

*На правах рукописи*



САФРОНОВА Валентина Андреевна

**Экспресс-методы иммуноанализа прогестерона в молоке для  
целей ветеринарной диагностики**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат диссертации на соискание учёной степени  
кандидата химических наук

Москва - 2016

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

**Научный руководитель:**

кандидат химических наук, доцент Химического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

**Осипов Александр Павлович**

**Официальные оппоненты:**

доктор химических наук, профессор, заместитель директора по науке Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, заведующий лабораторией иммунобиохимии

**Дзантиев Борис Борисович**

доктор биологических наук, заведующая лабораторией иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г.Казань)

**Ефимова Марина Анатольевна**

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, Московская область, г. Пущино

Защита состоится «    » декабря 2016 года в 15 часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.59 по защите докторских и кандидатских диссертаций по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.11, МГУ, Химический факультет, кафедра химической энзимологии, аудитория 202.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27, и на сайте Химического факультета МГУ <http://www.chem.msu.ru>.

Автореферат разослан «    » октября 2016 года

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 501.001.59,

кандидат химических наук

Сакодынская И.К.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** В настоящее время одной из наиболее актуальных задач в области аналитической биотехнологии является создание простых биосенсорных устройств, позволяющих осуществлять экспресс-анализ физиологически важных соединений в различных биологических жидкостях. Одним из подходов, активно реализуемых в последнее время в мире для решения практических задач медицинской и ветеринарной диагностики, являются иммунохимические экспресс-методы на основе латерального проточного иммуноанализа (ЛПИА) и иммунофльтрационного анализа (ИФиА). Результатом анализа в таких тест-системах является появление окраски в тестовой зоне, интенсивность которой зависит от концентрации анализируемого вещества. Основные преимущества методов ЛПИА и ИФиА – это простота в использовании, так как все необходимые для проведения анализа специфические компоненты уже содержатся в тест-системах (для анализа требуется всего лишь добавить несколько капель образца); короткое время проведения анализа (как правило, 5-10 минут); возможность визуальной регистрации результата анализа по интенсивности окрашивания тестовой зоны или с помощью специальных портативных детектирующих устройств. Наибольшее распространение на практике такие тест-системы получили в медицинской диагностике, однако в последние годы большое внимание уделяется разработке таких аналитических экспресс-методов для целей ветеринарной диагностики. Одной из важных практических задач для современных животноводческих молочных хозяйств является раннее определение стельности коров, которое позволяет улучшить воспроизводство молочного стада, на ранних стадиях выявлять заболевания органов репродуктивной системы коров, а также существенно сократить затраты на содержание яловых животных и осеменение. Традиционные методы определения стельности коров, такие как ректальный метод и метод ультразвукового сканирования, позволяют получить достоверные результаты, начиная с 30 дня после осеменения, но требуют наличия дорогостоящего оборудования и высокой квалификации ветеринарных врачей. Методы иммунохимического анализа по уровню прогестерона (ПГ) позволяют получить достоверный результат уже на 19-21 сутки после осеменения. Принцип выявления стельности с помощью иммунохимических методов анализа заключается в определении концентрации видонеспецифического гормона ПГ в молоке или сыворотке крови коров. Молоко является более доступным биоматериалом, содержание ПГ в молоке выше, чем в сыворотке крови из-за липофильной структуры ПГ, поэтому анализ ПГ предпочтительней проводить в образцах цельного молока. Концентрация ПГ в молоке для стельной коровы составляет более 10-15 нг/мл во

время всего периода стельности, и уже на 19-21 сутки после осеменения существенно превышает уровень ПГ для нестельной коровы. Однако иммунохимические методы не получили широкого распространения ввиду необходимости проведения таких анализов в лабораториях, оснащенных специальным оборудованием, а также проблемы сохранения в специальных условиях (например, в замороженном виде) и доставки отобранных в хозяйстве проб молока в лаборатории, часто находящиеся на значительном расстоянии от фермы.

Основным направлением исследований в работе является создание высокочувствительных простых экспресс-систем для полуколичественного или количественного иммуноанализа ПГ в цельном молоке коров с целью раннего определения стельности и возможностью проведения анализа и регистрации его результатов в полевых условиях.

**Цели и задачи исследования.** Целью настоящей работы является разработка быстрых тест-систем для количественного и полуколичественного иммунохимического определения низкомолекулярного гормона ПГ в цельном молоке коров для раннего выявления стельности.

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие задачи:

- получить и охарактеризовать иммунохимические реагенты разрабатываемых аналитических тест-систем, содержащих различные виды меток;
- определить количественные характеристики и условия регистрации ферментной метки в тестовой зоне разрабатываемых тест-систем ЛПИА и ИФиА, а также изучить влияние структуры и компоновки пористых мембранных компонентов на аналитические характеристики анализа;
- разработать эффективные форматы и методики проведения экспресс-определения ПГ в цельном молоке коров на основе принципов ЛПИА и ИФиА, отработать способы количественной регистрации результатов определения ПГ;
- оптимизировать условия проведения разработанных схем экспресс-иммуноанализа ПГ в водных растворах и цельном коровьем молоке для определения уровня ПГ в необходимом диапазоне концентраций;
- апробировать разработанные тест-системы на образцах цельного молока с целью раннего выявления стельности коров;
- провести сравнительную оценку результатов разработанных экспресс-тестов, с результатами, полученными с использованием стандартных наборов реагентов для количественного иммуноферментного анализа (ИФА) ПГ в цельном молоке коров.

**Научная новизна.** Разработаны основные принципы создания быстрых тест-систем для определения низкомолекулярных веществ на примере гормона ПГ в водных растворах и цельном молоке коров. В работе разработан новый высокочувствительный экспресс-метод анализа ПГ на основе принципа ЛПИА с использованием в качестве метки пероксидазы хрена (ПХ) (латеральный проточный иммуноферментный анализ - ЛПИФА). Определены количественные характеристики и условия регистрации ферментной метки в тестовой зоне разрабатываемых тест-систем, изучено влияние структуры и компоновки пористых мембранных компонентов на аналитические характеристики анализа, определены оптимальные условия регистрации аналитического сигнала; изучено влияние белков, детергентов на проведение анализа и регистрацию аналитического сигнала, оптимизированы условия проведения анализа в образцах цельного молока.

Разработан новый количественный и визуальный экспресс-метод определения ПГ на основе принципа ИФиА с использованием в качестве метки фермента - пероксидазы хрена. Разработанный экспресс-метод позволяет в течение 10-15 минут выявлять уровень ПГ в цельном молоке в необходимом для раннего выявления стельности коров диапазоне концентраций, не требует применения дорогостоящего оборудования и позволяет осуществлять анализ во внелабораторных условиях.

**Практическая значимость работы.** В результате проведенных исследований созданы простые тест-системы для количественного и полуколичественного определения низкомолекулярного гормона ПГ в цельном молоке коров. Предложенные экспресс-тесты на основе принципов ЛПИФА и ИФиА были использованы в молочных хозяйствах для раннего определения стельности коров. Эффективность разработанных аналитических систем была подтверждена сравнением с результатами, полученными стандартным высокочувствительным методом твердофазного ИФА, а для метода ЛПИФА - и традиционным ректальным методом. Основными преимуществами разработанных экспресс-тестов являются простота и небольшое время проведения анализа, возможность его проведения в полевых условиях с визуальной оценкой получаемых результатов, низкая стоимость.

**Апробация работы.** Основные результаты работы представлены на VI Всероссийской конференции-школе «Высокореакционные интермедиаты химических и биохимических реакций» (Москва, 2011), VII Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2013), XVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013» (Москва, 2013), Международной конференции «Биокатализ-2013: Фундаментальные основы и применение» (Москва, 2013), IX Международной конференции молодых ученых по химии «Менделеев 2015» (Санкт-Петербург, 2015),

VI Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения – 2015» (Санкт-Петербург, 2015), 10-й Международной конференции «Биокатализ-2015» (Москва, 2015), I Всероссийской конференции с международным участием "Химический анализ и медицина" (Москва, 2015), IX Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015), Фестивале науки и студентов, аспирантов и молодых ученых "Наука и молодежь: новые идеи и решения в АПК" (Иваново, 2016), Международном форуме "Ломоносов-2016. Научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых Инновации в химии: достижения и перспективы", (Москва, 2016)

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 14 работ, в том числе 2 статьи в изданиях, индексируемых в базах данных «Web of Science» и "Scopus" и входящих в Перечень журналов ВАК, 9 тезисов докладов на международных и российских конференциях.

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (глава 1), экспериментальной части (глава 2), результатов и обсуждения (главы 3), выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 139 страницах, содержит 12 таблиц и 67 рисунков. Список литературы включает 201 ссылку.

**Используемые сокращения.** ИФА – иммуноферментный анализ, ЛПИА – латеральный проточный иммуноанализ, ЛПИФА – латеральный проточный иммуноферментный анализ, ИФиА – иммунофилтратационный анализ, ПГ – прогестерон, ПХ – пероксидаза хрена, БСА - бычий сывороточный альбумин, ПГ-ОВА – конъюгат прогестерона с овальбумином, ПГ-ПХ – конъюгат прогестерона с пероксидазой хрена.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ**

### **1. Метод ЛПИА с коллоидным золотом в качестве метки для определения ПГ**

***1.1. Получение наночастиц коллоидного золота и конъюгата ПГ-ОВА, меченного золотыми наночастицами.*** Для разработки метода ЛПИА ПГ в качестве метки было выбрано коллоидное золото. Растворы коллоидного золота с заданным размером частиц получали по методу Френса путем восстановления в водном растворе золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия. Было получено два препарата со сферическими наночастицами золота со средним диаметром 16 и 35 нм, охарактеризованных по размерам электронномикроскопическими и спектральными методами. При разработке ЛПИА ПГ в качестве основной схемы анализа использовали конкурентную схему, а в качестве меченного золотом реагента - ПГ. Так как ПГ низкомолекулярное вещество, то для сохранения возможности его

взаимодействия с антителами золотыми наночастицами метили конъюгат ПГ с высокомолекулярным белком овальбумином (ОВА).

**1.2. Оптимизация метода ЛПИА для определения ПГ.** Для проведения ЛПИА с коллоидным золотом в качестве метки собирали тест-полоску согласно схеме, представленной на Рис.1.

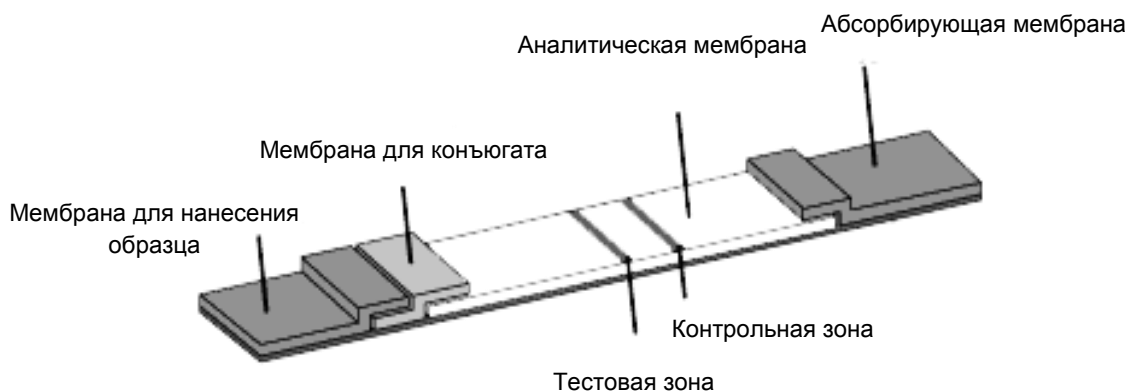


Рис.1. Общий вид тест-полоски для ЛПИА.

Поскольку ПГ является низкомолекулярным веществом, для разработки метода ЛПИА ПГ использовали конкурентную схему, представленную на Рис.2.

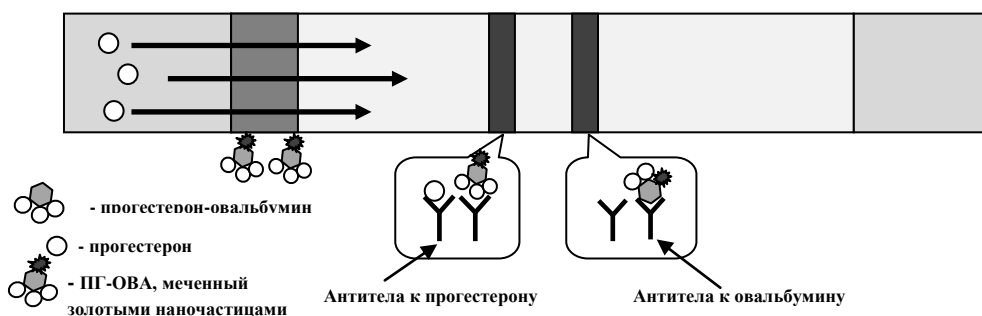


Рис.2. Конкурентная схема проведения ЛПИА ПГ.

В тестовой и контрольных зонах аналитической мембраны иммобилизованы поликлональные антитела к ПГ и антитела к овальбумину (ОВА), а на мембране для конъюгата сорбирован комплекс золотых наночастиц с ПГ-ОВА. При наличии ПГ в пробе при прохождении раствора через тестовую линию происходит конкурентное взаимодействие свободного ПГ и конъюгата ПГ-ОВА, меченного золотыми наночастицами, с центрами связывания специфических антител. В таком случае в тестовой зоне количество связанного с антителами меченного золотом ПГ-ОВА уменьшается, при этом величина аналитического сигнала, соответствующего интенсивности окраски линии, меняется обратно пропорционально концентрации ПГ в пробе. Для количественного измерения интенсивности окраски использовали предварительное сканирование получаемых тестовых зон и обработку изображений с помощью программного обеспечения ScionImage. Для наночастиц золота большего размера наблюдалась более интенсивная окраска тестовой линии, что позволило

использовать меньшее количество меченого конъюгата в системе. Тем не менее, калибровочные зависимости для золотых наночастиц размером 35 и 16 нм практически идентичны и позволяют определять ПГ в диапазоне концентраций более 10 нг/мл (Рис.3А). Так как конечной задачей является выявление стельности коров, уровень ПГ необходимо определять в физиологическом диапазоне концентраций менее 10 нг/мл, а следовательно, метод анализа должен обладать меньшим пределом обнаружения. Первоначально для этого была рассмотрена модифицированная схема анализа, в которой в тестовой линии нанесен белок А. Особенность данной схемы заключается в следующем. Все реагенты: конъюгат ПГ-ОВА, меченный золотыми наночастицами и свободный ПГ, содержащийся в анализируемой пробе, а также антитела, специфичные к ПГ пропускают по тест-полоске одновременно, поэтому создаются условия истинной конкуренции между меченым и немеченым реагентами за центры связывания антител, которые присутствуют в растворе. Далее антитела, содержащие золотые наночастицы, количество которых обратно пропорционально концентрации свободного ПГ в пробе, связываются Fc-фрагментом с белком А, что обеспечивает их эффективное удерживание в зоне тестовой линии. Однако и в такой схеме анализа не удастся значительно сместить рабочий диапазон измеряемых концентраций в необходимую область значений.

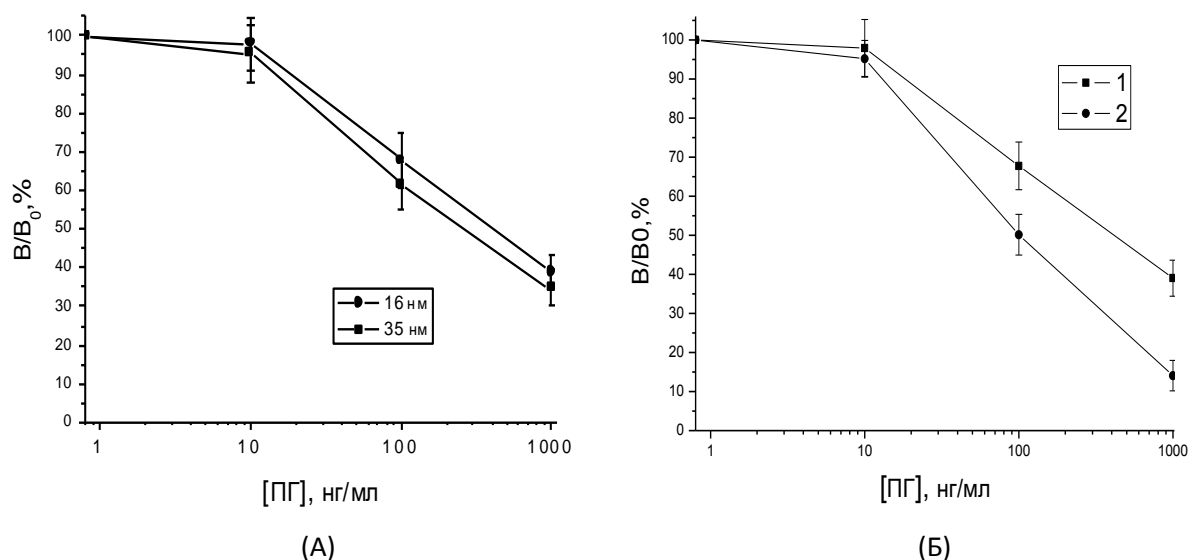


Рис. 3. Калибровочные зависимости ЛПИА ПГ, полученные для золотых наночастиц размером 16 нм и 35 нм (А) и калибровочные зависимости ЛПИА ПГ для сорбированных в тестовой зоне: 1- антител, специфичных к ПГ и 2 - белка А (Б).

В результате проведенных экспериментов было установлено, что при использовании в качестве метки коллоидного золота предел обнаружения в конкурентной схеме анализа недостаточен для определения ПГ в концентрациях ниже



10 нг/мл. Это объясняется тем, что в данной конкурентной схеме анализа для получения достоверно регистрируемой окраски тестовой зоны необходимо использовать достаточно высокие концентрации антител (0,2 мг/мл). Снижение количества иммобилизованных антител в тестовой линии, которое теоретически должно приводить к улучшению предела обнаружения, ограничено необходимостью проявления видимой окраски тестовой линии для последующей визуальной или инструментальной оценки величины сигнала. Кроме того, этой же причиной обусловлена и невозможность использования меньших концентраций конъюгата золотых частиц с ПГ, также приводящих к уменьшению предела обнаружения в конкурентной схеме анализа. Поэтому для дальнейшей разработки быстрого теста определения ПГ в более низком диапазоне концентраций было предложено использовать в ЛПИА ферментную метку, детекцию которой можно проводить в гораздо меньших концентрациях по сравнению с золотыми наночастицами. Метод ЛПИА с использованием ферментной метки было предложено в дальнейшем назвать латеральным проточным иммуноферментным анализом (ЛПИФА).

## **2. Разработка ЛПИФА - метода латерального проточного иммуноанализа с ферментной меткой для определения ПГ**

Для разработки метода ЛПИФА в качестве метки использовали пероксидазу хрена (ПХ). Конъюгат 3-О-карбоксиметилоксимпрогестерона с ПХ (ПГ-ПХ) получали карбодиимидным методом. В отличие от ЛПИА с коллоидным золотом в качестве метки, конъюгат ПГ-ПХ применяли в жидком виде, так как при высушивании данного раствора на мембране для конъюгата, фермент полностью терял активность. Поэтому для разработки метода тест-полоску компоновали согласно упрощенной схеме без использования мембраны для конъюгата (Рис.1). В тестовой зоне сорбировали специфические антитела, а в контрольной зоне - антитела к ПХ. При проведении анализа на начальный участок аналитической мембраны наносили смесь 10 мкл конъюгата ПГ-ПХ и 120 мкл стандартного раствора ПГ, после того как раствор полностью впитывался, тест-полоску погружали в пробирку с раствором субстрата и инкубировали в течение 5 мин. Далее проводили визуальную и инструментальную оценку результата по интенсивности окрашивания тестовой зоны продуктами ферментативной реакции.

**2.1. Влияние концентрации фермента и времени на регистрацию аналитического сигнала.** В данной тест-системе окрашивание тестовой линии происходит в процессе проведения дополнительной стадии – реакции ферментативного окисления пероксидом субстрата - 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). Дополнительное использование в субстратной смеси декстрансульфата

значительно снижает растворимость продукта окисления ТМБ за счет его комплексообразования, что позволяет локализовать продукты ферментативного окисления в тестовой линии

Первоначально была установлена пропорциональность между интенсивностью образующейся окраски тестовой линии и количеством фермента, локализованного в тестовой линии устройства (Рис.4А). Наносили раствор субстрата на тестовую зону и измеряли интенсивность окрашивания полоски спустя 5 минут после начала реакции. При высыхании мембраны интенсивность окрашивания тестовой линии несколько уменьшалась, однако сигнал, полученный с высушенной мембраны в течение часа практически не изменялся (Рис. 4Б). Было показано, что измеряемый аналитический сигнал остается достаточно стабильным в течение часа после окрашивания тест-полоски при различных концентрациях ПХ. Таким образом, было установлено, что для количественной интерпретации результатов анализа можно измерять интенсивность окрашивания тестовой полосы через 10 минут после добавления субстратного раствора и высыхания полоски.

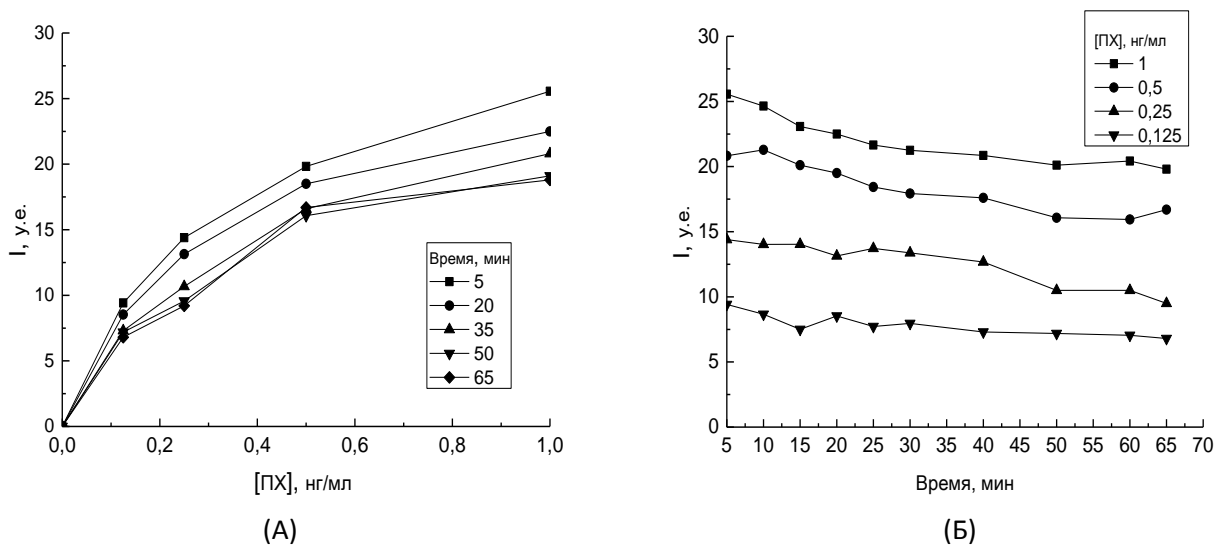


Рис.4. Зависимость интенсивности аналитического сигнала для разных концентраций ПХ от концентрации фермента (А) и времени (Б).

**2.2. Выбор мембранных компонентов.** Выбор мембран при разработке аналитического метода, основанного на проведении реакции в латеральном потоке жидкости в мембране, является одним из ключевых моментов. В работе были использованы различные виды коммерческих аналитических мембран фирмы MDI (Индия). При выборе оптимальной для анализа мембраны рассматривались такие параметры как средний размер пор, степень связывания белков, а также способность пропускать цельное молоко. Данные характеристики оказывают значительное влияние на протекание анализа. Например, при увеличении размера пор

увеличивается скорость потока жидкости в мембране, соответственно уменьшается время анализа, но наблюдается заметное размывание тестовой и контрольных линий, что затрудняет визуальную детекцию результата. Наиболее оптимальными мембранами по соотношению сигнал-фон для анализа ПГ оказались мембраны с размером пор 8 мкм и 10 мкм. Данные мембраны также позволяют получать четкую визуализацию результата в тестовой зоне (Рис.5).

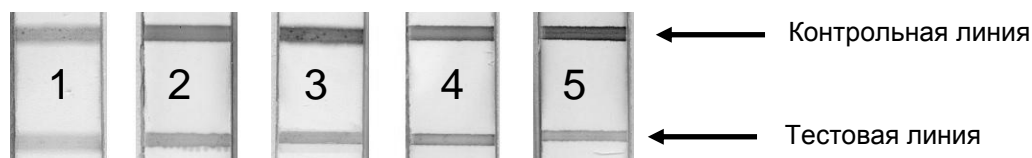


Рис.5. Вид тестовой и контрольной линий при определении ПГ для аналитических мембран (MDI, Индия) с разным размером пор: 1 – CNPC (15 мкм), 2 – CNPH (12 мкм), 3 – CNPF (10 мкм), 4 – CNPF (8 мкм), 5 – CNPF (5 мкм).

Конечной целью данной работы является проведение анализа в цельном молоке коров. Цельное молоко имеет сложный состав и, кроме того, состав молока, в частности жирность, может варьироваться от животного к животному. Вариабельность исследуемых образцов может оказывать большое влияние на проведение анализа и, как следствие, на определение анализируемого вещества. В частности, гетерогенный состав образца может затруднять протекание образца по мембранам, что создает дополнительные трудности при работе с реальными образцами. Поэтому было необходимо выбрать оптимальную мембрану для определения ПГ в цельных образцах молока. Было установлено, что для мембраны с размером пор 5 мкм наблюдалась очень низкая скорость потока образца, фронт его распространения вдоль полоски мембраны едва достигал тестовой зоны аналитической мембраны. Аналогичная ситуация наблюдалась и для мембраны с размером пор 8 мкм. Однако уже для мембраны с размером пор 10 мкм наблюдалось значительное увеличение скорости потока, соответственно сократилось время анализа до ~10 мин, и фронт образца доходил до конца тест-полоски. Таким образом, для конечного использования в анализе выбрали мембрану с оптимальным размером пор 10 мкм.

Еще одной важной задачей при разработке ЛПИФА является выбор мембраны для нанесения образца, которая бы обеспечивала равномерное протекание образца по тест-полоске. На данном этапе были отобраны коммерческие мембраны для нанесения образца, которые различались по своей структуре и компонентам, входящих в их состав. Было показано, как в зависимости от типа мембраны меняется чувствительность анализа (Рис.6). Например, для концентрации ПГ 10 нг/мл процент ингибирования в случае мембраны FR1 фирмы MDI с толщиной 0,6 мм достигает

80%, в случае аналогичной мембраны FR1, но с толщиной 0,35 мм - 60%. Мембрана R7 в своем составе согласно описанию производителя содержит детергент, поэтому в данном случае образец движется по мембране быстрее, и процент ингибирования для концентрации ПГ 10 нг/мл снижается до 55 %. Таким образом, на результат анализа влияют такие факторы как толщина мембраны, наличие детергентов в составе, а также материал, из которого изготовлена мембрана. Как видно из представленной диаграммы, наилучшие характеристики анализа обеспечивает мембрана Arista Biologicals (США). Данный эксперимент проводился в буферной системе, содержащей ПГ.

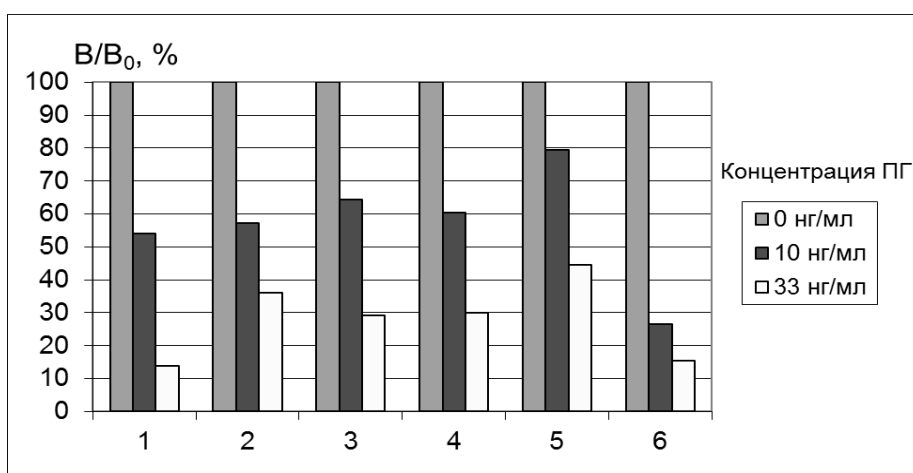


Рис.6. Зависимость относительной интенсивности сигнала от концентрации ПГ для разных типов коммерческих мембран для нанесения образца: 1 – R7; 2 – R4; 3 – WF1; 4 – FR1(0,35); 5 – FR1(0,6); 6 - Arista.

**2.3. Проведение анализа ПГ в цельном молоке коров.** Так как уровень ПГ необходимо определять в цельном молоке, был проведен эксперимент по выбору мембраны, обладающей наилучшими свойствами по протеканию в них образцов молока. Были собраны комбинации аналитических мембран и мембран для нанесения образца, и на каждую тест-полоску наносили одинаковый объем свежего образца молока. Далее через 10 минут после нанесения, измеряли расстояние, которое прошел образец по тест-полоске. На Рис.7 представлен результат данного эксперимента. Видно, что для комбинаций с аналитической мембраной CNPF 5 мкм, фронт образца практически не доходит до впитывающей мембраны, которая обеспечивает равномерный поток. Следовательно, это затруднит при анализе визуализацию результата, а также будет искажать реальные результаты, так как не весь ПГ в анализируемой пробе достигнет тестовой линии. Аналогичная ситуация наблюдается для комбинации, где в качестве мембраны для нанесения образца используют мембрану FR1 (0,6). Наилучший результат достигается при использовании комбинации аналитических мембран с большим размером пор: CNPC, CNPH, CNPF

(10 мкм) и мембран для нанесения образца: R7, R4, WF1, FR1 (0,35). На предыдущем этапе работы для буферной системы в качестве оптимальной была выбрана аналитическая мембрана CNPF (10 мкм). Поэтому далее провели сравнение по чувствительности анализа комбинаций аналитической мембраны CNPF (10 мкм) с мембранами для нанесения образца R7, R4, WF1, FR1 (0,35). Исходя из данных по чувствительности для данных комбинаций, была выбрана оптимальная комбинация аналитической мембраны CNPF (10 мкм) и мембраны для нанесения образца R7, в состав которой входит детергент.

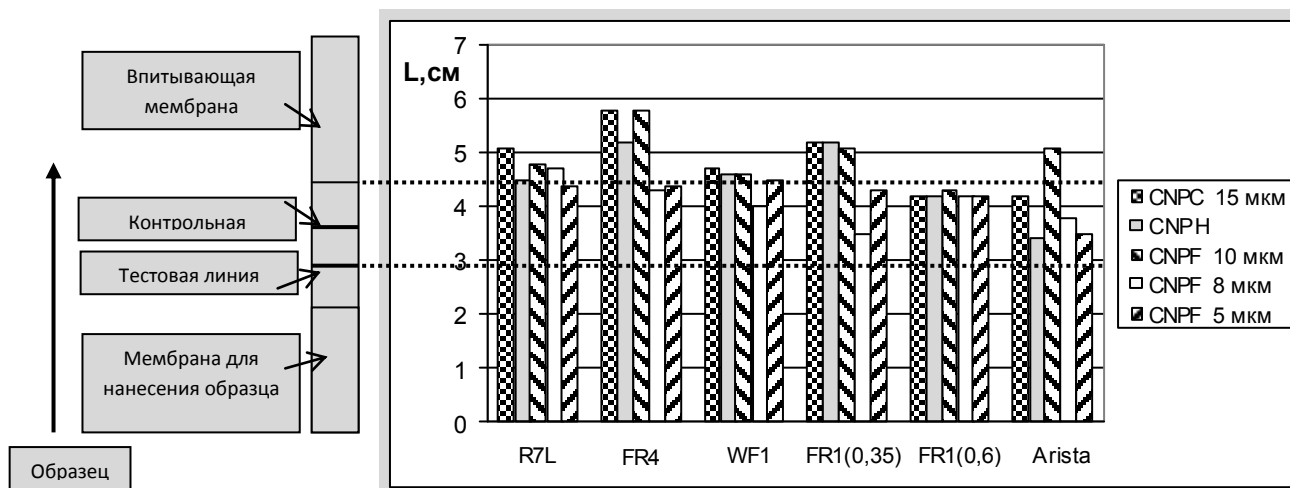


Рис.7. Значения расстояний протекания фронта образцов молока по тест-полоске за 10 минут для комбинаций различных видов аналитической мембраны и мембраны для нанесения образца.

На основе выбранных мембранных компонентов была создана тест-система для определения ПГ в молоке коров методом ЛПИФА. Полученная калибровочная зависимость для определения ПГ представлена на Рис.8А. Определение концентрации ПГ проводили следующим образом: на мембрану для образца наносили смесь анализируемого образца и меченого реагента, когда раствор впитался (~10 мин), тест-полоску помещали в пробирку с субстратной смесью для проведения ферментативной реакции. Интенсивность окрашивания тестовой зоны регистрировали визуально или инструментально через 10 минут. Предел обнаружения метода составил 1 нг/мл.

На Рис. 8Б представлен внешний вид полосок для определения ПГ в необходимом диапазоне изменения концентраций ПГ. Известно, что стельными являются коровы, в молоке которых концентрация ПГ более 7-10 нг/мл. Для разработанной системы при концентрации ПГ в области 7-10 нг/мл наблюдается слабая окраска тестовой зоны, которую можно визуально отличить от более низких концентраций ПГ, при более высоких концентрациях ПГ окраска тестовой зоны отсутствует. Из рисунка видно, что определение стельности при использовании данного метода может проводиться по принципу «да-нет» для концентрации ПГ

менее 3 нг/мл и более 30 нг/мл. Разработанный новый метод ЛПИФА был применен для количественного определения ПГ в цельном молоке коров.

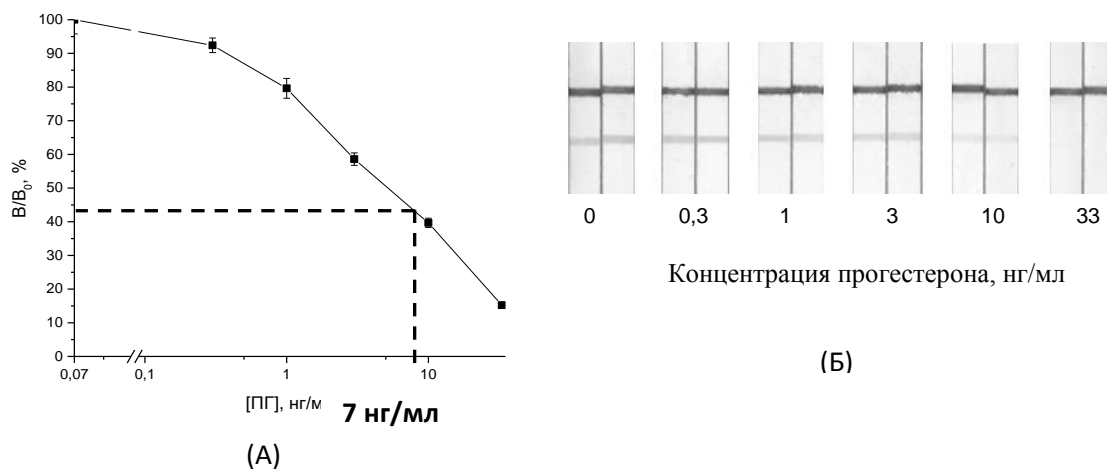


Рис.8. Калибровочная зависимость ЛПИФА ПГ (А) и визуальный результат определения ПГ в диапазоне концентраций 0-33 нг/мл (Б).

Для определения стельности использовали пробы цельного молока, отобранные как у стельных коров, так и нестельных, находящихся на разных стадиях полового цикла. Непосредственно перед добавлением на тест-полоску образец тщательно встряхивали, смешивали с аликвотой конъюгата ПГ-ПХ и добавляли на тест-полоску. Таким образом, было проанализировано 47 образцов цельного молока. Для проверки эффективности разработанного метода ЛПИФА для определения стельности коров, полученные результаты сравнили со стандартным ректальным методом. Методом ЛПИФА было определено 46,8% образцов от общего числа как принадлежащие стельным животным, что было подтверждено ректальным методом, и 44,7% образцов были диагностированы как принадлежащие нестельным животным. Так как было выявлено 8,5% ложноотрицательных образцов, чувствительность метода составила 84%, а специфичность теста – 100%.

Эффективность разработанной тест-системы для количественного определения ПГ в молоке коров была подтверждена сравнением с высокочувствительным стандартным методом твердофазного ИФА. Было показано, что данные хорошо коррелируют друг с другом (Рис. 9), т.е. разработанный экспресс-тест ЛПИФА ПГ может также применяться для количественной оценки содержания ПГ в молоке.

Таким образом, разработанный метод ЛПИФА позволяет количественно определять уровень ПГ в цельном молоке коров в диапазоне концентраций от 2 до 40 нг/мл, а также позволяет проводить полуколичественный анализ с целью определения стельности у коров. Время проведения анализа составляет 20 мин. Процедура его проведения проста и не требует специальных навыков и оборудования, что позволяет применять разработанную тест-систему непосредственно в молочных хозяйствах.

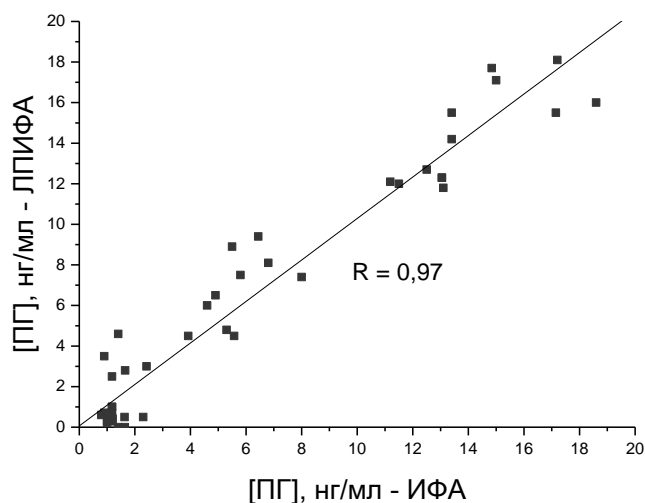


Рис. 9. Корреляция методов ИФА и ЛПИФА ПГ в цельном молоке коров.

### 3. ИФиА ПГ с использованием в качестве метки коллоидного золота

Метод ИФиА (в английской литературе flow-through immunoassay) является одним из экспресс-вариантов проточного твердофазного иммуноанализа. Данный метод основан на использовании аналитических пористых мембран в качестве носителя, на котором иммобилизованы взаимодействующие с антигеном антитела, а поток жидкости, содержащий анализируемый образец и реакционные компоненты, проходит через мембрану в поперечном направлении (перпендикулярно плоскости мембраны). Для эффективного прохождения потока через мембрану обычно используют вакуумные насосы или слой гигроскопичного сорбента, контактирующий с нижней стороной аналитической мембраны. ИФиА, как правило, включает несколько стадий пропускания реагентов через мембрану, чередующихся с промывкой мембраны от несвязавшихся реагентов. Также, как и метод ЛПИА данный вид анализа относится к быстрым методам, так как, несмотря на использование твердой фазы, кинетика взаимодействия антиген-антитело на границе вода-твердая фаза не лимитируется диффузией реагентов, что позволяет проводить весь анализ в течение 10-15 минут.

**3.1 Оптимизация условий проведения ИФиА ПГ.** Для метода ИФиА ПГ с коллоидным золотом в качестве метки, была использована конкурентная схема анализа. Наночастицы золота размером 20 нм и конъюгат ПГ-ОВА, меченный золотыми наночастицами, получали аналогичными методами, используемыми при разработке метода ЛПИА. Для проведения ИФиА использовали схему, где в тестовой зоне сорбированы специфические антитела, и для сравнения - схему, где в тестовой зоне сорбирован белок А. Результаты эксперимента представлены на Рис.10.

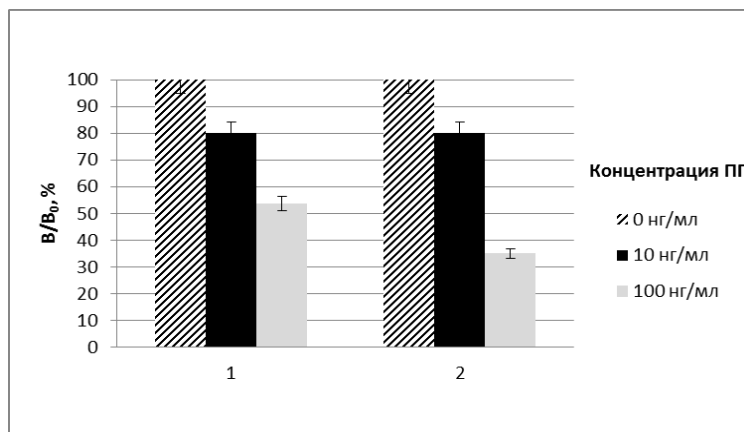


Рис.10. Зависимость относительной интенсивности сигнала метода ИФиА для определения ПГ от концентрации ПГ для схем анализа, где: 1- в тестовой зоне антитела к ПГ, 2- в тестовой зоне белок А.

Следует заметить, что для обеих схем определение ПГ возможно в диапазоне концентраций значительно выше 10 нг/мл, что в несколько раз превышает диапазон, необходимый для детекции ПГ в молоке. Таким образом, полученный результат согласуется с данными метода ЛПИА с коллоидным золотом. Поэтому для определения ПГ в необходимой области концентраций 5-15 нг/мл, далее также была использована ферментная метка.

#### 4. Разработка ИФиА ПГ с использованием ферментной метки

**4.1. Подготовка тест-кассеты.** Для разработки ИФиА ПГ в качестве ферментной метки использовали ПХ, которая является одной из наиболее широко используемых меток в ИФиА. Для проведения анализа собирали специальные тест-кассеты, схема строения которых представлена на Рис.11.

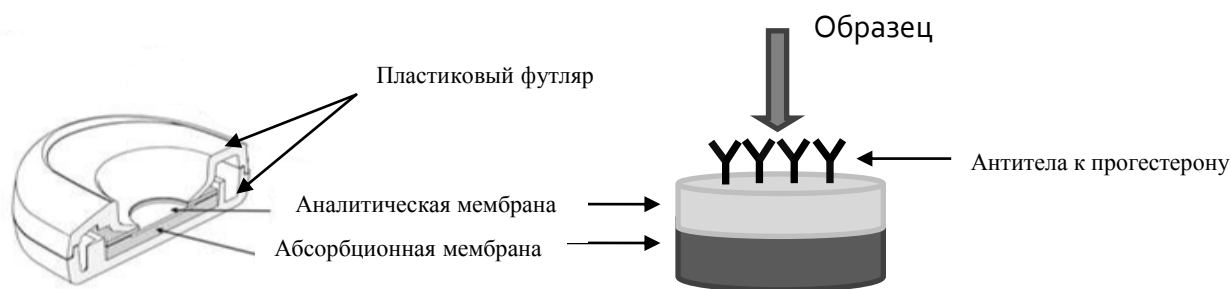


Рис.11. Тест-кассета для проведения ИФиА.

Тест-кассета состоит из пластикового футляра, в который помещают слой впитывающей мембраны и поверх нее пористую аналитическую мембрану (2x2 см). Как и в методе ЛПИА, для проведения анализа использовали конкурентную схему. На аналитической мембране в двух рядом расположенных круговых зонах диаметром ~1 мм иммобилизовали, соответственно, специфические антитела к ПГ и антитела к ПХ. Анализ ПГ методом ИФиА проводили следующим образом: в окошко тест-кассеты



наносили смесь стандартного раствора ПГ и конъюгата ПГ-ПХ. Далее несвязавшийся конъюгат промывали раствором ФБСТ (0,01 М К-фосфатный буфер, рН 7,4, содержащий 0,15 М NaCl, 0,1% Твин-20) и добавляли субстратную смесь, содержащую ТМБ, пероксид и декстрансульфат. Через 5 минут проводили визуальную оценку результата, сравнивая эффективность окраски тестовой зоны и зоны сравнения. При проведении анализа в данных условиях наблюдался довольно высокий неравномерный фоновый сигнал, что существенно осложняло как инструментальную, так и визуальную оценку результата. Для устранения данной проблемы, после иммобилизации антител, аналитическую мембрану обрабатывали 1%-м раствором казеина в ФБС (0,01 М К-фосфатный буфер, рН 7,4, содержащий 0,15 М NaCl).

В работе в качестве аналитических были исследованы нитроцеллюлозные и нейлоновые мембраны. Последние показали низкую воспроизводимость результатов, поэтому далее в работе не рассматривались. Наилучшими характеристиками обладает мембрана CLW-040-SH34 (MDI, Индия), у которой слой нитроцеллюлозной аналитической мембраны нанесен непосредственно на впитывающую мембрану (Рис. 12, мембрана №2). По-видимому, за счет более плотного прилегания аналитической мембраны к сорбенту обеспечивается более равномерный поток реагентов и уменьшается время проведения анализа.

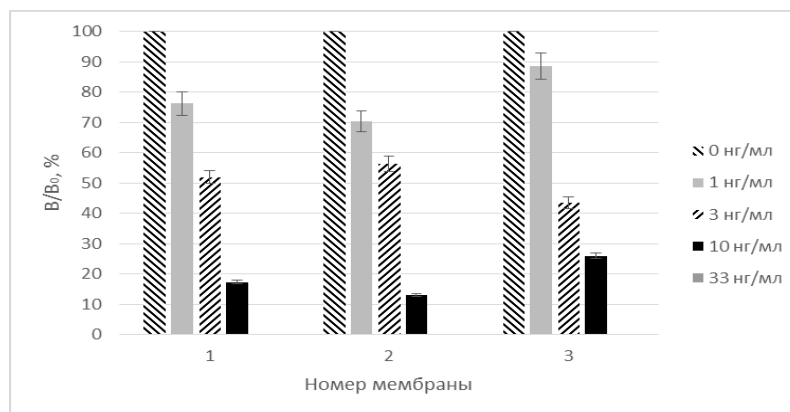


Рис.12. Зависимость относительной интенсивности сигнала от концентрации ПГ для аналитических мембран: 1 - CNJ-X1 (размер пор 0,45 мкм), 2 - CLW-040-SH34 (размер пор 0,45 мкм), CLW-040-SH34 (размер пор 0,80 мкм).

**4.2. Определение оптимальных характеристик регистрации протекания субстратной реакции на мембранах.** Для разработки количественного метода проведения ИФиА прежде всего необходимо было подобрать условия проведения реакции, при которых величина интенсивности окраски тестовой зоны однозначно соответствовала количеству ферментной метки, а следовательно, и измеряемой концентрации ПГ в растворе. Была изучена зависимость интенсивности окрашивания тестовой зоны от времени для разных концентраций конъюгата ПГ-ПХ (Рис.13А).

Установлено, что регистрируемый сигнал пропорционален концентрации ПГ-ПХ. В тестовой зоне наблюдается постепенное развитие окраски, что объясняется кинетикой протекания ферментативной реакции в порах мембраны (Рис.13А). В течение 30 мин интенсивность окраски возрастает ~на 25%.

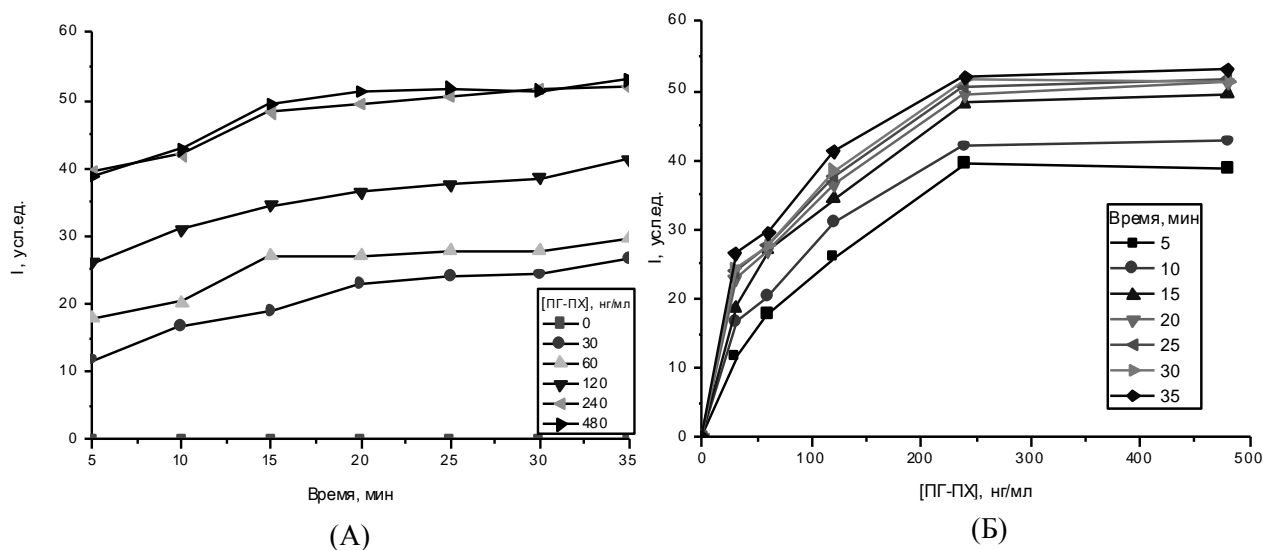


Рис.13. Зависимость интенсивности сигнала для разных концентраций конъюгата ПГ-ПХ от времени (А) и от концентрации конъюгата ПГ-ПХ (Б).

Из анализа данных, представленных на рис.13Б следует, что в диапазоне концентраций конъюгата ПГ-ПХ от 0 до 250 нг/мл интенсивность окраски пятна однозначно связана с количеством ПХ, содержащейся в порах мембраны. Следовательно, в этом диапазоне концентраций конъюгата его количество будет соответствовать измеряемому количеству ПГ в растворе. Было показано, что после начального окрашивания мембраны под действием субстратного раствора, измеряемый аналитический сигнал, соответствующий интенсивности окрашивания, остается стабильным в течении часа (Рис.14). Регистрацию результата можно проводить как через 5 мин после окрашивания мембраны, так и через час, так как пропорциональность результата сохраняется. Было показано, что при добавлении большего объема субстрата сигнал становится более стабильным, а также получаемые данные обладают меньшей вариабельность по сравнению с данными, полученными при добавление небольшого объема субстрата (~100 мкл). Это свидетельствует о том, что при добавлении меньшего количества субстрата ферментативная реакция протекает медленнее, что замедляет процесс развития окраски тестовой и контрольных зон.

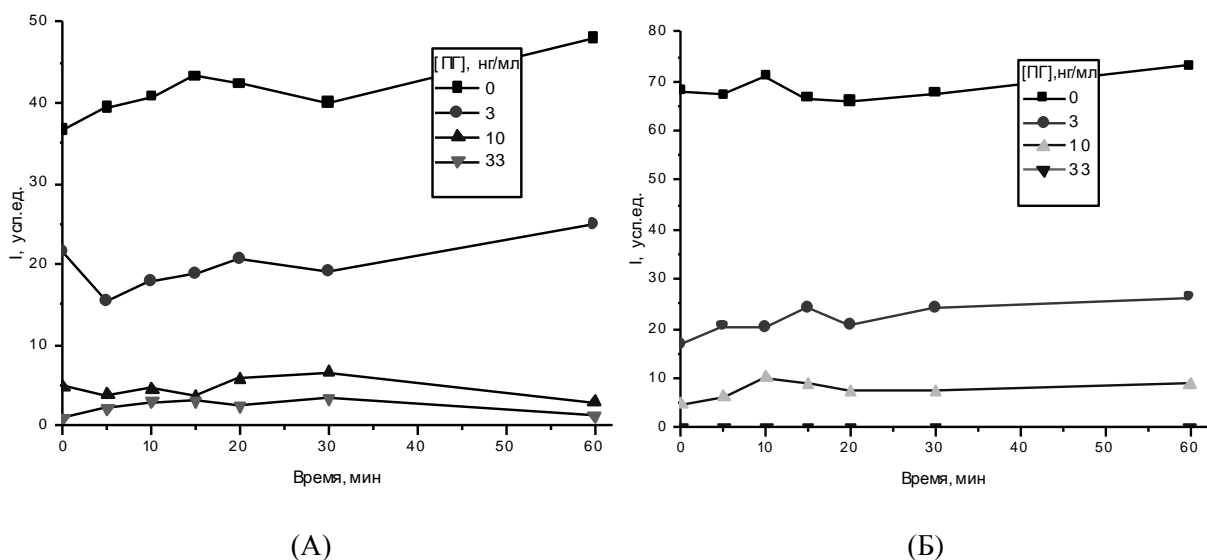


Рис.14. Зависимость интенсивности сигнала от времени для различных объемов ТМБ: 100 мкл (А), 400 мкл (Б).

**4.3. Оптимизация условий проведения ИФиА.** Для наилучшей визуализации аналитического сигнала и уменьшения фонового сигнала, необходима стадия промывания мембраны буферным раствором для удаления несвязавшегося конъюгата ПГ-ПХ. При проведении стадии промывания мембраны от несвязавшихся реагентов, важным является правильный выбор состава раствора, а также объема данного раствора, поскольку образование комплекса антиген-антитело является обратимым процессом. В качестве растворов для промывания мембран в данном виде анализа чаще всего применяют ФБСТ или ФБС. Было обнаружено, что увеличение концентрации детергента Твин-20 в буферном растворе при использовании в объемах более 500 мкл приводит к диссоциации образовавшегося комплекса. В случае использования для промывания мембраны от несвязавшихся реагентов дистиллированной водой или раствора ФБС диссоциации комплекса не наблюдается.

Поскольку анализируемый образец – цельное молоко – содержит в своем составе около 4 % белков, было исследовано, какое влияние оказывает присутствие БСА в системе на интенсивность сигнала, а также на чувствительность анализа. Исходя из анализа зависимости относительной интенсивности аналитического сигнала от концентрации ПГ, в случае отсутствия белка наблюдается большая разница в процентах ингибирования для концентраций 3 нг/мл и 10 нг/мл, что способствует однозначному визуальному определению. При этом было показано, что добавление различных концентраций БСА в рабочий буфер не оказывает значительного влияния на проведение анализа.

В результате проведенной оптимизации был разработан метод ИФиА для определения ПГ в буферном растворе. Анализ проводится следующим образом: на аналитическую мембрану добавляют смесь 10 мкл конъюгата ПГ-ПХ и 120 мкл образца, далее добавляют 100 мкл промывочного буфера. На следующей стадии

добавляют 400 мкл субстратного раствора и через 5 минут регистрируют визуальный результат. Предел обнаружения метода составил 0,4 нг/мл и время анализа - 15 минут. В результате для концентрации ПГ более 7 нг/мл наблюдается минимальная величина аналитического сигнала, что может в дальнейшем позволить визуально оценивать уровень ПГ в физиологическом диапазоне концентраций в цельном молоке с целью раннего выявления стельности коров (Рис.15).

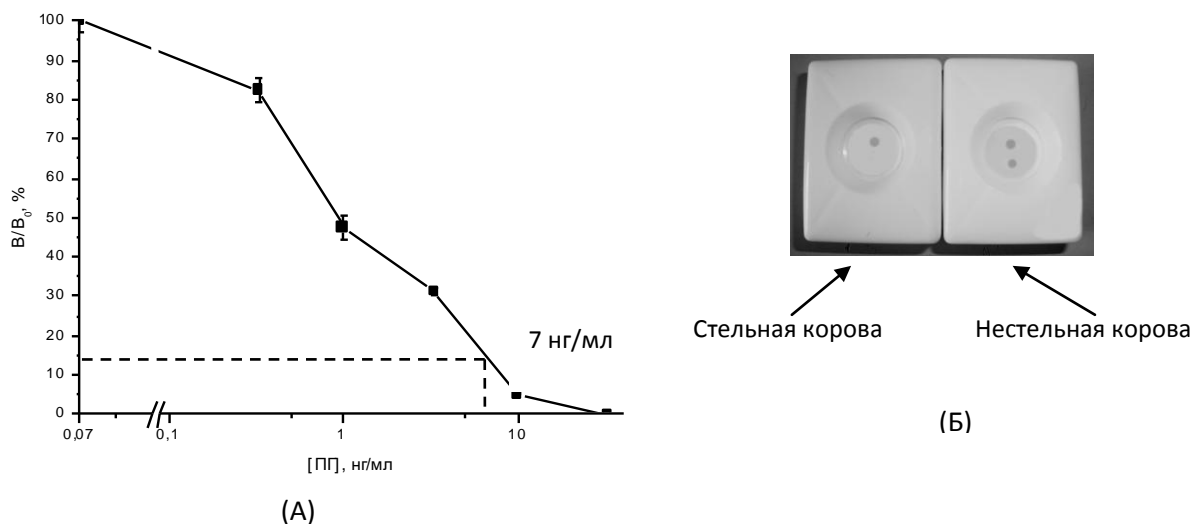


Рис.15. Калибровочная зависимость для определения ПГ методом ИФиА и визуальный результат определения ПГ при концентрациях более 10 и менее 10 нг/мл (Б).

**4.4. Апробация метода ИФиА ПГ на реальных образцах молока.** Для определения концентрации ПГ в цельном коровьем молоке были оптимизированы условия пробоподготовки образца цельного молока. При анализе реальных образцов молока одной из основных проблем метода ИФиА является прохождение образца сквозь мембрану. Молочный жир в свежесвыдоенном молоке находится в состоянии эмульсии. Диаметр жировых шариков основной массы молока составляет от 0,5 до 10 мкм. В данном случае скорость прохождения цельного молока через мембрану низкая (100 мкл молока в час), т.е. проведение анализа в экспресс-варианте в таком случае не предоставляется возможным. В работе было исследовано несколько разведений образца. При выборе разведения главным критерием являлось сохранение чувствительности анализа при высокой скорости прохождения образца через мембрану. Оптимальным было выбрано разведение образца в 4 раза, при котором чувствительность ЛПИФА ПГ сохраняется.

При проведении ИФиА для определения уровня ПГ в цельных образцах коровьего молока наблюдался заниженный уровень ПГ в образцах, по сравнению с данными, полученными методом ИФА. Поскольку около 80% ПГ содержится в жировой фракции молока, для получения достоверного результата по содержанию ПГ

в молоке, необходимо повысить доступность свободного ПГ для специфического взаимодействия с антителами в водной фазе. Из литературных данных известно, что для экстракции ПГ из жировой фазы используют органические растворители, например, метанол. Для начала был определен минимальный диапазон концентраций метанола, не оказывающий влияния на проведение анализа в отсутствие ПГ в системе. Было выяснено, что содержание метанола в рабочем буфере более 20% приводит к резкому падению аналитического сигнала. При содержании метанола 20% в рабочем буфере наблюдается снижение чувствительности анализа в области концентраций более 3 нг/мл. В таком случае проводить визуальную оценку результата в области концентрации 7 нг/мл становится затруднительным. Было показано, что содержание метанола порядка 10% в образце не оказывает существенного влияния на анализ и позволяет проводить точное определение уровня ПГ в цельном молоке коров. Таким образом, при проведении анализа образец молока разбавляли в 4 раза раствором ФБСТ, содержащим 10% метанола.

Методом ИФиА было исследовано 38 образцов цельного молока. Образцы были отобраны как у стельных коров, так и нестельных на разных фазах полового цикла. В процессе анализа было выявлено 39,5 % образцов с высоким содержанием ПГ в пробе (более 7 нг/мл) и 60,5% с низким содержанием ПГ. Эффективность разработанного экспресс-теста для количественного определения ПГ в цельном молоке коров была подтверждена сравнением с высокочувствительным методом ИФА. Ввиду того, что диапазон определяемых в ИФиА концентраций ПГ составляет от 0,5 до 11 нг/мл, при построении корреляционной зависимости не учитывались образцы с содержанием ПГ выше 11 нг/мл. Было показано, что полученные данные хорошо коррелируют друг с другом (рис. 16). Это позволяет применять разработанный метод ИФиА не только для полуколичественной оценки содержания ПГ в молоке,

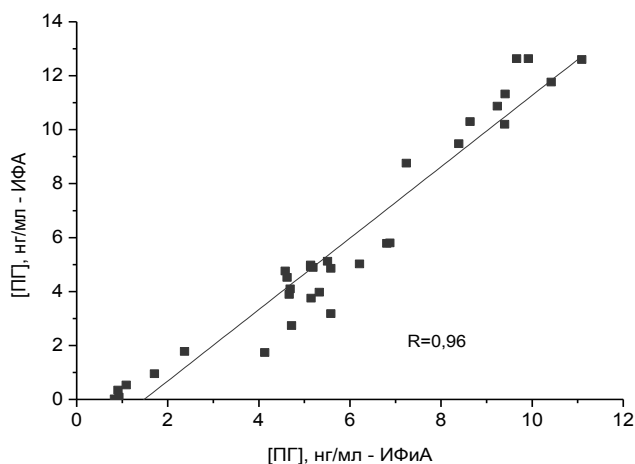


Рис.16. Корреляция методов определения ПГ в молоке ИФиА и ИФА.

В результате проделанной работы разработаны экспресс-тесты на основе методов ЛПИФА и ИФиА. На рис. 17 представлены калибровочные зависимости для трех иммуноферментных методов определения ПГ.

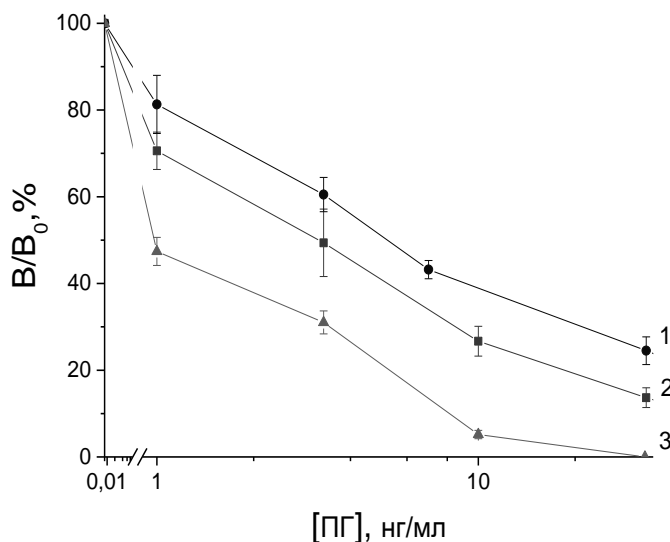


Рис.17. Сравнение иммуноферментных методов анализа ПГ: 1 – ЛПИФА, 2 – ИФА, 3 – ИФиА.

Основными преимуществами разработанных тест-систем является быстрота проведения анализа от 10 до 20 минут, и высокая чувствительность анализа, сравнимая с высокочувствительным методом ИФА (Табл.1). Метод ЛПИФА работает в широком диапазоне концентраций ПГ (2-40 нг/мл), что позволяет применять данный метод как для количественной оценки уровня ПГ, так и для полуколичественной. Метод ИФиА в отличие от методов ИФА и ЛПИФА работает в узком диапазоне концентраций (0,5-11 нг/мл), что позволяет проводить более точную визуальную оценку результата. Поэтому применение данного метода предпочтительно для полуколичественного анализа ПГ по принципу «да-нет».

Таблица 1. Характеристики методов определения ПГ.

Метод анализа ПГ	Концентрация антител, мкг/мл	Концентрация конъюгата, нг/мл	Диапазон определяемых концентраций ПГ, нг/мл	Время проведения анализа
ИФА	0,4	13	0,5-20	1,5 часа
ЛПИФА	15,2	4,3	2-40	15-20 мин
ИФиА	9	26	0,5-11	10-15 мин

Также несомненным преимуществом разработанных методик является возможность определения уровня ПГ в цельном молоке коров. В настоящее время на отечественном рынке существуют быстрые тест-системы для диагностики стельности, но данные экспресс-тесты позволяют проводить определение ПГ или других маркеров стельности только в моче или сыворотке крови, а получение таких биологических материалов по сравнению с отбором молока является довольно трудоемким процессом. Разработанные тест-системы показывают высокую эффективность при определении уровня ПГ в цельном молоке коров для определения стельности и не требуют для проведения анализа сложной пробоподготовки образцов и специального оборудования..

## 5. ВЫВОДЫ

1. Рассмотрены основные конкурентные схемы создания быстрых проточных тест-систем на основе ЛПИА и ИФиА низкомолекулярных веществ на примере гормона ПГ с использованием золотых наночастиц в качестве метки. Установлено, что использование золотых наночастиц в качестве метки в данных экспресс-методах не позволяет определять уровень ПГ в физиологическом диапазоне концентраций для целей ветеринарной диагностики.
2. Для определения ПГ в ЛПИА и ИФиА предложено в качестве визуальной метки использовать ПХ. Показано, что применение в качестве маркера ПХ в конкурентной схеме позволяет снизить предел обнаружения ПГ более, чем в 10 раз по сравнению с тест-системами на основе коллоидного золота, и достигнуть рабочего диапазона измерения физиологических концентраций ПГ в цельном молоке, необходимого для раннего определения стельности коров. Определены количественные характеристики и условия регистрации ферментной метки в тестовой зоне разрабатываемых тест-систем ЛПИА и ИФиА, рассмотрено влияние структуры и компоновки пористых мембранных компонентов на аналитические характеристики.
3. Разработан метод ЛПИФА для инструментального фотометрического количественного определения ПГ. Предел обнаружения составил 1 нг/мл, рабочий диапазон определяемых концентраций 1 - 40 нг/мл, время проведения одного анализа – 20 мин. Тест-система ЛПИФА апробирована на образцах цельного коровьего молока для определения уровня ПГ в физиологическом диапазоне концентраций, необходимых для раннего выявления стельности. Показана высокая степень соответствия полученных результатов с данными ИФА (коэффициент корреляции 0,97), а также с ректальным методом исследования. При этом чувствительность разработанной тест-системы составила 84%, а специфичность - 100%.
4. Разработан новый высокочувствительный экспресс-тест на основе метода ИФиА с использованием фермента - ПХ в качестве метки - для количественного и полуколичественного определения уровня ПГ в цельном молоке коров. Предел обнаружения составил 0,4 нг/мл. Показана высокая степень соответствия результатов, полученных методами ИФиА и ИФА (коэффициент корреляции 0,96). Достигнутый рабочий диапазон определяемых концентраций ПГ позволяет проводить точную визуальную оценку нестельных коров по принципу "да-нет" без использования инструментальных средств регистрации сигнала в полевых условиях.



## СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Samsonova J.V., Safronova V.A., Osipov A.P. Pretreatment-free lateral flow enzyme immunoassay for progesterone detection in whole cows' milk // *Talanta*. – 2015. - V. 132. - P. 685-689.
2. Safronova V.A., Samsonova J.V., Grigorenko V.G., Osipov A.P. Lateral flow immunoassay for progesterone detection // *Moscow University Chemistry Bulletin*. – 2012. - V. 67. - № 5. - P. 241-248. (Сафронова В.А., Самсонова Ж.В., Григоренко В.Г., Осипов А.П. Определение прогестерона методом латерального проточного иммуноанализа // *Вестник Московского университета*. – 2012. - Серия 2. - Т. 53. - № 5. - С. 326-334)
3. Сафронова В.А., Самсонова Ж.В., Осипов А.П. Иммуноферментный быстрый тест для раннего определения стельности коров // *Наука и молодежь: новые идеи и решения в АПК: Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием*. – Иваново: ФГБОУ ВО Ивановская ГСХА. - 2016. – Т.1. - С. 279-283.
4. Сафронова В.А., Самсонова Ж.В., Осипов А.П. Определение прогестерона методом латерального проточного иммуноанализа в молоке коров // *Сборник материалов Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны"*. – Санкт-Петербург: ФГБОУ ВПО "СПбГАВМ". – 2012. - С. 154-157.
5. Сафронова В.А. Латеральный проточный иммуноферментный анализ – новый экспресс-метод определения прогестерона // *Лаборатория*. – 2015. - №2. - С.56.
6. Safronova V.A., Samsonova J.V., Osipov A.P., Lateral flow enzyme immunoassay – new rapid method for progesterone determination // *Материалы IX Международной конференции молодых ученых по химии “Менделеев 2015”*. 7-10 апреля 2015. - Санкт-Петербург. – 2015. - С.415.
7. Safronova V.A., Samsonova J.V., Osipov A.P. New approaches to determination of progesterone in cows' milk for early pregnancy diagnosis // *Сборник VIII Moscow International congress “Biotechnology: State of the art and prospects of development”*. – 2015. - Серия Congress proceedings. - Т. 2, тезисы, С. 71-72.
8. Safronova V.A., Samsonova J.V., Osipov A.P., Egorov A.M. Horseradish peroxidase as a label in a new express-method of lateral flow enzyme immunoassay for progesterone detection in cow's milk // *Сборник Abstracts of International Conference "Biocatalysis-2013: Fundamentals & Applications"*. – 2013. - С. 114-115.
9. Сафронова В.А., Самсонова Ж.В., Осипов А.П., Егоров А.М. Определение прогестерона методом латерального проточного иммуноанализа с целью раннего диагностирования стельности коров // *Сборник Материалов VII Московского*

Международного Конгресса "Биотехнология: состояние и перспективы развития". – 2013. – Т.1, - С. 449-450.

10. Сафронова В.А., Самсонова Ж.В., Григоренко В.Г., Осипов А.П. Латеральный проточный иммуноанализ прогестерона // Сборник Программа и тезисы докладов. VI Всероссийская конференция-школа «Высокореакционные интермедиаты химических и биохимических реакций» ChemInt 2011. - 10-13 октября 2011 г. - С. 41-41.

11. Сафронова В.А. Экспресс-методы на основе иммуноферментного анализа для определения прогестерона // VI Международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения – 2015». - Санкт-Петербург. - 2-4 декабря 2015. С. 170.

12. Safronova V.A., Samsonova J.V., Osipov A.P. Horseradish peroxidase as a label in express-tests for progesterone determination // Book of abstracts of International conference BIOCATALYSIS-2015: fundamentals & applications. - June 21-26 2015. - P. 132.

13. Сафронова В.А., Самсонова Ж.В., Осипов А.П. Быстрые тест-системы для определения прогестерона на основе принципа иммуноферментного анализа в сборнике Сборник тезисов I Всероссийской конференции с международным участием "Химический анализ и медицина". – Москва. - Печатный дом "КАСКОН". - 9-12 ноября 2015. - С. 140.

14. Сафронова В.А. Экспресс-методы для определения прогестерона на основе принципа иммуноферментного анализа // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2016» [Электронный ресурс]. – Москва. – МАКС Пресс. – 2016.