков, их реализация требует длительного времени и накладывает ограничения на помещение, в котором ведется работа с микроорганизмами.

Альтернативой микробиологическим являются химические методы тестирования. Для детекции антибиотиков различных классов разработаны раз-

нообразные методы, основанные, как правило, на хроматографии с масс-спектрометрией или капиллярном электрофорезе [10–13]. Несмотря на низкие пределы обнаружения (до 0.1 нг/мл), эти методы обладают существенными недостатками. Для их реализации необходимо сложное дорогостоящее оборудование и квалифицированный персонал. К тому же хроматографический анализ довольно трудоемок, т.к. предполагает многоэтапную пробоподготовку – экстракцию, концентрирование и др. Эти факторы определяют высокую себестоимость тестирования и невозможность применения данных методов для широкого мониторинга.

С учетом вышеизложенного основные требования, предъявляемые к разрабатываемым новым методам определения антибиотиков, заключаются в минимальной трудоемкости и соответствии рабочих диапазонов предельно допустимым концентрациям контаминантов в продуктах питания. Эти условия выполняются при переходе к иммуноаналитическим методам. Применение антител обеспечивает высокую селективность анализа, а их мечение – усиление сигнала и возможность выявления низких концентраций антибиотиков-антигенов. В настоящее время иммуноаналитические методы успешно применяются для решения разнообразных практических задач, прежде всего в медицинской и ветеринарной диагностике [14–16], что свидетельствует об их перспективности и для целей контроля пищевых продуктов.

Традиционный микропланшетный иммуноферментный анализ (ИФА), наиболее интенсивно используемый иммуноаналитический метод [17–20], в силу диффузионных ограничений длится около 2 ч. Возможность использования иммунохимиче-

ских подходов существенно увеличило в последние годы число альтернативных форматов с временем анализа 10–20 мин [14, 21, 22]. Из различных форматов иммуноанализа наибольший интерес для экспрессного мониторинга представляет иммунохроматография, в которой все специфические реакции и формирование детектируемого сигнала инициируются контактом тест-полоски с пробой и не требуют вспомогательных реагентов, приборов, дополнительных манипуляций и т.п. [23, 24]. Однако для реальных проб анализ часто требует некоторого методического усложнения, т.к. нативная проба может плохо перемещаться по тест-полоске или препятствовать иммунохимическим взаимодействиям. Так, при тестировании проб молока обычно рекомендуется помещение тест-полосок в термостат с температурой от 45 до 56°C [www.charm.com].

Ранее нами был реализован иммунохроматографический анализ (ИХА) хлорамфеникола [25] и стрептомицина [26] без предобработок и инкубации, что достигалось за счет сочетания параметров антител, коллоидных частиц и мембран.

Цель исследования – разработка и характеристика экспрессного ИХА для ампициллина – представителя широко распространенного класса антибиотиков – β -лактамов.

МЕТОДИКА

При разработке тест-системы были применены моноклональные антитела против β -лактамовных антибиотиков и конъюгат пенициллин – бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы “DCN” (США). Также использовали антитела козы (GAMIss), кролика (RAMIss) и овцы (SAMIss) против IgG мыши и антитела овцы (SARIss) против IgG кролика (“Имтек”, Россия), антитела козы (GAMI) против IgG мыши (“Arista Biologicals”, США), конъюгат антител быка против IgG мыши с пероксидазой (“Медгамал”, Россия), ампициллин, пенициллины G и V, амоксициллин, клоксациллин, хлорамфеникол, стрептомицин, гентамицин, канамицин, тетрациклин, рифампицин, сульфаниламид, трис, Тритон X-100, дигидрохлорид 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, азид натрия (“Sigma”, США), неомицин, цефалексин, ципрофлоксацин, сульфаквиноксамин, сульфаметоксипиридазин, золотохлористоводородная кислота (“Fluka”, Германия), Твин-20, БСА, цитрат натрия, диметилсульфоксид (ДМСО, “MP Biomedicals”, Великобритания), глицерин, NaCl, K₂CO₃ (“Диаэм”, Россия), Na₂CO₃, NaHCO₃, KH₂PO₄, KOH (“Химмед”, Россия). Все вспомогательные реагенты (соли, кислоты, щелочи, органические растворители) были аналитической или химической чистоты.

Растворы для получения коллоидного золота (КЗ) и его конъюгатов готовили на воде, деионизи-

рованной с помощью установки Milli-Q (“Millipore”, США).

Исходные растворы антибиотиков (1–5 мг/мл в 50 мМ цитратном буфере, pH 6.4) готовили в день эксперимента, кроме хлорамфеникола, рифампицина, сульфаниламида и сульфаквиноксамина. Исходные растворы хлорамфеникола в этаноле, рифампицина в ДМСО, сульфаниламида и сульфаквиноксамина в метаноле использовали как свежеприготовленные, так и хранившиеся при 4°C до 1 мес.

ИФА проводили в 96-луночных прозрачных полистироловых микропланшетах Costar 9018 (“Corning Costar”, США). Для изготовления иммунохроматографических тест-полосок использовали мембраны из набора mdi Easypack (“Advanced Microdevices”, Индия), включавшего рабочую мембрану, закрепленную на твердой основе, подложку для коллоидного конъюгата, мембрану для нанесения пробы, конечную адсорбирующую мембрану и защитную ламинирующую пленку.

Конкурентный ИФА ампициллина. Конъюгат пенициллин–БСА в концентрации 2 мкг/мл в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 7.4, с 0.1 М NaCl (ФБС) иммобилизовали из объема 100 мкл в лунках микропланшета в течение ночи при 4°C. Затем четырехкратно отмывали микропланшет ФБС с 0.05% Тритона X-100 (ФБСТ). Далее в лунки микропланшета вносили по 50 мкл раствора ампициллина (интервал концентраций от 1 мкг/мл до 10 пг/мл) в ФБСТ и добавляли по 50 мкл специфических антител в концентрации 0.02 мкг/мл в ФБСТ. Микропланшет инкубировали 1 ч при 37°C, затем четырехкратно отмывали ФБСТ, добавляли в лунки по 100 мкл иммунопероксидазного конъюгата (разведение 1 : 6000 в ФБСТ) и снова инкубировали 1 ч при 37°C. После отмывки (трижды ФБСТ и один раз – дистиллированной водой) определяли пероксидазную активность связавшейся с носителем ферментной метки. Для этого в лунки микропланшета вносили по 100 мкл 0.4 мМ раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в 40 мМ Na-цитратном буфере, pH 4.0, с 3 мМ H₂O₂, инкубировали 15 мин при комнатной температуре, останавливали реакцию добавлением 50 мкл 1 М H₂SO₄ и измеряли D_{450} .

В иммуноферментных экспериментах по характеристике специфичности антител вместо ампициллина использовали пенициллины G и V, амоксициллин и клоксациллин в концентрациях от 10 мкг/мл до 1 нг/мл.

Зависимости оптической плотности (y) от концентрации антигена в пробе (x) аппроксимировали 4-параметрической сигмоидной функцией $y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D$ с помощью программного обеспечения Origin 7.5 (“OriginLab”, США). Значение параметра C соответствует концентрации антигена, ингибирующей связывание антител на 50%

(IC₅₀). Концентрацию антигена, вызывающую 10%-ное ингибирование (IC₁₀), рассчитывали с использованием той же функции и рассматривали, как предел обнаружения анализа.

Получение КЗ цитратным методом [25, 27]. К 97.5 мл деионизированной воды добавляли 1.0 мл 1%-ного раствора H₂AuCl₄, доводили до кипения и при перемешивании добавляли 1.5 мл 1%-ного раствора цитрата натрия. Смесь кипятили еще 25 мин, затем охлаждали и хранили при 4–6°C.

Просвечивающая электронная микроскопия. Препараты КЗ наносили на сеточки (300 меш., “Pelco International”, США), покрытые пленкой-подложкой из поливинилформала, растворенного в хлороформе. Снимки получали на электронном микроскопе CX-100 (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении 3300000. Фотографии в цифровой форме анализировали в программе Image Tool.

Получение конъюгатов КЗ с антителами. Предварительную характеристику связывания антител с КЗ проводили по рекомендациям [28]. С этой целью к 0.1 мл растворов антител в воде (концентрацию варьировали от 5 до 250 мкг/мл) добавляли по 1.0 мл раствора КЗ ($D_{520} = 1.0$), перемешивали и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем в каждую пробу добавляли по 0.1 мл 10%-ного NaCl, перемешивали и через 10 мин измеряли D_{580} .

Перед конъюгацией с КЗ антитела диализовали против 1000-кратного объема 10 мМ трис-НСl-буфера, рН 8.5, в течение 2 ч при 4°C. К раствору КЗ ($D_{520} = 1.0$) добавляли 0.2 М K₂CO₃ до достижения рН 8.5 и вносили в раствор антител выбранной концентрации. Смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре и перемешивании, после чего вносили БСА до конечной концентрации 0.25%. Частицы КЗ с иммобилизованными на них антителами отделяли от непрореагировавших антител центрифугированием при 8000 g в течение 30 мин. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали в ФБС, содержащем 0.25% БСА. При необходимости длительного хранения к полученному продукту добавляли NaN₃ до конечной концентрации 0.02%.

Изготовление иммунохроматографических тест-систем [25]. Нанесение реагентов на мембраны, входящие в состав тест-системы, проводили с помощью автоматического диспенсера IsoFlow (“Image Technology”, США). Конъюгат КЗ с антителами наносили на подложку в разведении, соответствующем $D_{520} = 2.0$ (32 мкл на 1 см ширины подложки). Для формирования аналитической зоны использовали конъюгат пенициллин–БСА (0.2 мг/мл в 0.2 М карбонатном буфере, рН 9.6), контрольной зоны – антитела козы против IgG мыши (GAM1, 0.25 мг/мл в ФБС). Оба раствора стабилизировали и наносили по 2.0 мкл на 1 см ширины

рабочей мембраны. Полученные подложки и рабочие мембраны сушили на воздухе при 20–22°C не менее 20 ч. Собирали мультимембранный композит, из которого с помощью автоматического гильотинного нарезчика Index Cutter-1 (“A-Point Technologies”, США) получали полоски шириной 3.5 мм. Эти тест-полоски с силикагелем в качестве осушителя герметично упаковывали в пакеты из ламинированной алюминиевой фольги с помощью запаивателя с миниконвейером FR-900 (“Wenzhou dingli packing machinery”, Китай). Нарезку и упаковку проводили при 20–22°C в специальном помещении с относительной влажностью воздуха не более 30%.

Приготовление проб молока-сырья, молочных и кисло-молочных продуктов. Коровье молоко жирностью от 0.5 до 6.0%, кефир жирностью 1.0%, простоквашу жирностью 3.2% и питьевой фругурт жирностью 1.5% покупали в розничной торговой сети; цельное коровье молоко-сырье было предоставлено Е.А. Юровой (ВНИИ молочной промышленности РАСХН). В пробы добавляли разные количества антибиотиков и перемешивали. Пробы готовой молочной и кисло-молочной продукции анализировали иммунохроматографическим методом без пробоподготовки, а цельное молоко-сырье перед тестированием разбавляли дистиллированной водой в соотношении 3 : 1 (об./об.).

ИХА и регистрация его результатов. Анализ проводили при комнатной температуре. Вскрывали пакет, извлекали тест-полоску и в вертикальном положении ее нижний конец погружали на 1 мин в аликвоту пробы (50 мкл), после чего помещали тест-полоску на горизонтальную поверхность. Через 10 мин после начала анализа контролировали результат, получая цифровое изображение тест-полоски на сканере Bear Paw 4800TA pro (“Mustek”, Тайвань) и рассчитывая интегральную интенсивность окрашивания аналитической и контрольной зон, как описано в работе [29].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и характеристика иммунореагентов, используемых в ИХА. Аналитические возможности коммерческих иммунореагентов были предварительно охарактеризованы методом ИФА. Как следует из полученной в оптимизированных условиях градуировочной кривой ИФА (рис. 1), моноклональные антитела в сочетании с конъюгатом гаптен–белок позволяют определять ампициллин в концентрациях вплоть до 0.05 нг/мл. Отметим, однако, что при визуальном контроле результатов конкурентного иммунохроматографического анализа регистрируемое исчезновение окрашивания в аналитической зоне соответствует выходу градуировочной кривой на нижнее, а не на верхнее плато. Применительно к микропланшетному ИФА данный эффект достигался при концентрации ампициллина, равной 10 нг/мл. Эта величина соответ-

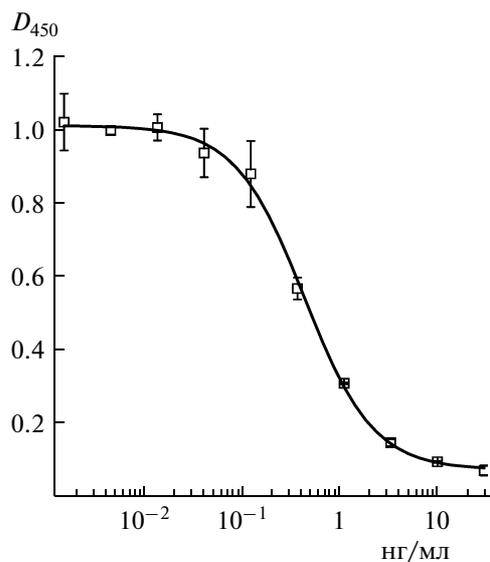


Рис. 1. Определение ампициллина в буфере методом конкурентного ИФА. Параметры аппроксимирующей кривой: $A = 1.00996$; $D = 0.07089$; $C = 0.43601$; $B = 1.23197$.

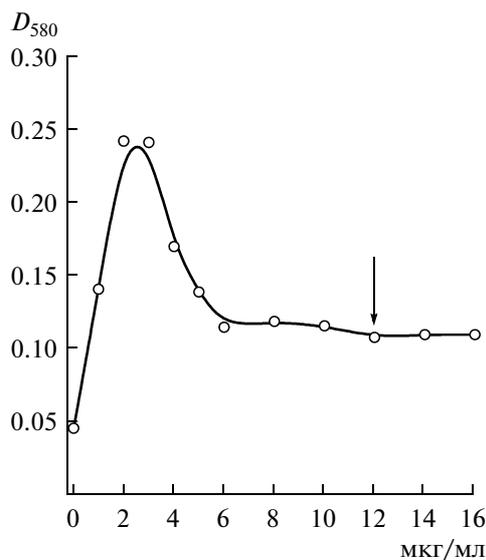


Рис. 2. Определение концентрации (мкг/мл) специфических антител, используемой для конъюгации с КЗ. Нулевой уровень D_{580} соответствует раствору КЗ без антител и без добавления 10%-ного NaCl. Выбранная концентрация антител (12 мкг/мл) отмечена стрелкой.

стует предельно допустимому содержанию ампициллина в молоке и молочных продуктах [СанПиН 2.3.2.1078–01] и позволяет рекомендовать реагенты для разработки экспрессных аналитических систем. Действительно, в наших предыдущих экспериментах порог распознавания положительных и отрицательных образцов в иммунохроматографии и выход градуировочной кривой ИФА на нижнее плато соответствовали практически равным концентрациям определяемого соединения [30].

Антитела характеризовались специфичностью к ампициллину (100%) и цефалексину (150%) и низкой перекрестной реактивностью по отношению к другим бета-лактамам: пенициллин G – 0.05%, пенициллин V – 0.04%, амоксициллин – 0.07%, клоксациллин – 0.03%.

КЗ получали по методу Френса [27]. Электронная микроскопия показала высокую степень однородности частиц по размерным характеристикам [25]. Среднее значение максимальной оси составило 37 ± 8 нм, минимальной оси – 30 ± 5 нм. Таким образом, частицы характеризовались средним диаметром 34 нм, что соответствует общепринятым рекомендациям по оптимальному размеру КЗ для иммунохроматографии – 30–40 нм [31]. Для полученных частиц адсорбционная иммобилизация позволила сформировать монослой, содержащий до 180 молекул антител на одну частицу коллоидного золота (предположительно средняя площадь контакта равна 20 нм^2).

Выбор условий конъюгирования антител с КЗ проводили на основании фотометрических данных,

отражающих агрегацию продукта данной реакции при высокой ионной силе раствора. Полученная концентрационная зависимость (рис. 2) характеризуется ростом оптической плотности до 2.5 мкг/мл, резким спадом до 6 мкг/мл и последующим медленным спадом с выходом на плато до 12 мкг/мл. Отметим, что при концентрации антител, равной 6 мкг/мл, мольное соотношение антитела–КЗ составляет 190 : 1, т.е. практически совпадает с теоретическим пределом насыщения поверхности частиц при монослойной иммобилизации антител. Для конъюгирования выбирали, как рекомендовано в [28], концентрацию антител, на 10–15% превосходящую точку выхода D_{580} на плато, что позволяло стабилизировать поверхность коллоидной частицы антителами и предотвратить формирование агрегатов. Таким образом, при синтезе использовали антитела в концентрации 12 мкг/мл. Избыток непрореагировавших антител удаляли на стадии осаждения конъюгата.

Разработка конкурентного ИХА ампициллина. Прежде всего нами была проверена способность синтезированного конъюгата КЗ–антитела к взаимодействию в контрольной и аналитической зонах тест-полоски и выбраны оптимальные реагенты для нанесения в эти зоны.

Серия препаратов антител против IgG мыши была сопоставлена по связыванию конъюгата КЗ–антитела в ходе иммунохроматографии. При насыщающих концентрациях интенсивность окраски контрольной линии составляла для козьих антител 115 отн. ед. (GAMIss) и 133 отн. ед. (GAMI), для кроличьих антител (RAMIss) – 80 отн. ед. и для ове-

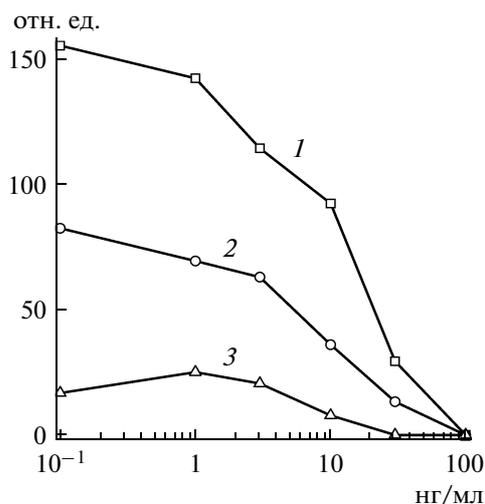


Рис. 3. Зависимость градуировочной кривой ИХА ампициллина от вида буфера, используемого при иммобилизации конъюгата пенициллин–БСА в аналитической зоне тест-полоски: 1 – 0.2 М карбонатный буфер, pH 9.6; 2 – 50 мМ фосфатный буфер, pH 7.4, с 0.1 М NaCl; 3 – 0.1 М цитратный буфер, pH 6.4.

чьих антител (SAMIss) – 95 отн. ед. Хотя отличия не очень велики, для дальнейшего использования в анализе были выбраны козы антитела GAM1 фирмы “Arista Biologicals”, обеспечивающие максимальное связывание коллоидного маркера. Оптимальная концентрация антивидовых антител при иммобилизации в контрольной зоне составила 0.25 мг/мл, соответствуя выходу на плато концентрационной зависимости связывания коллоидного конъюгата.

Для формирования аналитической зоны тест-полоски был использован конъюгат пенициллин–БСА. На первом этапе выбирали буфер, в котором конъюгат наносили в аналитическую зону. Как видно из рис. 3, интенсивности окрашивания аналитической зоны в отсутствие аналита в пробе и при насыщающей (0.5 мг/мл) концентрации конъюгата пенициллин–БСА значительно отличались: 155 отн. ед. при иммобилизации из карбонатного буфера, pH 9.6, 83 отн. ед. – из ФБС, pH 7.4 и 17 отн. ед. – из цитратного буфера, pH 6.4. Очевидно преимущество карбонатного буфера, который и был использован в дальнейшем при изготовлении тест-полосок.

Исходя из данных наших предшествующих работ [25, 26, 30], конъюгат КЗ–антитела наносили из раствора, концентрация которого соответствовала $D_{520} = 2.0$, что обеспечивало формирование интенсивно окрашенных зон в ходе анализа в сочетании с полной вымывания реагента из стартовой зоны и отсутствием неспецифического окрашивания рабочей мембраны.

Для производительного иммунохроматографического тестирования важно, чтобы изменение ка-

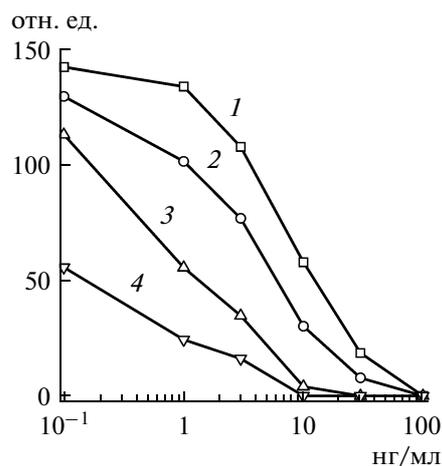


Рис. 4. Зависимость градуировочной кривой ИХА ампициллина от концентрации конъюгата пенициллин–БСА, используемой при его нанесении в аналитическую зону тест-полоски: 1–4 – концентрации раствора конъюгата пенициллин–БСА, 0.4, 0.3, 0.2 и 0.1 мг/мл соответственно.

чественного результата анализа (исчезновение окрашивания в аналитической зоне) строго соответствовало установленному контролируемому уровню содержания соединения (его предельно допустимой концентрации) и не требовало, таким образом, дополнительного разведения пробы перед тестированием в определенное число раз или ее концентрирования. Трудоемкое решение этой задачи состоит в скрининге большого числа антител, отличающихся по аффинности, что не всегда возможно. Для регулирования порога различения положительных и отрицательных проб было использовано изменение концентрации конъюгата гаптен–белок (пенициллин–БСА) при иммобилизации.

На рис. 4 представлены полученные зависимости интенсивности окраски аналитической зоны от содержания ампициллина в пробе при разных концентрациях конъюгата пенициллин–БСА. Как видим, уменьшение концентрации конъюгата при иммобилизации от 0.4 до 0.2 мг/мл позволило в 10 раз снизить предел обнаружения ампициллина (от 100 до 10 нг/мл). Дальнейшее уменьшение концентрации конъюгата пенициллин–БСА до 0.1 мг/мл приводило к существенному (в 2.5 раза) снижению амплитуды градуировочной кривой ИХА. Поэтому для иммобилизации была выбрана концентрация конъюгата пенициллин–БСА, равная 0.2 мг/мл, что обеспечивало необходимый порог детекции (10 нг/мл в соответствии с [СанПиН 2.3.2.1078–01]) при достаточной интенсивности окрашивания аналитической зоны и низком расходе реагента.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности при оптимизации иммунохроматогра-

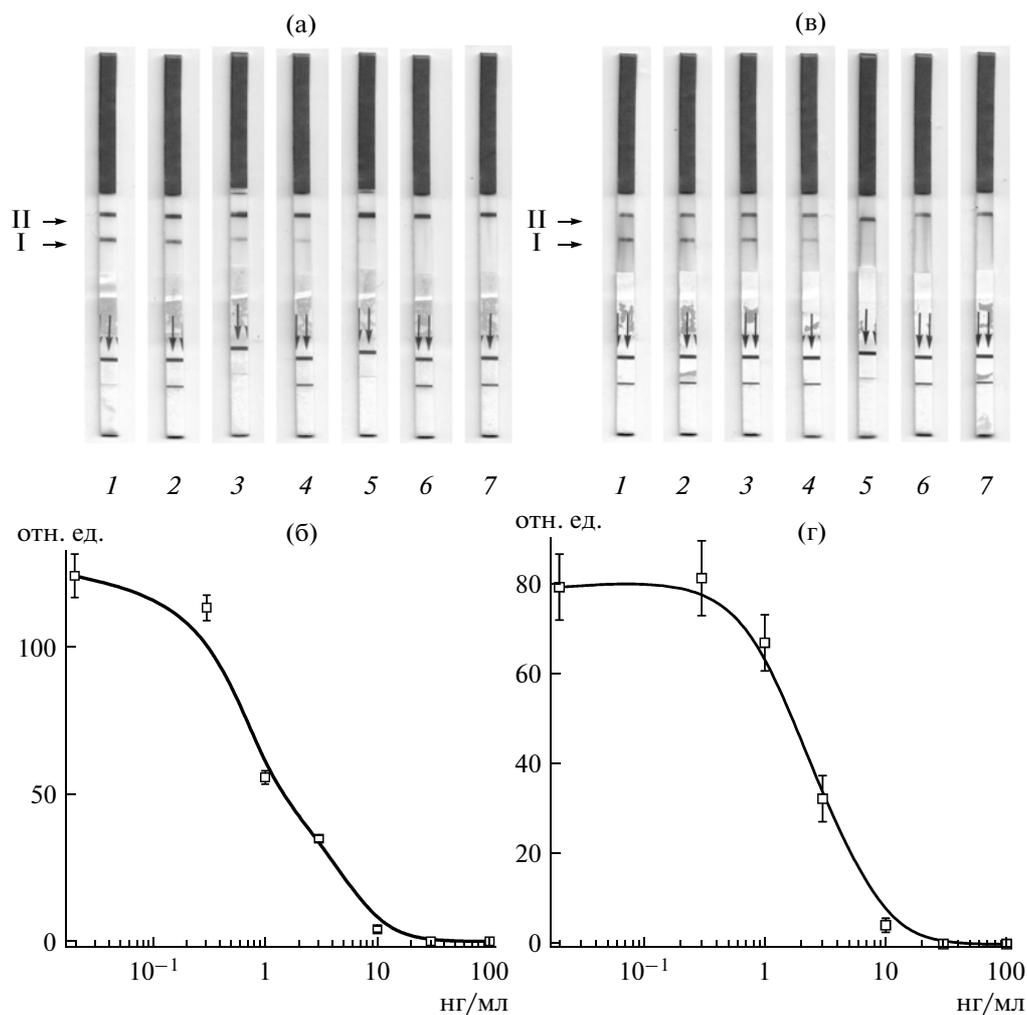


Рис. 5. Иммунохроматографическое определение ампициллина в буфере (а, б) и молоке жирностью 3.5% (в, г): а, в — внешний вид тест-полосок после проведения анализа (I — аналитическая зона, II — контрольная зона); 1–7 — концентрации ампициллина 0, 0.3, 1, 3, 10, 30 и 100 нг/мл соответственно; б, г — зависимость интенсивности окраски в аналитической зоне (отн. ед.) от концентрации ампициллина (нг/мл).

фической тест-системы на порядок сдвинуть порог различения положительных и отрицательных проб с минимальными потерями в амплитуде сигнала (и соответственно — в точности и достоверности измерений).

Характеристика разработанной иммунохроматографической тест-системы. На основе результатов оптимизации были изготовлены тест-полоски и проведены эксперименты по иммунохроматографическому контролю наличия ампициллина в стандартных растворах, молочных и кисло-молочных продуктах.

На рис. 5 представлены результаты анализа проб (ФБС и молоко жирностью 3.5%) с разной концентрацией ампициллина. При проведении ИХА исчезновение окраски в аналитической зоне соответствовало превышению предельно допустимого содержания ампициллина (10 нг/мл) в тестируемой пробе. Точность определения составляла 10%.

Через 5 мин после начала движения фронта жидкости (молока) интенсивность окрашивания аналитической зоны составляла 50% от максимума, через 7 мин — 70%, а через 10 мин — 85% (рис. 6). С учетом этого рекомендуемая продолжительность анализа равняется 10 мин.

В иммунохроматографической системе не наблюдалось перекрестных реакций с антибиотиками других групп (хлорамфеникол, стрептомицин, тетрациклин, гентамицин, неомицин, канамицин, ципрофлоксацин, рифампицин) и бактериостатиками (сульфаметоксипиридазин, сульфаниламид, сульфаквиноксамин) в концентрациях до 10 мкг/мл.

Разработанная тест-система была применена для анализа цельного молока-сырья, молочных (жирностью от 0.5 до 6.0%) и кисло-молочных продуктов (кефира жирностью 1%, простокваши жирностью 3.2% и питьевого фругурта жирностью 1.5%). Полученные результаты представлены на

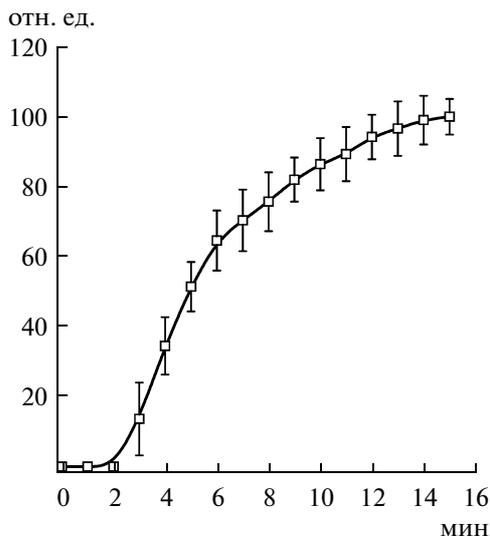


Рис. 6. Динамика окрашивания аналитической зоны в иммунохроматографической системе определения ампициллина в молоке жирностью 1.5% в отсутствие аналита.

рис. 7. Для всех испытанных проб показана возможность надежного обнаружения ампициллина с той же минимальной выявляемой концентрацией, как и в буфере — 10 нг/мл.

Отметим, что при иммунохроматографическом тестировании цельного молока-сырья уровень жидкости не поднимался вдоль тест-полоски до конца рабочей мембраны, что не позволило провести достоверную оценку результатов анализа. Предварительное разведение пробы дистиллированной водой в соотношении 3 : 1 (об./об.) исключало эти

проблемы (рис. 8), незначительно влияя на сложность и трудоемкость анализа в целом. При этом окрашивание в аналитической зоне наблюдалось для концентраций ампициллина в разбавленной пробе менее 10 нг/мл (в исходной пробе — менее 13.3 нг/мл).

Важным достоинством предложенного метода является возможность его реализации при комнатной температуре. Доступные в настоящее время мембранные тесты для определения ампициллина требуют предварительной инкубации при повышенной температуре либо образцов молока со специальными рецепторами (Twinsensor BT, “Twinsensor”, Бельгия; Beta star, “USB-Bioproductions”, США; SNAP, “IDEXX”, США), либо тест-полосок с наносенсорной пробой молока (Charm SL Beta-lactam Test, “Charm”, США). Ряд иммунохроматографических тестов для определения β -лактамных антибиотиков, таких, как PENs-204R4 (“NKVIO”, Китай), Penicillin G Rapid Test (“Quicking Biotech”, Китай), предусматривают предварительную многоступенчатую подготовку проб молока. В отличие от вышеперечисленных тестов анализ молока с помощью разработанной тест-системы может проводиться при комнатной температуре и без пробоподготовки. Важным преимуществом тест-систем является также их пригодность для контроля безопасности кисломолочных продуктов, так как для них предусмотрены те же пороговые уровни контаминации, а пригодность для этих целей коммерчески доступных тест-систем не охарактеризована.

Результаты анализа можно контролировать визуально или с использованием портативного фотометрического детектора с программным обеспечением [32]. Скорость определения и методическая

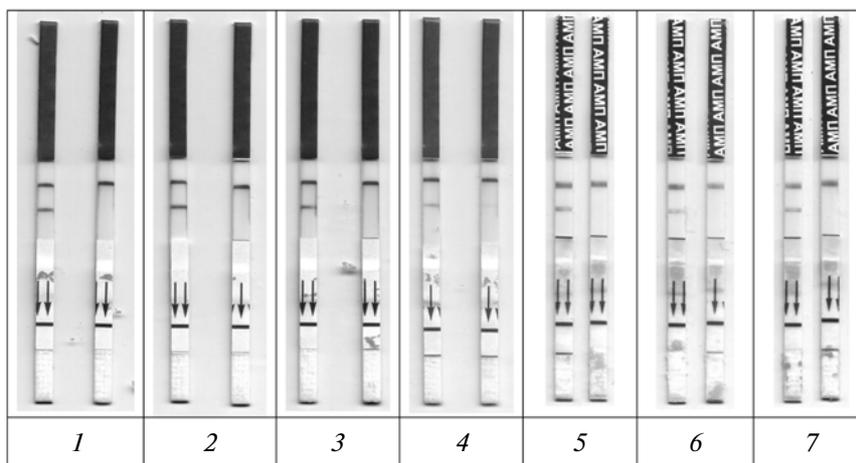


Рис. 7. Иммунохроматографическое определение ампициллина в молоке-сырье, молочных и кисломолочных продуктах: 1 — молоко-продукт жирностью 0.5%; 2 — молоко-продукт жирностью 3.2%; 3 — молоко-продукт жирностью 6.0%; 4 — цельное молоко-сырье, разбавленное перед тестированием дистиллированной водой в соотношении (об./об.) 3 : 1; 5 — кефир жирностью 1.0%; 6 — простокваша жирностью 3.2%; 7 — питьевой фругурт жирностью 1.5%. Левая тест-полоска для каждого матрикса соответствует отсутствию ампициллина в пробе, правая — присутствию ампициллина в концентрации 10 нг/мл.

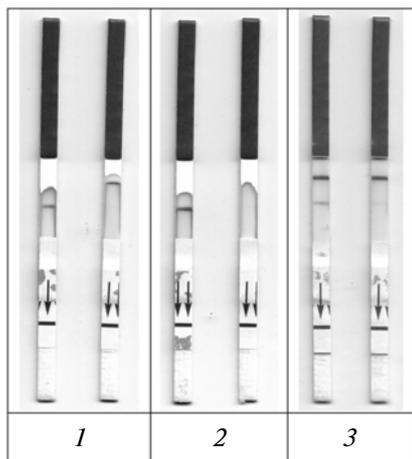


Рис. 8. Иммунохроматографическое определение ампициллина в цельном молоке-сырье (пробы 1 и 2) и молоке-сырье (проба 3), разбавленном перед тестированием дистиллированной водой в соотношении 3 : 1 (об./об.). Левая тест-полоска для каждой пробы соответствует отсутствию ампициллина, правая – присутствию ампициллина в концентрации 10 нг/мл.

простота позволяют рассматривать разработанную тест-систему как эффективное средство для массового скрининга молока-сырья, молочной и кисломолочной продукции на содержание ампициллина.

Авторы выражают признательность И.В. Сафенковой (Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН) за проведение электронно-микроскопических исследований препарата КЗ.

Работа выполнена при поддержке государственными контрактами № 02.740.11.0868 от 28.06.2010, № 14.740.11.0615 от 05.10.2010 и № 16.512.11.2125 от 25.02.2011, грантами РФФИ 09-08-01209, 11-04-91189 и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 8 “Создание и совершенствование методов химического анализа и исследования структуры веществ и материалов”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bennish M.L. // Adv. Pediatr. Infect. Dis. 1999. V. 14. P. 269–290.
- Schwarz S., Kehrenberg C., Walsh T.R. // Int. J. Antimicrob. Agents. 2001. V. 17. № 6. P. 431–437.
- Hardy B. // Animal Biotechnol. 2002. V. 13. № 1. P. 129–147.
- Chafer-Pericas C., Maquieira A., Puchades R. // Trends Anal. Chem. 2010. V. 29. № 9. P. 1038–1049.
- Kantiani L., Farre M., Barcelo D. // Trends Anal. Chem. 2009. V. 28. № 6. P. 729–744.
- Sierra D., Sanchez A., Contreras A., Luengo C., Corrales J.C., Morales C.T., de la Fe C., Guirao I., Gonzalo C. // J. Dairy Sci. 2009. V. 92. № 8. P. 3585–3591.
- Petrović J., Katić V., Bugarski D. // Food Anal. Methods. 2008. V. 1. № 2. P. 119–125.
- Comunian R., Paba A., Dupre I., Daga E.S., Scintu M.F. // J. Dairy Sci. 2010. V. 93. № 12. P. 5644–5650.
- Althaus R., Berruga M.I., Montero A., Roca M., Molina M.P. // Anal. Chem. Acta. 2009. V. 632. № 1. P. 156–162.
- Garcia-Campana A.M., Gamiz-Gracia L., Lara F.J., del Olmo Iruela M., Cruces-Blanco C. // Anal. Bioanal. Chem. 2009. V. 395. № 4. P. 967–986.
- Bailon-Perez M.I., Garcia-Campana A.M., del Olmo Iruela M., Gamiz-Gracia L., Cruces-Blanco C. // J. Chromatogr. A. 2009. V. 1216. № 47. P. 8355–8361.
- Fagerquist C.K., Lightfield A.R., Lehotay S.J. // Anal. Chem. 2005. V. 77. № 5. P. 1473–1482.
- Holstege D.M., Puschner B., Whitehead G., Galey F.D. // J. Agric. Food Chem. 2002. V. 50. № 2. P. 406–411.
- Дзантиев Б.Б., Жердев А.В. // Биохимические методы анализа. М.: Наука, 2010. С. 303–332.
- Marquette C.A., Blum L.J. // Biosens. Bioelectron. 2006. V. 21. № 8. P. 1424–1433.
- Wu A.H. // Clin. Chim. Acta. 2006. V. 369. № 2. P. 119–124.
- Martlbauer E., Usleber E., Schneider E., Dietrich R. // Analyst. 1994. V. 119. № 12. P. 2543–2548.
- Kress C., Schneider E., Usleber E. // Small Ruminant Research. 2011. V. 96. № 2–3. P. 160–164.
- Самсонова Ж.В., Щелокова О.С., Иванова Н.Л., Рубцова М.Ю., Егоров А.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 6. С. 668–675.
- Fitzgerald S.P., O’Loan N., McConnell R.I., Benchikh el O., Kane N.E. // J. AOAC Int. 2007. V. 90. № 1. P. 334–342.
- Ricci F., Volpe G., Micheli L., Palleschi G. // Anal. Chim. Acta. 2007. V. 605. № 2. P. 111–129.
- Chan C.P., Cheung Y.C., Renneberg R., Seydack M. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2008. V. 109. P. 123–154.
- Posthuma-Trumpie G.A., Korf J., van Amerongen A. // Anal. Bioanal. Chem. 2009. V. 393. № 2. P. 569–582.
- Wong R.C., Tse H.Y. Lateral Flow Immunoassay. N.Y.: Humana Press, 2009. 224 p.
- Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Dzantiev B.B. // Talanta. 2010. V. 81. № 3. P. 843–848.
- Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Svshnikov P.G., Dzantiev B.B. // Anal. Chem. Acta. 2011. doi:10.1016/j.aca.2011.06.001.
- Frens G. // Nat. Phys. Sci. 1973. V. 241. P. 20–22.
- Hermanson G.T. Bioconjugate Techniques // Amsterdam: Acad. Press, Elsevier, 2008. 900 p.
- Бызова Н.А., Сафенкова И.В., Чирков С.Н., Авдиенко В.Г., Гусева А.Н., Митрофанова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б., Атабеков И.Г. // Биохимия. 2010. Т. 75. № 11. С. 1583–1595.
- Byzova N.A., Zherdev A.V., Zvereva E.A., Dzantiev B.B. // J. AOAC Int. 2010. V. 93. № 1. P. 36–43.
- Chandler J., Gurmin T., Robinson N. // IVD Technology. 2000. V. 6. № 2. P. 37–49.
- Дзантиев Б.Б., Жердев А.В., Попов В.О., Венгеров Ю.Ю., Старовойтова Т.А., Тогузов П.Т. // Клин. лаб. диагностика. 2002. Т. 8. С. 25–31.

Immunochromatographic Technique for Express Determination of Ampicillin in Milk and Dairy Products

N. A. Byzova, E. A. Zvereva, A. V. Zherdev, and B. B. Dzantiev

Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

e-mail: nbyzova@inbi.ras.ru

Received May 16, 2011

Abstract—An immunochromatographic method for determination of β -lactam antibiotic ampicillin has been developed. The method is based on the competitive interaction between antibiotic molecules contained in the sample and protein conjugate of penicillin immobilized on a membrane for binding with specific antibodies labeled with colloidal gold, which occurs during movement of the sample to be tested and reagents along the membrane. The completion of the test system ensures control of exceeding the maximum permissible content of the antibiotic in milk and dairy products (10 ng/ml). The possibility of testing milk, raw milk, and dairy products for 10 minutes at room temperature without sample preparation has been demonstrated.