



УДК 543.63; 541.135

Безметочный аффинный сенсор для определения окадаиковой кислоты в морепродуктах

Карасева Н.А., Воронежцева О.В., Ермолаева Т.Н.

Липецкий государственный технический университет, Липецк

Щербакова Е.Ю.

ООО «ФЕКС», Москва

Поступила в редакцию 4.05.2012 г.

Аннотация

Изучена аффинная реакция между антителами к окадаиковой кислоте, иммобилизованными на поверхности сенсора, и токсином в растворе. Рассчитаны константа аффинности антител, константы скорости образования и диссоциации аффинного комплекса. Разработан безметочный аффинный сенсор для определения следовых концентраций окадаиковой кислоты. Градуировочная функция линейна в диапазоне концентраций 5 – 500 нг/мл; предел обнаружения составляет 1,4 нг/мл. Продолжительность анализа не превышает 20-30 мин.

Ключевые слова: пьезокварцевый сенсор, аффинный комплекс, константы скорости образования и разрушения, константа аффинности, моноклональные антитела, окадаиковая кислота, анализ морепродуктов.

The affine reaction between antibodies to okadaic acid, immobilized on the sensor's surface, and toxin in solution was investigated. The constant of affinity, the kinetic constants of formation and dissociation were calculated. The unlabeled affine sensor for detection of trace concentration of okadaic acid was developed. The calibration curve is linear in the range of concentrations 5–500 ng·ml⁻¹, the limit of detection is 1,4 ng·ml⁻¹. The time of analysis does not exceed 20-30 min.

Keywords: piezoelectric sensor, affine complex, the kinetic constants of formation and dissociation, the constant of affinity, monoclonal antibodies, okadaic acid, analysis of marine products

Введение

В последнее время в питании населения все большее значение приобретают рыба и морепродукты, являющиеся важнейшим источником веществ высокой биологической ценности, таких как белки, минеральные вещества, микроэлементы, витамины. Однако морепродукты могут содержать и опасные вещества, одними из которых являются фикотоксины (домоевая кислота, сакситоксин, окадаиковая кислота и др.)

Фикотоксины представляют собой группу токсинов, продуцируемых некоторыми видами водорослей и цианобактериями, которые служат источником пищи моллюсков, некоторых видов рыб, ракообразных, имеющих промысловое значение. К наиболее токсичным фикотоксинам относится окадаиковая кислота (рис.

1), которая может присутствовать в моллюсках (мидии, устрицы, морские гребешки), крабах, омарях, кальмарах и некоторых видах рыб [1]. Окадаиковая кислота, называемая также диарейным ядом (DSP), может стать причиной отравления различной степени тяжести (диарея, тошнота, рвота, общее расстройство пищеварительной системы).

В техническом регламенте Таможенного союза "О безопасности пищевой продукции" для рыбы, нерыбных объектов промысла и продуктов, вырабатываемых из них, предельное содержание окадаиковой кислоты установлено на уровне 0,16 мг/кг [2].

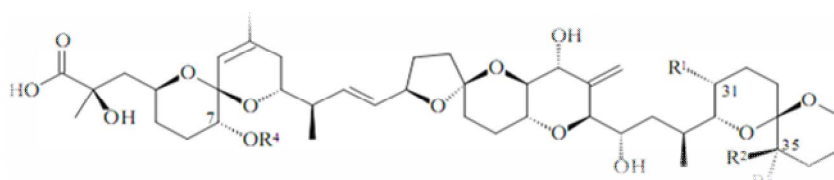


Рис. 1. Структурная формула окадаиковой кислоты

Определение окадаиковой кислоты проводят с применением биотестов на животных, физико-химическими и биохимическими методами [3-11]. К первой группе относят методы, основанные на введении токсина или продукта, содержащего токсин, в тело мышей или крыс с последующим наблюдением за их физиологическим состоянием. Несмотря на низкую стоимость и простоту тестирования, в последнее время многие страны отказываются от биотестов по этическим причинам. Кроме того, такие методы не позволяют проводить количественный анализ [3].

Среди физико-химических преобладают хроматографические методы [4,7], в том числе в тандеме с масс-спектрометрией. Несмотря на возможность высокочувствительного определения окадаиковой кислоты, хроматографические методы не получили широкого распространения из-за необходимости использования дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала, что существенно увеличивает стоимость проведения анализа.

Наибольшее распространение имеют биохимические методы, основанные на ингибировании фосфатазы и иммуноанализе [8-10]. Иммуноферментный твердофазный анализ (ELISA) дает возможность проводить селективное определение окадаиковой кислоты при достаточном простом способе пробоподготовки. К этой же группе относятся методы с применением биосенсоров, характеризующиеся высокой чувствительностью, простотой и рентабельностью, что делает их особенно полезными для рутинного анализа. К настоящему времени разработаны сенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса и пьезокварцевые сенсоры, основным достоинством которых является отсутствие необходимости введения дополнительных меток. Однако, при определении окадаиковой кислоты в конкурентном формате с помощью пьезокварцевого сенсора [11] предел обнаружения составляет 1,9 г/мл, что существенно превышает значение ПДК токсиканта.

Цель настоящей работы – изучение закономерностей обратимой аффинной реакции антиген-антитело, протекающей на поверхности электрода пьезокварцевого сенсора и обоснование условий определения окадаиковой кислоты на уровне ПДК и ниже.

Эксперимент

Реагенты и иммунореагенты. Этанол, ацетон (“Reanal”, Венгрия), роданид калия, соляная кислота, хлорид натрия (“Реахим”, “Лабтех”, Россия), бычий сывороточный альбумин – BSA (Sigma, USA), γ -аминопропилтриэтоксисилан - APTS (“Reanal”, Венгрия), глутаровый альдегид – GA (“Reanal”, Венгрия), пиррол («Вектон», Россия). *Иммунореагенты:* оокадаиковая кислота, моноклональные антитела к оокадаиковой кислоте (At-DSP) (NovusBio, Англия).

Фосфатный буферный раствор (pH 7,2) готовили растворением: 8,0145 г NaCl, 0,2012 г KCl, 2,864 г Na₂HPO₄·12H₂O, 0,204 г KH₂PO₄. в бидистиллированной воде.

Иммобилизация. Поверхность сенсора обрабатывали соляной кислотой, затем обезжиривали ацетоном и высушивали на воздухе при комнатной температуре.

Способ 1. На предварительно обезжиренную поверхность электрода помещали 2,5 мкл 5%-го раствора γ -аминопропилтриэтоксисилана в ацетоне, высушивали на воздухе и выдерживали 20-30 мин при 80°C, затем наносили 5 мкл 5 % свежеприготовленного раствора глутарового альдегида, спустя 15 мин сенсор промывали в буферном растворе и наносили 10 мкл антител. Иммуносенсор помещали во влажную камеру и выдерживали 10–12 час при 4°C.

Способ 2. Предварительно на поверхности золотого электрода методом электрополимеризации формировали полипиррольное покрытие. Для этой цели использовали потенциодинамический режим с циклической разверткой потенциала в диапазоне -0,2 ÷ 0,8 В относительно хлоридсеребряного электрода сравнения со скоростью 10 мВ/с. Для активации поверхности полимера сенсор помещали в камеру с парами глутарового альдегида на 4 час, после чего наносили 10 мкл антител и выдерживали во влажной среде в течении суток. Перед измерением сенсор промывали фосфатным буферным раствором для удаления несвязанных реагентов.

При снижении активности биорецепторного слоя в ходе анализа его удаляли 0,1 М раствором HCl и ацетоном. Для оценки качества иммобилизованного слоя применяли метод пьезокварцевого микровзвешивания.

Пьезокварцевый сенсор и установка для проточно-инжекционного анализа. Физическим преобразователем служил резонатор АТ - срез с собственной частотой колебаний 10 МГц с электродами, полученными магнетронным напылением золота на шлифованную кварцевую пластинку (ЗАО «ЭТНА», Россия).

Исследования проводили на установке, собранной из стандартных блоков, изготовленной на кафедре химии ЛГТУ, включающей дозатор ввода анализируемой пробы, фосфатного буферного и регенерирующего раствора; проточную микроячейку детектирования, в которой иммуносенсор закреплялся с помощью мягких силиконовых прокладок таким образом, чтобы с жидкой фазой контактировала только одна из его сторон; схему возбуждения, трансформирующую изменение массы биорецепторного покрытия в электрический сигнал; перистальтический насос К-120 (Knauer, Германия), цифровой модуль «ДиСкоп» («Бафика», Москва) и персональный компьютер, регистрирующий изменение частоты колебаний резонатора во времени при протекании иммунохимической реакции. Все узлы установки соединены силиконовыми шлангами с внутренним диаметром 0,5 мм. Измерения проводили при температуре 25±5° С. Скорость потока жидкости составляла 60 мкл/мин. В качестве раствора-носителя использовали буферный раствор (pH 7,2).

При проведении анализа анализируемый раствор, содержащий оокадаиковую кислоту, пропускался над поверхностью рецепторного покрытия сенсора. Аналитический сигнал соответствовал максимальному изменению частоты

колебаний сенсора. Для многократного использования рецепторного покрытия сенсора с помощью регенерирующего раствора (0,04 mM раствор KSCN) осуществляли диссоциацию иммунного комплекса. После снижения массы рецепторного слоя более чем на 5 % биослой удаляли и проводили повторную иммобилизацию по методике, описанной ранее.

Пробоподготовка. Морепродукты массой 10 г гомогенизировали, смешивали с 10 мл 0,1 М соляной кислотой и нагревали до 60°C в течение 5 мин при постоянном перемешивании, после центрифугирования в течение 10 мин супернатант отделяли и использовали для анализа.

Обсуждение результатов

Стабильная работа аффинного пьезокварцевого сенсора, предназначенного для определения следовых концентраций оокадаиковой кислоты, зависит от характеристики используемых антител, стабильности биослоя и доступности рецепторных молекул для последующего связывания с аналитом.

Важным этапом исследований являлся выбор оптимального способа иммобилизации антител к оокадаиковой кислоте, способствующего формированию устойчивого покрытия и максимального аналитического сигнала сенсора.

Иммобилизация антител на поверхности золотого электрода осуществлялась в три этапа. Для увеличения адгезии рецепторного слоя предварительно формировали подложку на основе γ -аминопропилтриэтоксисилана (способ 1) или полипиррола (способ 2) [12], поверхность которой активировали глутаровым альдегидом, нанося его в виде раствора (способ 1) или воздействуя парами (способ 2). Затем проводили ковалентное закрепление антител. Свойства рецепторного покрытия оценивались по величине концентрационной чувствительности (S_c), рассчитанной как отношение аналитического сигнала сенсора к концентрации токсиканта, и по числу циклов измерений (N) (табл. 1).

Таблица 1. Выбор оптимальной концентрации антител

| Разведение антител | способ 1 | | способ 2 | |
|--------------------|------------------|----|------------------|----|
| | S_c , Гц·мл/нг | N | S_c , Гц·мл/нг | N |
| 1/5000 | 17.4 | 4 | 9.9 | 5 |
| 1/2500 | 7.8 | 6 | 11.06 | 8 |
| 1/2000 | 4.24 | 12 | 6.08 | 14 |
| 1/1000 | 1.34 | 12 | 3.72 | 15 |
| 1/500 | 0.8 | 10 | 1.8 | 8 |

Изучено влияние концентрации антител, используемых для иммобилизации, на величину S_c , позволяющую дать комплексную оценку равномерности распределения на поверхности биослоя и стерической доступности эпитопов для комплементарного связывания с аналитом. При применении раствора антител с разведением 1/2000 в обоих способах иммобилизации достигаются оптимальные совокупные характеристики покрытия сенсора (S_c , N). На таких покрытиях возможно проведение до 12-14 циклов измерений. В тоже время, иммобилизация антител на подложку из полипиррола предпочтительнее, поскольку в этом случае наблюдаются более высокие значения S_c и N.

Путем проведения кинетических исследований обратимой аффинной реакции с использованием методики Скетчарда [13] установлены константы скорости

образования и разрушения иммунокомплекса. По соотношению констант скоростей рассчитана константа аффинности моноклональных антител.

Значения констант скорости прямой ($0,2 \cdot 10^8$ моль⁻¹·л·с⁻¹) и обратной ($0,06 \cdot 10^{-2}$ с⁻¹) аффинной реакции указывают на доступность эпитопов антител для связывания с оокадаиновой кислотой в обоих способах иммобилизации и трудности разрушения поверхностного иммунокомплекса, что требует на стадии регенерации использования активных хаотропных реагентов. Применение 0,04 М раствора KSCN позволяет существенно ускорить стадию регенерации без разрушения подложки аффинного слоя. Высокое сродство моноклональных антител к оокадаиновой кислоте (константа аффинности - $3,4 \cdot 10^{10}$ М⁻¹) подтверждает возможность высокочувствительного определения токсина с помощью пьезокварцевого аффинного сенсора.

Изучено мешающее влияние на аналитический сигнал сенсора белков, присутствующих в экстракте из морепродуктов (рис. 2). Сопоставление сенсорограмм, полученных для оокадаиновой кислоты и бычьего сывороточного альбумина (BSA), показало, что аналитический сигнал для BSA не превышает сигнала шума. Это свидетельствует о возможности селективного определения токсиканта без предварительного осаждения веществ белковой природы.

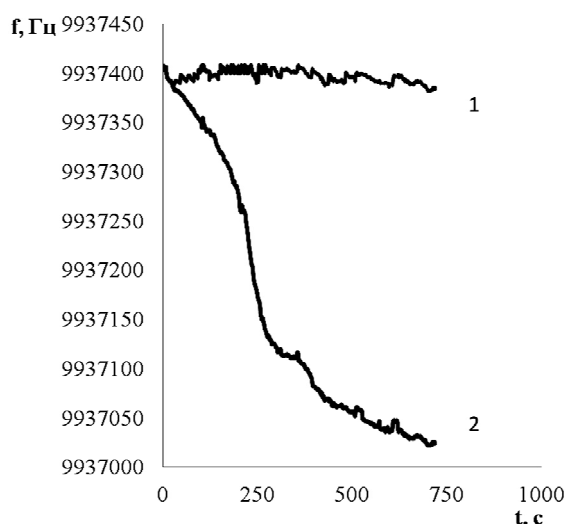


Рис. 2. Сопоставление аналитического сигнала сенсора при связывании BSA (1) и оокадаиновой кислоты (2) с рецепторным слоем

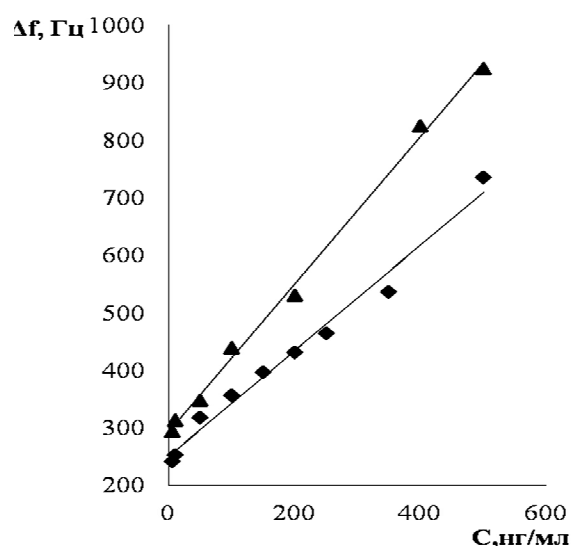


Рис. 3. Градуировочная функция для определения оокадаиновой кислоты (■ - покрытие на основе APTS; ▲ - покрытие на основе полипиррола)

Определение оокадаиновой кислоты осуществляли методом градуировочного графика, полученного с применением стандартных растворов токсиканта с концентрацией 5, 50, 100, 150, 200, 250, 350, 500 нг/мл (рис. 3).

Пробу вводили в поток раствора-носителя и регистрировали изменение частоты колебаний иммуносенсора (Δf , Гц), вызванное образованием на его поверхности иммунокомплекса. Аналитический сигнал сенсора прямо пропорционален концентрации токсина в диапазоне концентраций 5 – 500 нг/мл, предел обнаружения оокадаиновой кислоты составляет 1,4 нг/мл (0,014 мг/кг). Коэффициент чувствительности градуировочной функции сенсора на основе полипиррола (рис. 3), превышает аналогичное значение для сенсора с рецепторным слоем, сформированным способом 1 (1,2 Гц мл/нг и 0,9 Гц мл/нг).

Сенсор апробирован при определении окадаиковой кислоты в морепродуктах. Детектирование токсина проводили в надосадочной жидкости после центрифугирования (табл. 2).

Таблица 2. Определение окадаиковой кислоты в морепродуктах

| Образец | Введено | Найдено | | S _r | Процент открытия, % |
|----------|---------|----------|-------------|----------------|---------------------|
| | нг/мл | нг/мл | мг/кг | | |
| Креветки | | | | | |
| 1 | 5.0 | 4.2±0.5 | 0.042±0.005 | 0.06 | 84 |
| 2 | 10.0 | 10.4±1.2 | 0.10±0.01 | 0.05 | 104 |
| Кальмары | | | | | |
| 1 | 5.0 | 4.3±0.8 | 0.043±0.008 | 0.07 | 86 |
| 2 | 10.0 | 9.7±1.1 | 0.097±0.011 | 0.05 | 97 |

Заключение

Изучена аффинная реакция, протекающая на поверхности электрода сенсора. Методом Скетчарда установлены значения констант скорости связывания и диссоциации аффинного комплекса, константа аффинности моноклональных антител. Показано, что иммобилизация, проводимая с предварительным формированием подложки на поверхности электрода сенсора, ее активацией и последующим ковалентным закреплением антител к окадаиковой кислоте, способствует формированию устойчивого покрытия и максимального аналитического сигнала сенсора.

Градуировочная функция линейна в диапазоне концентраций 5 – 500 нг/мл; предел обнаружения составляет 1,4 нг/мл, что позволяет детектировать токсин в пищевых продуктах на уровне ПДК. Сенсоры апробированы при определении окадаиковой кислоты в морепродуктах.

Список литературы

1. Alexander J., Guðjón Atli Auðunsson, Benford D. Marine biotoxins in shellfish – okadaic acid and analogues // The EFSA Journal. 2008. V.589. P. 1-62.
2. Технический регламент Таможенного союза "О безопасности пищевой продукции" от 9 декабря 2011 года.
3. Marcaillou-Le Baut C, Amzil Z., Vernoux J.P., Pouchus Y.F., Bohec M., Simon J.F. Studies on the detection of okadaic acid in mussels: preliminary comparison of bioassays // Nat Toxins. 1994. V. 2. № 5. P. 312-317.
4. Dickey R. W., Fryxell Greta A., Granade H. R., Roelke Daniel L. Detection of the marine toxins okadaic acid and domoic acid in shellfish and phytoplankton in the gulf of mexico // Toxicon. 1992. V.30. № 3. P. 355-359.
5. Carmody Eoin P., Kelly Sean S., Bishop Alan G., Kevin J. James. Detection methods for okadaic acid and analogues // Seafood and freshwater toxins pharmacology, physiology, and detection. Second Edition Edited by Luis M Botana.
6. Fernández M.L., Cacho A. Míguez E., Martínez A. Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of spanish mussels // Toxicon. 1996. V. 34. Issue 3. P. 381–387.
7. Ji Hoe Kim, Toshiyuki Suzuki, Ka Jeong Lee, Poong Ho Kim, Takashi Kamiyama, Tae Seek Lee. The first detection of okadaic acid and its derivatives in Korean bivalves by

liquid chromatography-mass spectrometry // Fisheries Scienc. 2008. V. 74. Issue 2, P. 433–438.

8. Perry Nigel B., Ellis Gill, Blunt John W., Haystead Timothy A. J., Lake Robin J., Munro Murray H. G. Okadaic Acid in New Zealand Sponges: Detection by Cytotoxicity, Protein Phosphatase Inhibition and Immunoassay techniques // Natural Product Letters. 1998. V. 11. Issue 4.

9. Dubois M., Demoulin L., Charlier C., Singh G., Godefroy SB., Campbell K., Elliott C.T., Delahaut P. Development of ELISAs for detecting domoic acid, okadaic acid, and saxitoxin and their applicability for the detection of marine toxins in samples collected in Belgium // Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo Risk Assess. 2010. 27(6). P. 859-68.

10. Okadaic acid (DSP) ELISA, Microtiter Plate, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the determination of Okadaic Acid in Water and Contaminated Samples, Product No. 520001.

11. Tang Alice X.J., Pravda M., Guilbault George G. Immunosensor for okadaic acid using quartz crystal microbalance // Analytica Chimica Acta. 2002. V.471. P. 33-40.

12. Полетаева Ю.В., Карасева Н.А. Пьезокварцевые иммуносенсоры для определения пенициллина G в продуктах питания на основе электрогенерированных пленок полипиррола // Тез. докл. Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2011». г. Москва. МГУ. 2011. с.54.

13. Joseph K. H. Ma, Jun H. W., Luzzi L. A. Determination of equilibrium constants and binding capacities using a modified scatchard method in drug-protein binding studies // Journal of Pharmaceutical Sciences. 1973. V. 62. Issue 12. P. 2038–2040.

Карасева Надежда Александровна – аспирант кафедры химии Липецкого государственного технического университета, Липецк

Воронежцева Ольга Вячеславовна – к.х.н. кафедры химии Липецкого государственного технического университета, Липецк

Щербакова Екатерина Юрьевна – к.т.н., генеральный директор ООО «ФЕКС», Москва

Ермолаева Татьяна Николаевна – профессор, д.х.н., профессор кафедры химии Липецкого государственного технического университета, Липецк.

Karaseva Nadezhda A. – Postgraduate student of Chemistry Department, Lipetsk State Technical University, Lipetsk, e-mail: karaseva_nadia@mail.ru

Voronezhstseva Olga V. – Candidate of chemistry science of Chemistry Department, Lipetsk State Technical University, Lipetsk

Scherbakova Ekaterine Yu. - Candidate of engineering sciences, general director of LLC “FEKS”, Moscow

Ermolaeva Tatyana N. – Doctor of chemistry science, professor of Chemistry Department, Lipetsk State Technical University, Lipetsk