

УДК 57.083.3, 577.14

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОГЕСТЕРОНА МЕТОДОМ ЛАТЕРАЛЬНОГО ПРОТОЧНОГО ИММУНОАНАЛИЗА

В.А. Сафронова, Ж.В. Самсонова, В.Г. Григоренко, А.П. Осипов

(кафедра химической энзимологии, e-mail: capreace@inbox.ru)

Разработан и оптимизирован новый экспресс-метод на основе латерального проточного иммуноанализа (ЛПИА) для определения прогестерона. Для повышения чувствительности ЛПИА вместо коллоидного золота в качестве метки использован фермент пероксидазы хрена. С использованием метода твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) выбрана оптимальная схема проведения анализа и изучено влияние компонентов буфера (детергентов, белков и сахарозы) на характеристики анализа. Линейный диапазон определяемых концентраций составил 2–40 нг/мл прогестерона в буферном растворе. Предел обнаружения метода 2 нг/мл, время проведения ЛПИА не превышает 15 мин.

Ключевые слова: прогестерон, латеральный проточный иммуноанализ, пероксидаза хрена.

В настоящее время в сельском хозяйстве одна из наиболее важных задач – ранняя диагностика стельности у коров. Выявление стельности на раннем этапе после проведенного осеменения позволяет значительно сократить сервис-период и таким образом приносит существенный экономический эффект. Традиционное ректальное исследование позволяет получить достоверные результаты только на 70–90-й день после осеменения. Исследование стельности с использованием ультразвуковых сканеров (УЗИ-исследование) позволяет получить достоверный диагноз по комплексу нескольких показателей уже на 32–37-й день после осеменения. Однако данный вид диагностирования требует высокой квалификации ветеринарных врачей и наличия дорогостоящего оборудования. Среди существующих методов определения стельности самыми быстрыми являются иммунохимические методы анализа, например, иммуноферментный анализ (ИФА). Данный метод позволяет определять стельность коров по концентрации видонеспецифического гормона прогестерона (ПГ) в молоке или сыворотке крови уже на 19–21-е сутки [1]. Однако этот метод требует наличия лаборатории, укомплектованной специальным оборудованием.

Иммунохимические методы определения стельности по концентрации ПГ появились в 70-е годы прошлого века [2, 3]. Впервые в работе [4] было показано, что стельность можно диагностировать по концентрации ПГ в молоке. Позже было показано, что содержание ПГ в коровьем молоке коррелирует с его содержанием в сыворотке крови, поэтому ПГ используют

в качестве маркера для определения стельности коров [5, 6]. Концентрация ПГ в молоке коров претерпевает циклические изменения [7]. В момент овуляции (начало полового цикла) концентрация ПГ составляет менее 2 нг/мл, а затем возрастает до максимума (>10 нг/мл) на 13–15-е сутки. Если стельность не наступила, то уровень ПГ падает уже на 18–20-е сутки. Если корова стельная, высокая концентрация ПГ сохраняется в течение всего стельного периода. Поэтому определение концентрации ПГ на 21-е сутки, т.е. в конце полового цикла, позволяет выявить статус исследуемых животных как стельных (с высоким уровнем ПГ) или нестельных (с низким уровнем ПГ). Корова считается стельной, если уровень ПГ в молоке на 21-е сутки после осеменения составляет 7 нг/мл и выше.

В настоящее время одним из наиболее простых и быстрых методов полуколичественного определения важных биологически активных веществ является латеральный проточный иммуноанализ (ЛПИА) или иммунохроматографический анализ. Широкое использование этого метода в медицинской диагностике, сельском хозяйстве и многих других областях обусловлено небольшим временем проведения анализа (10–15 мин), а также простой и доступной процедурой визуальной оценки результатов, не требующей дополнительных приспособлений. Анализ проводят с помощью специальных индикаторных тест-полосок, которые обеспечивают быстрое проведение тестирования вне лаборатории (рис. 1). Реакция протекает в один этап после нанесения на мембрану анализируемого образца, поскольку данные тест-полоски содер-

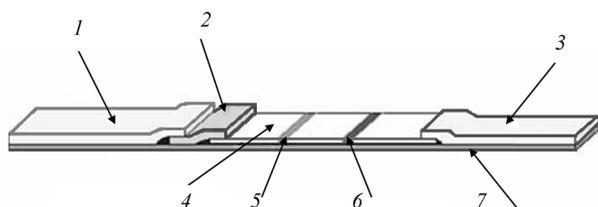


Рис. 1. Строение тест-полоски для ЛПИИ: 1 – мембрана для нанесения образца, 2 – мембрана для конъюгата с меткой, 3 – адсорбирующая мембрана, 4 – аналитическая мембрана, 5 – тестовая линия, 6 – контрольная линия, 7 – пластиковая основа

жат все компоненты в готовом виде. Результат анализа выявляется в виде окрашенных полос в тестовой и контрольной зонах аналитической мембраны. В литературе опубликованы лишь несколько работ по определению ПГ методом ЛПИИ [8–10]. В качестве меток в этих исследованиях использовали наночастицы золота [8], пероксидазу хрена [9] и наночастицы углерода [10]. Следует отметить, что первый ЛПИИ для определения низкомолекулярного вещества (гаптена) был разработан именно для прогестерона [8]. Если наборы реагентов для определения ПГ в молоке методом ИФА коммерчески доступны как за рубежом, так и в России, то единичные быстрые тесты для определения ПГ в молоке появились совсем недавно. В России такие тесты пока не разработаны. Поэтому цель данного исследования состояла в разработке быстрого метода определения ПГ на основе принципа ЛПИИ с возможностью последующего практического использования для экспресс-определения стельности коров.

Материалы и методы

В работе использовали биохимические и химические реагенты фирмы «Sigma» (США), одно- и двузамещенные фосфаты калия («Helicon», Россия), золотохлористоводородную кислоту («Fluka», Швейцария), твин 20 и тритон X 100 («MP Biomedicals», Франция), овальбумин (ОВА) («Реахим», Россия), субстратный раствор, содержащий 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) и H_2O_2 , готовый к использованию («НВО Иммунотех», Россия), сахарозу («Helicon», Россия), серную кислоту и этанол абсолютный («Химмед», Россия), пероксидазу хрена (ПХ) («Яринвест», Россия).

В работе использовали следующие буферные растворы: ФБ – 0,01 М К-фосфатный, (рН 7,0); ФБС – 0,01 М К-фосфатный, 0,15 М NaCl (рН 7,4); ФБСТ – 0,01 М К-фосфатный, 0,15 М NaCl, 0,05% твин 20

(рН 7,4); КБ – 0,01 М Na-карбонатный (рН 9,5); ББ – 0,01 М боратный (рН 8,6).

Стандартные растворы ПГ для анализа готовили последовательным разбавлением исходного раствора ПГ (1 мг/мл в этаноле) буфером ФБСТ.

Поликлональные антисыворотки кролика, полученные против конъюгата гемисукцината 11 α -гидроксипрогестерона с гемоцианином и против пероксидазы хрена предоставлены лабораторией инженерной энзимологии кафедры химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова. Иммуноглобулиновую фракцию антисывороток выделяли двойным осаждением сухим безводным сульфатом аммония. Избыток сульфата аммония удаляли гель-фильтрацией на колонке PD-10 (GE Healthcare, Великобритания).

Раствор коллоидного золота с заданным размером частиц получали по методу Френса [11].

Мультимембранные тест-полоски изготавливали с использованием аналитических нитроцеллюлозных мембран CNPC (размер пор 15 мкм), мембран для нанесения конъюгата РТ-5, впитывающих мембран «AP045» («MDI», Индия) и мембраны для нанесения образца «MAPDS-0300» («Arista Biologicals», США).

Синтез конъюгата 3-О-карбоксиметилоксима прогестерона с ОВА

В 500 мкл диметилформамида (ДМФА) растворили 2,9 мг (7,5 мкмоль) 3-О-карбоксиметилоксима прогестерона (КМО-ПГ), 1,7 мг (15 мкмоль) N-гидросукцинимид (ГСИ) и 3,1 мг (15 мкмоль) дициклогексилкарбодиимида (ДЦК). Реакционную смесь перемешивали 4 ч при комнатной температуре и выдерживали ночь при 4°C. Выпавший осадок отцентрифугировали. К раствору 20 мг (0,5 мкмоль) ОВА в 1,5 мл ББ добавили при перемешивании 170 мкл реакционной смеси и инкубировали 4 ч при комнатной температуре. Полученный раствор диализовали против дистиллированной воды. Полученный конъюгат лиофилизировали и хранили при 4°C.

Получение конъюгата КМО-ПГ-ОВА, меченного золотыми наночастицами

К 10 мл раствора коллоидного золота (рН 5,5) добавляли 1 мл раствора конъюгата КМО-ПГ-ОВА (50 мг/мл) и перемешивали в течение 15 мин. Для удаления несвязавшегося конъюгата КМО-ПГ-ОВА раствор центрифугировали в течение 20 мин (11000g, 4°C). Супернатант удаляли, осадок растворяли в 1 мл ФБ, содержащем 0,1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), 10% сахарозы и 0,01% NaN_3 . Аликвоту раствора наносили на полоску стекловолоконной мембраны

4×4 мм и высушивали при комнатной температуре в течение ночи.

Получение конъюгата КМО-ПГ с пероксидазой хрена

В 300 мкл ДМФА растворили 2,6 мг (6,7 мкмоль) КМО-ПГ. К полученному раствору при перемешивании добавили 0,9 мг (8 мкмоль) ГСИ и 2,7 мг (13 мкмоль) ДЦК. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при комнатной температуре и выдерживали ночь при 4°C. Реакционную смесь центрифугировали, после чего 100 мкл супернатанта добавили к 2 мг ПХ в 200 мкл ББ при перемешивании. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. После инкубации реакционную смесь центрифугировали, а супернатант очищали методом гель-фильтрации на колонке PD-10 («GE Healthcare», Великобритания). Оптическую плотность полученного конъюгата измеряли при 403 нм (UV-1202, «Shimadzu», Япония).

Получение иммунохроматографического композита

Для ЛПИИ с коллоидным золотом в качестве метки на аналитическую мембрану наносили раствор антител в концентрации 0,2 мг/мл или белка А в концентрации 0,1 мг/мл в ФБС с использованием полуавтоматического распылителя «BioJet Quanti 3000», совмещенного с автоматической платформой «XYZ 3050» («BioDot», США). Для ЛПИИ с ферментной меткой антитела наносили в концентрации 0,015 мг/мл. На контрольную полосу на расстоянии 5 мм от аналитической полосы наносили антитела против пероксидазы хрена в концентрации 0,025 мг/мл.

Использовали следующие параметры насоса для нанесения образцов: размер капли 30 нл, шаг 0,3 мм, скорость 50 мм/с. Высушивание полосок проводили в течение 24 ч при 37°C.

Проведение ЛПИИ с коллоидным золотом в качестве метки

Собирали тест-полоски (75×4 мм) в соответствии со схемой, представленной на рис. 1. Перед проведением анализа тест-полоски помещали на горизонтальную поверхность. Пропускание реагентов осуществляли двумя способами. Первый способ (рис. 2, схема 1) использовали в том случае, когда в тестовой зоне сорбированы специфические антитела (на мембрану для нанесения образца добавляли 120 мкл стандартного раствора ПГ); второй способ (рис. 2, схема 2) использовали в том случае, когда в виде тестовой полосы нанесен белок А (на мембрану для нанесения образца добавляли смесь 120 мкл стандартного раствора ПГ и 5 мкл раствора антител с концентрацией 0,01 мг/мл).

Все растворы реагентов готовили в ФБСТ. После того, как раствор полностью впитался, тест-полоски высушивали при комнатной температуре. Количественное определение интенсивности окраски аналитической и контрольных зон тест-полоски проводили с помощью сканера «Epson Perfection V700 Photo» («Seiko-Epson», Япония) с разрешением 600 точек на дюйм в 24-битном цвете (RGB). Анализ полученных цифровых изображений (в формате tif) проводили с использованием программы Scion Image (http://www.scioncorp.com/pages/scion_image_windows.htm). По полученным данным строили калибровочные зависимости, где по оси ординат от-

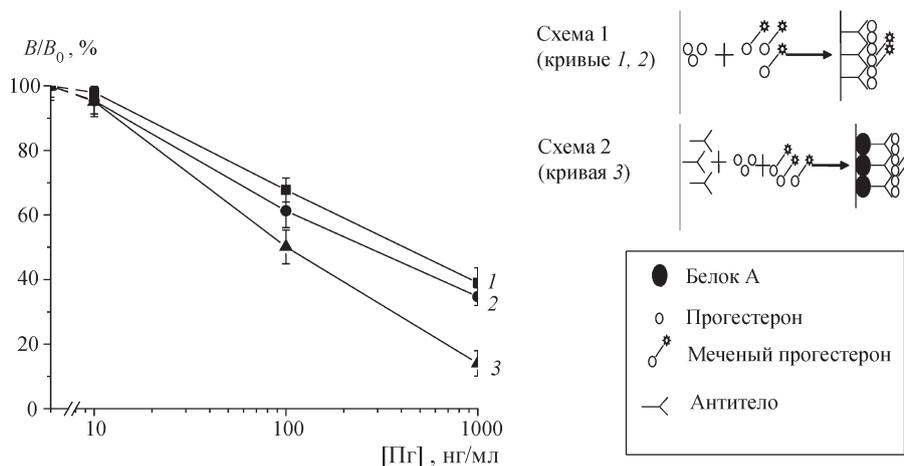


Рис. 2. Калибровочные зависимости ЛПИИ ПГ с коллоидным золотом в качестве метки. Схема 1 для золотых наночастиц с размерами 16 нм (кривая 1) и 35 нм (кривая 2); схема 2 для золотых наночастиц с размером 35 нм (кривая 3)

кладывали интенсивность окраски полоски в абсолютных величинах или величину $B/B_0 = (I/I_0) \cdot 100\%$, где I_0 – интенсивность окраски при концентрации ПГ равной 0 нг/мл, I – интенсивность окраски, а по оси абсцисс – значения концентрации стандартного раствора ПГ.

Проведение ИФА

ИФА проводили по трем схемам (рис. 3). Для схемы 1 в лунках полистиролового планшета («MaxiSorb, Nunc», Дания) сорбировали раствор антител в КБ с выбранной концентрацией (150 мкл/лунка). После инкубации в течение ночи при 4°C лунки промывали раствором ФБСТ (3×150 мкл/лунка) и добавляли по 20 мкл стандартных растворов ПГ, а затем по 100 мкл раствора конъюгата КМО-ПГ-ПХ с выбранной концентрацией. После инкубации (37°C, 1 ч), отмывали несвязавшиеся реагенты раствором ФБСТ (3×150 мкл/лунка), а затем добавляли 100 мкл субстратного раствора и инкубировали 15 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл раствора 0,2 М серной кислоты. При использовании схемы 2 на первой стадии сорбировали белок А с концентрацией 1 мкг/мл в КБ (150 мкл/лунка, инкубация 2 ч, 37°C). После стадии отмывки (ФБСТ, 3×150 мкл/лунка), проводили инкубацию с раствором специфических антител в ФБС в выбранной концентрации (150 мкл/лунка, инкубация в течение ночи при 4°C). Далее анализ проводили так, как указано в схеме 1. Схему 3 проводили аналогично схеме 2, но после сорбции белка А в лунки планшета последовательно добавляли 20 мкл стандартных растворов ПГ, 50 мкл раствора конъюгата КМО-ПГ-ПХ и 50 мкл раствора антител в выбранной концентрации в ФБС; после чего планшет инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Результат реакции оценивали на спектрофотометре вертикального сканиро-

вания при длине волны 450 нм («Molecular Devices», «Palo Alto», США). По полученным данным строили калибровочные зависимости, где по оси ординат откладывали интенсивность окраски в единицах оптической плотности или величину $B/B_0 = (I/I_0) \cdot 100\%$, а по оси абсцисс – значения концентрации стандартного раствора ПГ.

Проведение ЛПИА с ферментативной меткой

Собирали тест-полоски (75×4 мм) в соответствии со схемой, представленной на рис. 1, не используя мембрану для конъюгата. На аналитическую мембрану наносили смесь 10 мкл конъюгата КМО-ПГ-ПХ и 10 мкл стандартного раствора ПГ в ФБСТ. После того как раствор впитался, на конец мембраны для образца наносили 150 мкл ФБСТ. После полного впитывания раствора ФБСТ, тест-полоску окрашивали двумя способами. В первом случае отрезали аналитическую мембрану и помещали ее в пробирку с 500 мкл субстратного раствора, содержащего 10% декстрансульфата, и инкубировали 5 мин при перемешивании. Во втором случае на аналитическую мембрану добавочно наносили 50 мкл того же раствора. После окрашивания тест-полоски высушивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Численную обработку результатов проводили аналогично ЛПИА с коллоидным золотом в качестве метки.

Результаты и обсуждение

ЛПИА с использованием наночастиц золота в качестве метки

Прогестерон является низкомолекулярным веществом, поэтому для его определения используют схему анализа, основанную на конкурентном взаимодействии меченого и немеченого ПГ с центрами связы-

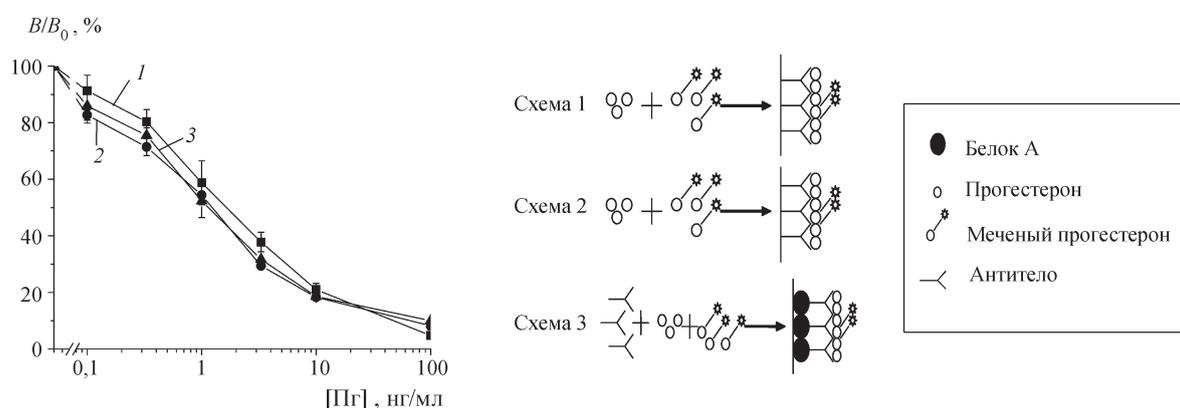


Рис. 3. Калибровочные зависимости ИФА ПГ для трех схем анализа

вания антител. При этом получаемый аналитический сигнал обратно пропорционален концентрации ПГ.

При разработке ЛПИИ часто используют в качестве метки золотые наночастицы. Основные преимущества наночастиц золота – простота приготовления и возможность получения частиц с разным диаметром, а также уникальные оптические свойства. В работе были получены наночастицы золота размером 16 и 35 нм. Для проведения ЛПИИ с коллоидным золотом в качестве метки первоначально использовали схему, когда в зоне тестовой линии сорбированы специфические антитела к ПГ. Золотыми наночастицами метили конъюгат производного ПГ с высокомолекулярным белком (ОВА). Из полученных калибровочных зависимостей видно, что диапазон определяемых концентраций при использовании золотых наночастиц разного размера в качестве метки не позволяет определять ПГ в необходимом диапазоне концентраций ниже 10 нг/мл (рис. 2, кривые 1, 2). Поэтому нами была использована модифицированная схема анализа, где в качестве тестовой линии нанесен белок А. Особенность данной схемы заключается в том, что все реагенты, а именно меченый (ПГ*) и немеченый (ПГ) ПГ и антитела, специфичные к ПГ, пропускают по тест-полоске одновременно. Такой подход позволяет создать условия истинной конкуренции между меченым и немеченым реагентами за центры связывания антител в растворе. Далее антитела связываются с белком А, что обеспечивает их направленную посадку на мембрану через Fc-фрагмент. На рис. 2 (кривая 3) видно, что угол наклона калибровочной зависимости для такой схемы больше, чем угол наклона кривой при прямой сорбции антител. Однако такая схема проведения анализа также не позволяет сдвинуть рабочий диапазон калибровочной зависимости в область более низких концентраций ПГ. Поэтому для дальнейшей разработки быстрого теста для определения ПГ было решено перейти к более чувствительной ферментной метке. Ранее в литературе уже был описан ЛПИИ с ферментативной меткой как для высокомолекулярных [12–15], так и низкомолекулярных веществ [16, 17] и целых клеток [18]. Использование фермента в качестве метки позволяет улучшить чувствительность анализа в 10–30 раз (по сравнению с коллоидным золотом) [13, 15, 17]. Для выбора оптимальной схемы проведения ЛПИИ с использованием фермента пероксидазы хрена в качестве метки, а также для изучения влияния компонентов, которые могут входить в состав применяемых мембран, нами был использован метод твердофазного ИФА.

Твердофазный ИФА для определения ПГ

Выбор схемы проведения анализа

Было проведено сравнительное изучение трех схем проведения ИФА (рис. 3). В схеме 1 антитела напрямую сорбировали на лунках планшета, в схемах 2 и 3 антитела сорбировали направленно, через белок А. Особое отличие схемы 3 от двух первых состоит в том, что все реагенты, а именно свободный и меченый ферментом ПГ и специфические антитела, добавляются одновременно, что обеспечивает процесс истинной конкуренции меченого и немеченого реагентов за центры связывания антител. При этом одновременно происходит направленная посадка антител через Fc-фрагмент на белок А.

Полученные калибровочные зависимости для изучаемых схем анализа были практически идентичны (рис. 3). Несмотря на то что для проведения схемы 1 требуется более высокая концентрация антител по сравнению со схемами 2 и 3, где сорбция антител проводится через белок А, первая имеет существенное преимущество по времени проведения анализа (1,5 ч против 3 ч для схем 2 и 3). Поэтому для дальнейших исследований была выбрана более простая и быстрая схема 1 с прямой сорбцией антител.

Влияние различных компонентов на характеристики ИФА

Было изучено влияние компонентов, которые могут входить в состав коммерческих мембран, используемых для ЛПИИ. Для этого при проведении инкубации в рабочий буфер добавляли исследуемые добавки в разной концентрации и сравнивали полученные калибровочные зависимости. В частности, изучали эффект, полученный при добавлении 0,0005–0,05% детергентов твин 20 и тритон X 100, 0,01–10% сахарозы и 0,01–1% белков (ОВА, БСА, казеина). Следует отметить, что из всех исследуемых добавок только присутствие сахарозы не приводит к сдвигу калибровочной зависимости в область больших концентраций ПГ (данные не приведены). Помимо добавления монокомпонентов, изучали также влияние одновременного присутствия двух и трех добавок (рис. 4). Было показано, что при наличии в рабочем буфере детергента одновременно с одним или двумя другими компонентами калибровочная зависимость всегда сдвигается в область более высоких концентраций. При этом из всех исследуемых комбинаций только в случае совместного присутствия сахарозы и БСА калибровочная зависимость полностью совпадает с ферменной кривой.

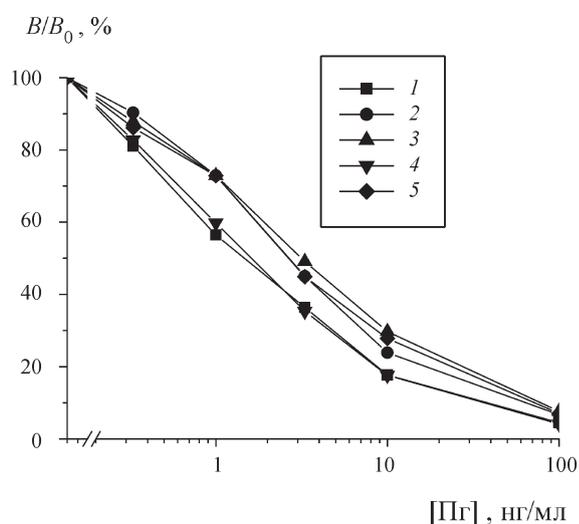


Рис. 4. Калибровочные зависимости ИФА ПГ при использовании следующих рабочих буферов: 1 – ФБС; 2 – ФБС 0,05% Твин 20, 10% сахарозы; 3 – ФБС 0,05% Твин 20, 0,1% БСА; 4 – ФБС 10% сахарозы, 0,1% БСА; 5 – ФБС 0,05% Твин 20, 10% сахарозы, 0,1% БСА

Таким образом, было показано, что при добавлении детергентов, белков и сахарозы в буферную систему сдвиг калибровочной зависимости не столь значителен (сдвиг IC_{50} в среднем составляет 1,5–2,0 нг/мл) и

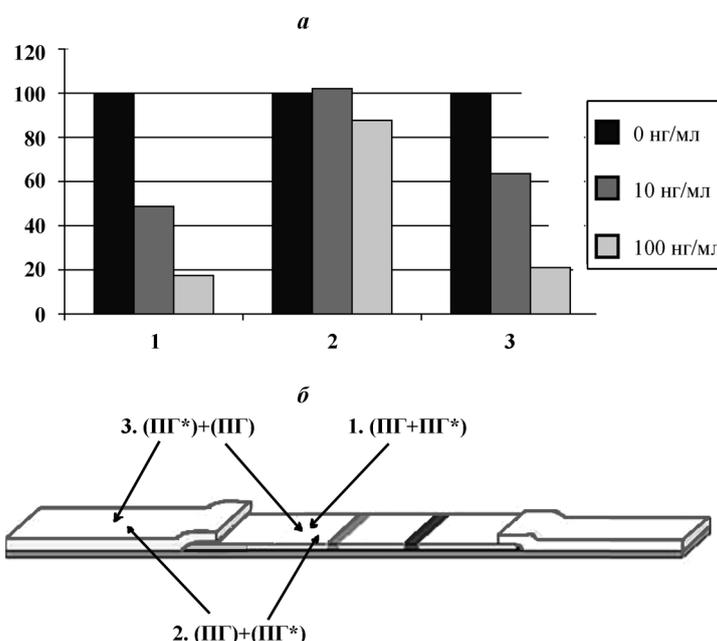
позволяет определять ПГ в диапазоне концентраций, лежащем ниже 10 нг/мл.

ЛПИИ с ферментативной меткой

Для разработки ЛПИИ с ферментативной меткой использовали схему с прямой сорбцией антител на аналитической мембране. В качестве меченого реагента использовали конъюгат КМО-ПГ-ПХ. В процессе разработки анализа были оптимизированы способы нанесения реагентов на полоску, компоновка тест-полоски и способ регистрации результата.

Выбор последовательности нанесения реагентов на тест-полоску

На рис. 5 приведены зависимости относительной интенсивности сигнала от концентрации ПГ для разных вариантов нанесения реагентов на полоску: 1 – смесь немеченого и меченого прогестерона (ПГ+ПГ*) наносили на аналитическую зону мембраны; 2 – последовательно наносили раствор меченого ПГ* на аналитическую мембрану и немеченого ПГ на мембрану для нанесения образца; 3 – последовательно наносили раствор немеченого ПГ на аналитическую мембрану и раствор меченого ПГ* на мембрану для нанесения образца. Далее для каждого из трех вариантов проведения ЛПИИ на мембрану в качестве образ-



Зависимость интенсивности окрашивания аналитической полоски от концентрации ПГ для различных методов нанесения реагентов при проведении ЛПИИ с ферментативной меткой

ца наносили буферный раствор ФБСТ. При нанесении раствора конъюгата КМО-ПГ-ПХ на аналитическую мембрану с последующим пропусканием стандартного раствора ПГ (вариант 2) калибровочной зависимости не наблюдалось (рис. 5). По-видимому, конъюгат КМО-ПГ-ПХ прочно связывается с сорбированными в тестовой зоне антителами, при этом наносимый на мембрану в качестве образца стандартный раствор ПГ не успевает вытеснить КМО-ПГ-ПХ из тестовой зоны. Зависимости для вариантов 1 и 3 схожи между собой. Однако в первом случае количество используемого конъюгата в три раза меньше. На основании полученных данных в качестве оптимальной последовательности нанесения реагентов была выбрана схема с нанесением смеси меченого и немеченого ПГ на аналитическую мембрану с последующим пропусканием буферного раствора.

Л а м и н и р о в а н и е т е с т - п о л о с к и

При проведении ЛПИИ для оптимального окрашивания тестовых и контрольных зон, а также для снижения фонового сигнала тест-полоску часто ламинируют, т.е. покрывают ее специальной пленкой с клеящей основой. Такой подход обеспечивает равномерный поток жидкости по полоске, что очень важно в данном виде анализа. Однако в нашем случае при необходимости проведения фермент-субстратной реакции для получения результата тест-полоску целиком не ламинировали, оставляя область для нанесения субстрата. С использованием ламинированных разными способами тест-полосок (рис. 6, варианты 2 и 3) и контрольной неламинированной полоски (рис. 6, вариант 1) проводили ЛПИИ по оптимальной выбранной схеме и сравнивали степень ингибирования сигнала свободным ПГ при выбранных концентрациях. Следует отметить, что для вариантов 1 и 2 наблю-

дали достаточно высокий фоновый сигнал. При этом величина относительной интенсивности сигнала, соответствующая концентрации ПГ, равной 7 нг/мл, была гораздо выше аналогичной величины для варианта 3. Данное различие можно объяснить более тесным контактом мембраны для нанесения образца и аналитической мембраны, что помогает поддерживать более равномерный поток при переходе раствора с одной мембраны на другую. Ламинирование этой зоны, по-видимому, уменьшает впитывание мембраной для нанесения образца реагентов, наносимых на аналитическую мембрану. Поэтому наиболее оптимальным для проведения данного ЛПИИ был выбран третий вариант ламинирования тест-полоски.

В ы б о р с п о с о б а д е т е к ц и и с и г н а л а

Проведение ЛПИИ с ферментативной меткой усложняется необходимостью проведения дополнительной конечной стадии – окрашивания тест-полоски в результате фермент-субстратной реакции. В данной работе использовали субстратный раствор на основе ТМБ с добавлением декстрансульфата, который образует с окисленным продуктом фермент-субстратной реакции нерастворимое соединение на поверхности аналитической зоны мембраны. Были рассмотрены два варианта проведения стадии окрашивания: окрашивание аналитической мембраны, отделенной от других частей тест-полоски, в пробирке с раствором субстрата или нанесение аликвоты субстратного раствора непосредственно на тест-полоску (аналитическую мембрану). Чтобы свести к минимуму количество манипуляций с тест-полоской, окрашивание проводили нанесением аликвоты субстратного раствора на аналитическую зону мембраны. Оптимальный объем наносимого субстратного раствора составил

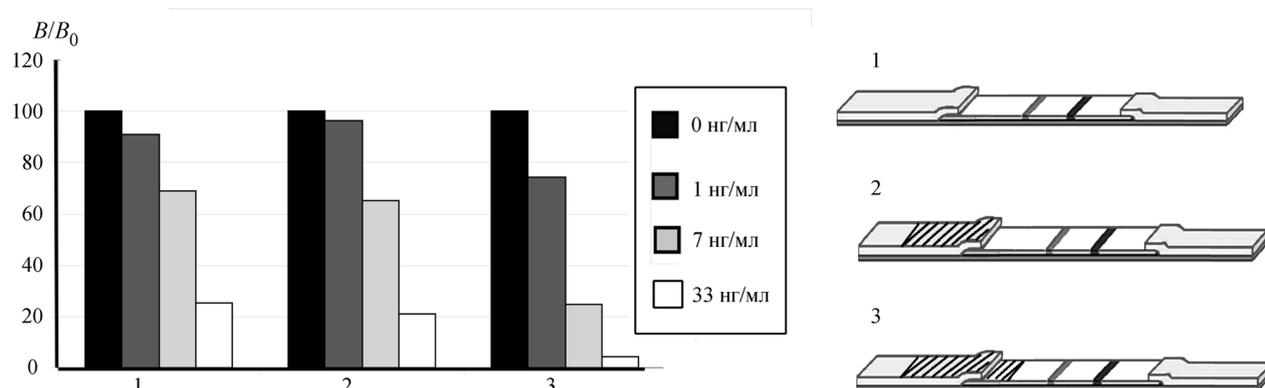


Рис. 6. Зависимость интенсивности окрашивания аналитической полосы от концентрации ПГ для разных способов ламинирования тест-полоски при проведении ЛПИИ с ферментативной меткой. Область ламинирования заштрихована

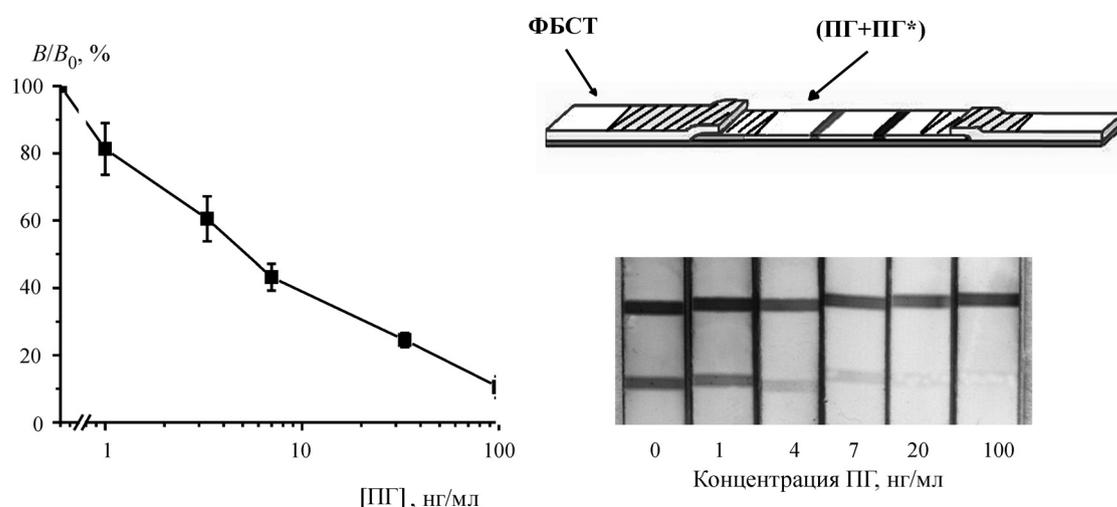


Рис. 7. Схема проведения анализа, калибровочная зависимость и результат визуальной детекции сигнала ЛПИА с ферментативной меткой для определения ПГ. Область ламинирования заштрихована

50 мкл. В данном случае не происходит размывания тестовой и контрольной линий, а визуальную детекцию можно проводить уже через 5 мин.

В результате проведенных исследований в качестве оптимальной была выбрана следующая схема проведения ЛПИА. Тест-полоску ламинировали, как показано на рис. 7, далее на аналитическую мембрану наносили смесь конъюгата КМО-ПГ-ПХ и стандартного раствора ПГ, а после полного впитывания раствора добавляли буферный раствор на мембрану для образца. Время проведения данной стадии составило 10 мин. Затем на аналитическую зону мембраны наносили 50 мкл субстратного раствора и через 5 мин визуально детектировали результат. Количественную оценку результатов анализа проводили через 30 мин после проведения ЛПИА. Диапазон определяемых концентраций лежал в области концентраций ПГ, необходимых для диагностирования стельности (2–40 нг/мл), а предел обнаружения метода составил 2 нг/мл (рис. 8, таблица). Следует отметить, что при визуальной оценке результатов ЛПИА окраска полоски, полученная для растворов с пороговой концентрацией ПГ, равной 7 нг/мл и выше, легко отличима от полоски, полученной для растворов, содержащих ПГ в более низких концентрациях. Линейные диапазоны определяемых концентраций для ИФА и ЛПИА с ферментативной меткой существенно не отличались друг от друга (рис. 8, таблица). Однако метод ЛПИА имеет преимущество по времени проведения анализа (таблица).

Разработанный нами метод ЛПИА позволяет проводить анализ в необходимом диапазоне концентраций в «полевых» условиях, например, непосредственно в фермерском хозяйстве, что крайне важно при исполь-

зовании быстрого теста для определения стельности коров. Однако для целей быстрой диагностики стельности необходимо проводить определение ПГ в цельном молоке без дополнительной пробоподготовки образца. Молоко имеет сложный состав и, кроме того, состав молока, в частности жирность, может у разных животных варьировать [19]. Вариабельность исследуемых образцов может оказывать большое влияние на проведение анализа, в частности, гетерогенный состав образца может затруднять протекание образца по мембранам, что создает дополнительные трудности [20]. Ряд экспериментов, проведенных нами с образцами цельного необработанного молока, показал, что для определения ПГ в молоке с целью диагностики стельности коров требуется дополнительная оптимизация условий проведения ЛПИА.

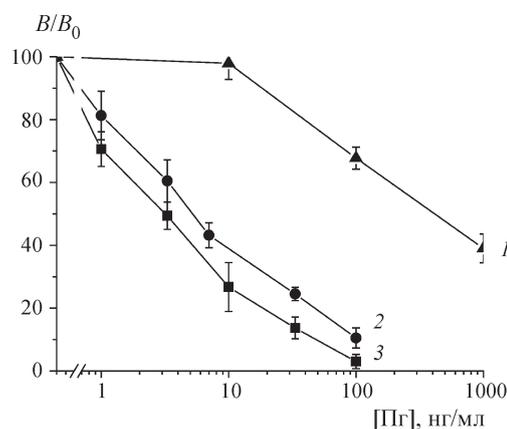


Рис. 8. Калибровочные зависимости, полученные при использовании разных методов определения ПГ: 1 – ЛПИА (метка – коллоидное золото); 2 – ЛПИА (метка – пероксидаза хрена); 3 – ИФА

Сравнение методов определения ПГ

Метод анализа	Диапазон определяемых концентраций, нг/мл	*IC ₅₀ , нг/мл	Время проведения анализа
ЛПИА (метка – коллоидное золото)	>30	110	10–15 мин
ИФА	0,5–20	1	1,5 ч
ЛПИА (метка – пероксидаза хрена)	2–40	6	15–20 мин

*IC₅₀ – концентрация ПГ, вызывающая 50%-е ингибирование сигнала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Posthuma-Trumpie G.A., van Amerongen A., Korf J., van Berkel W.J.H. // Tr. Biotechnol. 2009. **27**. N 11. P. 652.
2. Heap R.B., Holdsworth R.J., Gadsby J.E., Laing J.A., Walters D.E. // Brit. Vet. J. 1976. **132**. N 5. P.445.
3. Dobson H., Fitzpatrick R.J. // Br. Vet. J. 1976. **132**. N 5. P. 538.
4. Laing J.A., Heap R.B. // Br. Vet. J. 1971. **127**. N 8. P. 19.
5. Dobson H., Midmer S.E., Fitzpatrick R.J. // Vet. Rec. 1975. **96**. N 10. P. 222.
6. Hoffman B, Gunzler O., Hamburger R., Schmidt W. // Br. Vet. J. 1976. **132**. N 5. P.469.
7. Середин В.А. // Вестник ветеринарии. 2007. **41–42**. № 1–2. С. 24.
8. Laitinen M.P., Vuento M. // Acta Chem. Scand. 1996. **50**. P. 141.
9. Sananikone K., Delwiche M.J., BonDurant R.H., Munro C.J. // Trans. ASAE. 2004. **47**. N 10. P. 1357.
10. Posthuma-Trumpie G.A., Korf J., van Amerongen A. // Anal. Bioanal. Chem. 2008. **392**. N 6. P. 1215.
11. Frens G. // Nature Phys. Sci. 1973. **241**. P. 20.
12. Ono T., Kawamura M., Arai Sh., Nariuchi H. // J. Immunol. Meth. 2003. **272**. N 1-2. P. 211.
13. Cho J.-H., Paek E.-H., Cho Il-H., Pae Se-H. // Anal. Chem. 2005. **77**. N 13. P.4091.
14. Cho J.-H., Han S.-Mok, Paek Eui-H., Cho Il-H., Paek Se-H. // Anal. Chem. 2006. **78**. N 3. P. 793.
15. Han S.-Mok, Cho J.-H., Cho Il-H., Paek Eui-H. // Anal. Chim. Acta. 2007. **587**. N 1. P. 1.
16. Watanabe H., Satake A., Matsumoto M., Kido Y., Tsuji A., Ito K., Maeda M. // Analyst. 1998. **123**. N 12. P. 2573.
17. Zhang C, Zhang Y, Wang Sh. // J. Agric. Food Chem. 2006. **54**. N 7. P. 2502.
18. Park S., Kim H., Paek Se-H., Hong J.W., Kim Y-Kee. // Ultra-microscopy. 2008. **108**. N 10. P. 1348.
19. Твердохлеб Г.В., Раманаускас Р.И. Химия и физика молока и молочных продуктов. М., 2006.
20. Posthuma-Truimpie G.A. PhD thesis. University of Groningen, The Netherlands, 2008.

Поступила в редакцию 15.05.12

LATERAL FLOW IMMUNOASSAY OF PROGESTERONE

V.A. Safronova, J.V. Samsonova, V.G. Grigorenko, A.P. Osipov

(Division of Chemical Enzymology)

A new express method based on lateral flow immunoassay (LFIA) for progesterone detection was developed. To increase the assay sensitivity an enzyme label (horse-radish peroxidase) was used instead of colloidal gold. An optimal assay format was chosen and the influence of a range of buffer supplements (detergents, proteins and sucrose) was investigated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Linear range of LFIA was between 2 and 40 ng/ml in buffer. Limit of detection was 2 ng/ml, assay time was within 15 min.

Key words: progesterone, lateral flow immunoassay, horseradish peroxidase.

Сведения об авторах: Сафронова Валентина Андреевна – аспирант химического факультета МГУ (sarpase@inbox.ru); Самсонова Жанна Васильевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (jvsamsonova@gmail.ru); Григоренко Виталий Георгиевич – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (vitaly.grigorenko@gmail.ru); Осипов Александр Павлович – доцент кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (APOSipov@gmail.ru).