

УДК 57.083.3, 577.18

## МЕМБРАННЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ ХЛОРАМФЕНИКОЛА

Ж.В. Самсонова, М.Ю. Рубцова, Л.В. Чикишева, А.М. Егоров

*(Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; e-mail: jvs@enz.chem.msu.ru)*

**Разработан метод мембранного иммуноанализа для определения хлорамфеникола в водных растворах. Определение антибиотика может быть проведено полуколичественно (визуальная двухцветная детекция) или количественно в диапазоне концентраций 0,01–100 нг/мл (хемилюминесцентная детекция). Показаны преимущества хемилюминесцентной детекции по сравнению с колориметрической, заключающиеся в более низком пределе обнаружения (0,02 и 7 нг/мл хлорамфеникола соответственно) и более широком диапазоне определяемых концентраций.**

В современном мире антибиотики широкого спектра действия применяют не только для лечения многочисленных инфекционных заболеваний у людей, но также и для профилактики массовых заболеваний животных [1]. Для этого их добавляют в корма, причем очень часто в превышающих норму количествах. В результате эти лекарственные средства и продукты их распада могут загрязнять продукты питания, которые употребляет человек. При попадании антибиотиков в организм человека они могут оказывать токсическое воздействие, чаще всего в виде возникновения аллергических реакций, дисбактериозов и других неблагоприятных явлений. К антибиотикам, широко применяемым в сельском хозяйстве, относится и хлорамфеникол (ХАФ) или левомицетин. Предельно допустимый уровень (ПДУ) левомицетина в продуктах питания составляет 10 мкг/кг [2].

Микробиологические и физико-химические методы, используемые для анализа хлорамфеникола, имеют ряд недостатков [3–5]. Для одних характерны недостаточные чувствительность, специфичность и надежность, для других – необходимость дорогостоящего оборудования и квалифицированного персонала. Поэтому актуальной является задача разработки высокоспецифичных и чувствительных, но в то же время относительно простых и быстрых методов определения антибиотиков, которые можно было бы проводить во внелабораторных условиях. К таким методам можно отнести твердофазный иммуоферментный анализ, в котором используют пористые мембранные носители. Использование мембранных носителей открывает большие возможности для работы по снижению стоимости и улучшению оперативности анализа [6]. Кроме того, с помощью данных носителей можно разработать чувствительный тест с визуальной детекцией для полуколичественного определения содержания левомицетина в продуктах питания.

Цель данной работы состояла в разработке ряда простых мембранных тестов для количественного и полуколичественного определения хлорамфеникола.

### Материалы и методы

В работе использовали мембраны “Hybond-N<sup>+</sup>” (“Amersham”, Англия), люминол, перекись водорода, кислоты, щелочи, компоненты буферных растворов марок “ос.ч” и “ч.д.а.” (“Рeахим”, Россия) и остальные реактивы производства “Sigma” (США). Для приготовления буферных и субстратных растворов использовали деионизованную воду (*Milli-Q System, Millipore, UK*). Хлорамфеникол был предоставлен из Государственного научного центра по антибиотикам (Москва). Конъюгаты хлорамфеникола с овальбумином (ХАФ-ОВА), антивидовых антител с пероксидазой, а также антисыворотки, специфические к хлорамфениколу были получены ранее [7]. Измерения оптической плотности отраженного от мембран света проводили на сканнере “Shimadzu CS-9000” (Япония). Интенсивность люминесценции измеряли на люминометре “LUMIT” (НПП “Иммунотех”, Россия).

**Проведение анализа.** Все стадии проводили при комнатной температуре. Активацию мембран и фотоиммобилизацию конъюгата ХАФ-ОВА проводили по методике, описанной в [8]. Раствор конъюгата готовили в 0,1 М Tris-HCl буфере (рН 8,0) с 0,15 М NaCl (TBS). На стадии промывки использовали буфер TBS, содержащий 0,1% Tween 20 (TBST). Анализ проводили в полистироловых кюветках. На первой стадии кусочки мембран помещали в кюветы, содержащие раствор специфических антител (900 мкл) и растворы (100 мкл) с разной концентрацией хлорамфеникола в диапазоне калибровочной кривой (0,01–1000 нг/мл). Кюветы инкубировали при постоянном перемешивании в течение 45 мин, затем проводили отмывку мембран (3 раза буфером TBST). На следующем этапе проводили инкубацию с раствором антивидовых антител в течение 30 мин при перемешивании. Мембраны отмывали в буфере TBST и проводили детекцию. Для **хемилюминесцентной детекции** использовали субстратную смесь, содержащую 1,0 мМ люминола, 0,4 мМ *p*-гидроксикоричной кислоты, 2 мМ пероксида

водорода в 100 мМ боратном буфере (рН 9,5). Эмиссию света с поверхности мембран регистрировали в течение 3 мин и в качестве аналитического сигнала использовали значение максимальной интенсивности. Для **колориметрической детекции** мембраны помещали на 20 мин в субстратную смесь, содержащую 1 мМ *o*-дианизидина, 1 мМ пероксида водорода и 0,004% декстран сульфата (MW500000) в 0,1 М Na-ацетатном буфере (рН 4,7). Измеряли интенсивность отраженного света при 380 нм или проводили визуальную детекцию.

### Результаты и обсуждение

**Сравнительное изучение способов детекции пероксидазы с поверхности мембраны.** Для сравнительного изучения хемилюминесцентного и колориметрического методов детекции исследовали активность пероксидазы, иммобилизованной в составе конъюгата с антивидовыми антителами (рис. 1). Сравнение кривых показывает, что хемилюминесцентная детекция позволяет определить количество фермента на один порядок меньше, чем колориметрическая, т.е. является более чувствительной. Колориметрический метод заметно уступает в чувствительности определения иммунного комплекса, но при этом позволяет разработать полуколичественный тест на определение содержания левомицетина с визуальной детекцией окрашенного продукта. Обычно визуальная детекция на мембранах проводится на основании сравнения интенсивности окраски пятен одного цвета. Особенностью реакции окисления бензидинов является образование промежуточных продуктов, которые имеют иную окраску, чем конечный продукт. Так, для *o*-дианизидина конечный продукт имеет коричневую окраску, а промежуточный – зеленую. В растворе промежуточный продукт стабилен только при низких рН, однако ранее в нашей лаборатории были найдены условия его стабилизации на поверхности нейлона в присутствии декстран сульфата [9]. Было показано, что

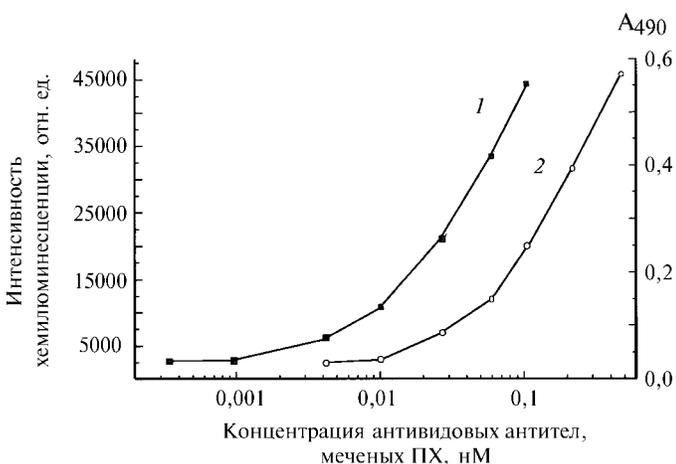


Рис. 1. Зависимость интенсивности хемилюминесценции (1) и оптической плотности (2) отраженного света от концентрации иммобилизованного конъюгата антивидовых антител с пероксидазой

эффект зависит от концентрации как декстран сульфата, так и пероксидазы. В условиях эксперимента можно подобрать такую концентрацию декстран сульфата, при которой калибровочная кривая разбивается на две области: пятна с высокой концентрацией фермента окрашены в зеленый цвет, а с низкой – в коричневый.

На основании проведенных исследований для разработки количественного анализа хлорамфеникола был выбран хемилюминесцентный способ детекции как наиболее чувствительный. Колориметрический способ детекции был выбран для оптимизации полуколичественного теста с визуальной двухцветной детекцией.

**Количественный анализ хлорамфеникола на мембранах.** Поскольку хемилюминесцентная и колориметрическая детекция обладают разной чувствительностью в отношении пероксидазы хрена, оптимизацию метода мембранного анализа ХАФ проводили отдельно для каждого способа детекции. Для выбора оптимального носителя было проведено сравнение разных методов иммобилизации, включая физическую адсорбцию на нативном нейлоне и ковалентную иммобилизацию на модифицированном нейлоне (данные не приведены). Сигнал в случае фотоиммобилизации на активированной мембране был в 2–2,5 раза выше, чем на неактивированном нейлоне, что хорошо согласуется с данными, полученными ранее в нашей лаборатории [8]. Очевидно, что в случае фотоиммобилизации на активированной мембране связывание белка с носителем обусловлено образованием большего количества ковалентных связей, что приводит к более прочному удерживанию белка на поверхности мембраны.

Была проведена оптимизация концентраций реагентов, а также времени проведения стадий анализа, обеспечивающих его оптимальную чувствительность. На рис. 2 приведены градуировочные зависимости определения хлорамфеникола для разных комбинаций реагентов. Показано, что чувствительность анализа меняется с уменьшением концентрации антител. Предел обнаружения вещества существенно снижается при каждом увеличении кратности разведения. Из-за уменьшения максимального значения сигнала дальнейшего снижения концентрации посадочного конъюгата не проводили, но для улучшения аналитических характеристик метода использовали более низкую концентрацию антител. Таким образом, в качестве оптимальных были выбраны следующие условия аналитического определения содержания левомицетина: [ХАФ–ОВА] = 2 мкг/мл, разведение антител 1/12000, разведение конъюгата антивидовых антител с пероксидазой 1/10000. Предел обнаружения разработанного анализа составил 0,02 нг/мл (таблица).

**Полуколичественный анализ хлорамфеникола на мембранах с двухцветной детекцией.** Ранее было показано, что аналитический сигнал промежуточного

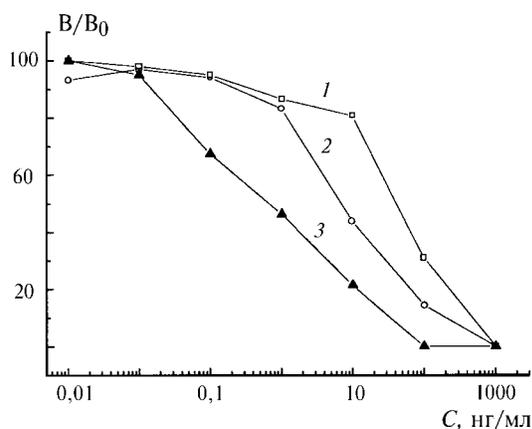


Рис. 2. Градуировочные графики определения хлорамфеникола в водных растворах методом мембранного иммуноанализа с хемиллюминесцентной детекцией при разведении сыворотки: 1 – 1:8000, [ХАФ–ОВА] = 4 мкг/мл; 2 – 1:10000, [ХАФ–ОВА] = 4 мкг/мл; 3 – 1:12000, [ХАФ–ОВА] = 2 мкг/мл

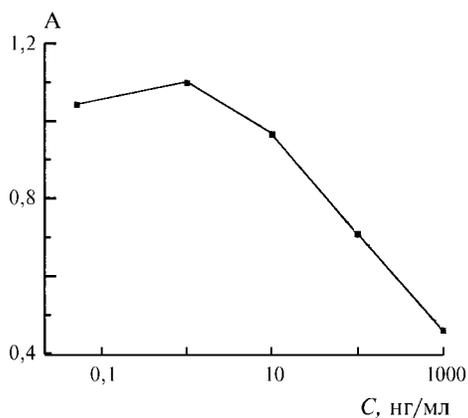


Рис. 3. Градуировочный график определения хлорамфеникола в водных растворах методом мембранного иммуноанализа с колориметрической детекцией. Разведение антител 1:6000, [ХАФ–ОВА] = 4 мкг/мл

продукта окисления *o*-дианизидина гораздо выше сигнала конечного продукта [8]. Таким образом, на стадии оптимизации условий анализа с колориметрической детекцией количественное определение продукта реакции, а соответственно и иммобилизованного

### Основные параметры мембранного иммуноанализа хлорамфеникола с хемиллюминесцентной и колориметрической детекцией

| Параметр                  | Хемиллюминесцентная детекция | Колориметрическая детекция |
|---------------------------|------------------------------|----------------------------|
| Предел обнаружения, нг/мл | 0,02                         | 7                          |
| Коэффициент вариации, %   | 30                           | 25                         |
| Линейный диапазон, нг/мл  | 0,01–100                     | 1–1000                     |

конъюгата, проводили по зеленому продукту реакции, стабилизированному декстрансульфатом. Оптимизация условий мембранного анализа с колориметрической детекцией была проведена так же, как и в случае с хемиллюминесцентной детекцией. В качестве оптимальных были выбраны следующие условия: разведение антител 1:6000, [ХАФ–ОВА] = 4 мкг/мл (рис. 3).

Как и ожидалось, чувствительность анализа с колориметрической детекцией была более чем на два порядка ниже по сравнению с чувствительностью хемиллюминесцентного метода (таблица). Однако с помощью колориметрической детекции можно определять содержание хлорамфеникола на уровне 10 нг/мл (ПДУ) и выше.

Стабилизирующее влияние декстрансульфата на промежуточный продукт было использовано при разработке полуколичественного теста для определения хлорамфеникола. Была оптимизирована концентрация декстрансульфата, при которой переход окраски пятна на мембране из зеленой в коричневую происходил при концентрации хлорамфеникола, превышающей ПДУ (данные не приведены).

Таким образом, использование разных способов детекции ферментной метки с поверхности мембранного носителя позволило разработать высокочувствительный количественный метод с хемиллюминесцентной детекцией, а также полуколичественный метод определения хлорамфеникола на уровне ПДУ.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Меламед Д.Б., Курничная В.К., Киселев М.Ю. // Загрязненность молока и молочных продуктов антибиотиками и химические методы их контроля. М., 1990.
2. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов. СанПиН 2.3.2.560-96. Москва, 1997.
3. Singer C.J., Katz S.E. // J.Assoc.Off.Anal.Chem. 1985. **68**. P.1037.
4. Long A.R., Hsieh L.C., Bello A.C., Malbrough M.S. et al // J. Food Agric. Chem. 1992. **38**. P.427.
5. Moretti V.M., Water C.van de, Haagsma N. // J.Chromatog. 1992. **583**. P. 77.
6. Rubtsova M.Yu., Gavrilova E.M.// Anal. Lett. 1994. **27**. P. 2961.
7. Kolosova A.Yu., Samsonova J.V., Egorov A.M. // Food Agric.Immunol. 2000. **12**. P. 115.
8. Rubtsova M.Yu., Wittmann C., Egorov A.M., Schmid R.D. // Food Agric.Immunol. 1997. **9**. P. 235.
9. Yatsimirskaya E.A., Gavrilova E.M., Egorov A.M. // Anal. Biochem. 1993. **211**. P. 274.