

Разработка метода иммуноферментного анализа хлорамфеникола: влияние структуры иммунореагентов и схемы анализа

Федорова М.Д., Крапивин А.С., Самсонова Ж.В., Андреева И.П., Рубцова М.Ю., Егоров А.М.

студентка

МГУ М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: marina.msu@gmail.com

Целью данной работы было изучение влияния структуры и состава иммунореагентов на чувствительность иммуноферментного анализа (ИФА) хлорамфеникола. А также разработка и оптимизация метода конкурентного твердофазного ИФА для определения данного антибиотика в молоке.

В ходе работы для получения поликлональных антисывороток, специфичных к ХАФ, были использованы конъюгаты сукцината ХАФ с бычьим сывороточным альбумином (БСА) и гемоцианином, и конъюгат деацелированного ХАФ с БСА. С этими же производными ХАФ были получены конъюгаты с овальбумином (ОВА) и пероксидазой хрена (ПХ). Были изучены различные комбинации антисывороток и конюгатов гаптенов с различными белками и оптимизированы условия проведения конкурентного ИФА хлорамфеникола по прямой и непрямой схемам. По полученным калибровочным кривым были рассчитаны пределы обнаружения, представленные в таблице 1.

Таблица 1. Пределы обнаружения ХАФ в различных схемах ИФА (нг/мл)

Иммуноген	Конъюгат для анализа	Непрямая схема ИФА	Прямая схема ИФА
Сукцинат ХАФ с БСА	Сукцинат ХАФ с ОВА	1,0±0,09	
	Сукцинат ХАФ с гемоцианином	1,8±0,1	
	Деацелированный ХАФ с ОВА	нет связывания	
	Сукцинат ХАФ с ПХ		0,8±0,06
Сукцинат ХАФ с гемоцианином	Сукцинат ХАФ с ОВА	0,8±0,07	
	Деацелированный ХАФ с ОВА	0,7±0,07	
	Деацелированный ХАФ с БСА	0,4±0,05	
	Сукцинат ХАФ с ПХ		0,15±0,03
Деацелированный ХАФ с БСА	Сукцинат ХАФ с ОВА	1,5±0,1	
	Сукцинат ХАФ с гемоцианином	0,33±0,02	
	Деацелированный ХАФ с ОВА	1,0±0,09	
	Сукцинат ХАФ с ПХ		0,21±0,03

Лучшие результаты были получены для прямой схемы ИФА, в которой антитела, полученные на конъюгат сукцината ХАФ с гемоцианином, иммобилизованы на твердой фазе, а в качестве метки используется ПХ. Чувствительность метода составила 0,15 нг/мл, линейный диапазон определяемых концентраций 0,2 – 100 нг/мл. Было показано, что прямая схема анализа является

более предпочтительной, ввиду своей относительной простоты, экспрессности, точности и чувствительности по сравнению с непрямой схемой анализа.

На основе разработанного метода было проведено определение ХАФ в молоке. Для устранения эффекта матрикса использовались следующие подходы: удаление жирного слоя с помощью центрифугирования молока; разбавление молока; добавление в реакционный буфер казеина; осаждение белковых компонентов молока с помощью ферроцианида калия и сульфата цинка. В последнем случае предел обнаружения составил 0,25 нг/мл, однако процент открытия колебался от 53,3 % до 82,4 %. В случае добавления казеина к буферу было установлено, что компоненты среды и жирность молока не влияют на чувствительность анализа на участке калибровочной кривой, где концентрация ХАФ составляет больше 1 нг/мл. Процент открытия составил от 91 до 108%. Оптимальных результатов удалось добиться при разведении образцов цельного молока в 10 раз. Предел обнаружения составил 0,4 нг/мл и процент открытия 89 – 110%.

Таким образом, был разработан и оптимизирован метод ИФА для количественного определения ХАФ в молоке и определены его аналитические характеристики.