

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФИКОТОКСИНА ОКАДАЕВОЙ КИСЛОТЫ НА ОСНОВЕ КАСКАДНОГО УСИЛЕНИЯ СИГНАЛА

О.Д. Гендриксон, Е.А. Зверева, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев

*Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, Москва, Россия*

Среди большого количества токсичных пищевых загрязнителей особое место занимают фикотоксины – крайне ядовитые соединения, которые продуцируются микроводорослями и цианобактериями, входящими в состав планктона и бентоса мирового океана [1, 2]. Водоросли и цианобактерии являются звеном пищевых цепей водных экосистем, служа пищей для моллюсков и рыб. Употребление человеком продуктов аквакультуры, загрязненных фикотоксинами, приводит к острым отравлениям и отдаленным токсическим эффектам [3, 4].

Фикотоксины, продуцируемые водорослями динофлагеллятами, относятся к группе диарейных фикотоксинов. Эта группа включает окадаевую кислоту (ОК) – липофильное соединение, накапливающееся в жировых тканях моллюсков и рыб [5]. Для отравления ОК характерны тошнота, рвота, абдоминальные боли, профузная диарея [6]. Содержание высокотоксичной ОК в пищевых продуктах строго регламентируется. Так, согласно Техническому Регламенту Таможенного Союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции», концентрация ОК в тканях моллюсков не должна превышать 0.16 мкг/кг [7].

Обеспечение качества и безопасности рыбы и морепродуктов требует контроля контаминации пищевого сырья и готовой продукции. Аналитические методы детекции фикотоксинов являются необходимым инструментом для реализации этого требования. Для точного и чувствительного определения часто применяются сложные хроматографические методы, в том числе, с масс-спектрометрической детекцией, требующие специально оснащенных профильных лабораторий и высококвалифицированных операторов [8]. Однако данные методы не могут обеспечить экспрессного определения фикотоксинов в полевых условиях, тем более, когда речь идет о массовом скрининге. Их эффективно дополняют иммунохимические методы, в частности, иммунохроматографический анализ (ИХА), обеспечивающий быстрое (10–20 мин) получение не только качественных, но и количественных результатов [9]. Следует отметить, что специфика пищевых и водных матриц, загрязненных ОК, требует пробоподготовки, часто сопряженной с многократным разведением проб и, соответственно, снижением концентрации ОК в них. Поэтому востребованы тест-системы с низкими пределами обнаружения ОК.

Цель работы – разработка высокочувствительного ИХА ОК, основанного на усилении аналитического сигнала, которое обеспечивается каскадом взаимодействий антивидовых антител, конъюгированных с маркером, и свободных антител (не специфичных к целевому аналиту), связывающихся с антивидовыми антителами.

Для разработки ИХА ОК использовали маркер на основе наночастиц золота (НЧЗ), полученных восстановлением золотохлористоводородной кислоты [10]. Стандартный и усиленный ИХА реализовали в непрямом конкурентном формате, подразумевающим конъюгацию с меткой не специфических к ОК, а антивидовых антител. НЧЗ конъюгировали с вторичными антителами (антителами козы против иммуноглобулинов мыши, АК) физической адсорбцией, предварительно определив концентрацию антител, которая обеспечивала стабилизацию поверхности НЧЗ, методом флокуляционных кривых [11]. В качестве рецептора ОК использовали специфические моноклональные антитела (МАТ). Иммунологические свойства МАТ изучали методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА). Было показано, что предел обнаружения (ПрО) ОК составляет 0.5 нг/мл.

В стандартном ИХА тест-полоски с иммобилизованным белковым конъюгатом ОК (в тестовой (Т) зоне) и вторичными антителами, специфичными к АК в составе конъюгата с НЧЗ (в контрольной (К) зоне) инкубировали с образцом, содержащим специфические МАТ и конъюгат АК–НЧЗ. В присутствии свободной ОК в пробе специфические сайты МАТ блокировались, что препятствовало образованию комплекса ОК–белок – МАТ – ОК–НЧЗ и появлению окрашенной линии в Т-зоне. И наоборот, при отсутствии ОК в пробе МАТ в комплексе с АК–НЧЗ взаимодействовали с иммобилизованным антигеном, образуя окрашенную полосу. В К-зоне избыток комплекса АК–НЧЗ взаимодействовал с адсорбированными вторичными антителами (антителами козы против иммуноглобулинов козы, АО), образуя вторую окрашенную линию.

Таким образом, о концентрации ОК в пробе судили по интенсивности окрашивания в Т-зоне. Стандартный ИХА ОК был оптимизирован с точки зрения достижения минимального ПрО при амплитуде аналитического сигнала, обеспечивающей достоверное определение аналита. Для этого варьировали условия ИХА – концентрации реагентов и продолжительность стадий анализа. В оптимизированных условиях инструментальный и визуальный ПрО ОК составили 0.2 и 2 нг/мл, соответственно. Рабочий диапазон определяемых концентраций составил 0.31–1.3 нг/мл, время анализа – 18 мин.

В ИХА с каскадным усилением интенсификация колориметрического сигнала на тест-полоске обеспечивается за счет пропускания вдоль мембран сначала раствора специфических МАт в смеси с ОК-содержащей пробой, а затем нескольких (не менее двух) циклов последовательного пропускания конъюгата АК–НЧЗ и свободных антивидовых антител (АО), связывающихся с АК. Результатом этих процессов является формирование агрегатов с разветвленной структурой (АК–НЧЗ – АО) $\times$ n, где n – количество циклов пропускания АК–НЧЗ и АО. При этом количество циклов (и, соответственно, образующихся в Т-зоне слоев) потенциально может быть любым, что исключает стехиометрические ограничения на количество маркера, присоединяемого к одной молекуле иммунореагента, иммобилизованной на мембране. Таким образом, в Т-зоне тест-полоски образуется сложная многослойная структура, в которой один комплекс антиген–антитело индуцирует связывание большого количества золотого маркера.

Разработка ИХА с каскадным усилением была начата с выбора числа циклов амплификации. С одной стороны, повышение чувствительности анализа достигается при увеличении количества реакций в каскаде (и, следовательно, интенсивности окрашивания в Т-зоне). Однако при возрастании количества стадий анализа возрастает его общая продолжительность. Сначала усиленный ИХА ОА проводили в тех же условиях, что и стандартный ИХА (комплектация тест-полосок, концентрация иммунореагентов). При этом реализовали 1–3 цикла усиления, последовательно инкубируя тест-полоски в растворах АК–НЧЗ и АО. Было показано, что общее время ИХА составляет примерно 40–90 мин в зависимости от количества циклов амплификации. Такая продолжительность детекции сопоставима с ИФА и противоречит требованию экспрессности, предъявляемому к ИХА. Поэтому длину тест-полоски сократили за счет ее нижнего компонента – мембраны под образец – и, соответственно, снизили объем реакционной среды в 5 раз. Это позволило сократить время анализа до 29 мин для одного цикла с увеличением на 14 мин для каждого последующего цикла. С точки зрения экспрессности детекции было целесообразно реализовать не более 2–3 циклов амплификации. Увеличение интенсивности окрашивания Т-зоны в каскадном ИХА позволило снизить концентрацию специфических реагентов – иммобилизованных в С-зоне АО, а также концентрацию конъюгата АК–НЧЗ и специфических МАт. Таким образом, при выбранных в ходе оптимизации условий был реализован ИХА с 1, 2 и 3 циклами каскадного усиления. При единичном цикле усиления амплитуда аналитического сигнала была низкой, что отрицательно сказывалось на достоверности и точности анализа, поэтому данный вариант был исключен из сравнения и рассматривались только двух- и трехкаскадные форматы. Показано, что при сопоставимых инструментальных ПрО ОК визуальный предел обнаружения при 3 циклах усиления увеличивается, и общее время анализа составляет 57 мин. Поэтому был выбран ИХА ОК с 2 циклами усиления сигнала. В данных условиях инструментальный ПрО ОК составил 30 пг/мл, что почти в 7 раз ниже, чем в стандартном ИХА; рабочий диапазон определяемых концентраций составил 0.07–0.85 нг/мл. Визуальный ПрО ОК снизился в 2 раза – до 1 нг/мл, время анализа составило 43 мин.

Полученные результаты позволили перейти к апробации тест-системы для обнаружения ОК в реальных пробах – натуральной морской воде, рыбе (форели) и морепродуктах – тигровых креветках и гребешках. Были разработаны оптимальные процедуры пробоподготовки, направленные не только на снижение эффекта сложного матрикса на результаты тестирования, но и на максимальную экстракцию ОК. Коэффициенты извлечения ОК из проб составили 76.9–126 %.

Сравнение полученных результатов с опубликованными работами по ИХА ОК показывает, что в данной работе удалось достичь минимальный среди всех исследований (включая ИХА с усилением) ПрО ОК. Чувствительность анализа намного превышает официальные требования, что позволяет варьировать условия пробоподготовки, в том числе, значительно разбавлять пробы на основе сложного матрикса. Кроме того, предложенный в данной работе подход по усилению прост методически и не требует получения новых реагентов и комплексов маркера с рецепторами: набор реагентов для усиленного ИХА тот же, что и для стандартного непрямого конкурентного ИХА.

В качестве дополнительных достоинств разработанной тест-системы отметим малый объем тестируемой пробы (20 мкл) и крайне низкий расход специфических антител. В данном исследовании панель тестируемых образцов включала морскую воду как первичную мишень загрязнения фикотоксинами и представителей рыб, моллюсков и ракообразных, что дополнительно подтвердило конкурентоспособность тест-системы. Процедура обработки проб была очень простой и занимала всего 20 мин для рыбы и морепродуктов. Для морской воды обработка проб сводилась к простому разбавлению буфером. Предложенный подход может быть использован для высокочувствительного обнаружения различных фикотоксинов, а также других опасных токсикантов воды и пищевой продукции.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 20-43-07001.

Литература

1. Farabegoli, F.; Blanco, L.; Rodriguez, L.P.; Vieites, J.M.; Cabado, A.G. Phycotoxins in marine shellfish: Origin, occurrence and effects on humans. *Mar. Drugs* 2018, 16, 188.
2. Louzao, M.C.; Vilarino, N.; Vale, C.; Costas, C.; Cao, A.; Raposo-Garcia, S.; Vieytes, M.R.; Botana, L.M. Current trends and new challenges in marine phycotoxins. *Mar. Drugs* 2022, 20, 198.
3. Vilarino, N.; Louzao, M.C.; Abal, P.; Cagide, E.; Carrera, C.; Vieytes, M.R.; Botana, L.M. Human poisoning from marine toxins: Unknowns for optimal consumer protection. *Toxins* 2018, 10, 324.
4. Morabito, S.; Silvestro, S.; Faggio, C. How the marine biotoxins affect human health. *Nat. Prod. Res.* 2018, 32, 621–631.
5. Fu, L.L.; Zhao, X.Y.; Ji, L.D.; Xu, J. Okadaic acid (OA): Toxicity, detection and detoxification. *Toxicon* 2019, 160, 1–7.
6. Valdiglesias, V.; Prego-Faraldo, M.V.; Pasaro, E.; Mendez, J.; Laffon, B. Okadaic acid: more than a diarrhetic toxin. *Mar. Drugs* 2013, 11, 4328–4349.
7. Технический Регламент Таможенного Союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции». Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю): утв. Решением Комиссии Таможенного Союза от 7 апреля 2011 г. № 622. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. 2010. – 707 с.
8. Rodriguez, I.; Vieytes, M.R.; Alfonso, A. Analytical challenges for regulated marine toxins. Detection methods. *Curr. Opin. Food Sci.* 2017, 18, 29–36.
9. Dillon, M.; Zaczek-Moczydlowska, M.A.; Edwards, C.; Turner, A.D.; Miller, P.I.; Moore, H.; McKinney, A.; Lawton, L.; Campbell, K. Current trends and challenges for rapid smart diagnostics at point-of-site testing for marine toxins. *Sensors* 2021, 21, 2499.
10. Frens, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nat. Phys. Sci.* 1973, 241, 20–22.
11. Hermanson, G.T. *Bioconjugate Techniques*, 3rd ed.; Pierce Biotechnology; Thermo Fisher Scientific: Rockford, IL, USA, 2013.