

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ПРОВЕРКИ ХАЛЯЛЬНОСТИ ПРОДУКТОВ

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

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва, Россия

В настоящее время проблема фальсификации мясных пищевых продуктов стоит достаточно остро, что связано с расширением технологических возможностей в процессе их производства [1]. Присутствие в продуктах компонентов, непредусмотренных рецептурой, может принести вред физическому здоровью людей и иметь серьезные этические последствия (нарушения халяльности, кошерности).

Для эффективного контроля мясных продуктов высокочувствительные аналитические методы (ВЭЖХ, ПЦР и др.), реализуемые в специальных лабораториях, должны дополняться тест-системами для массового экспрессного скрининга на любом этапе производства пищевой продукции [2]. Эффективным инструментом для решения этой задачи являются характеризующиеся высокой чувствительностью и специфичностью иммуноаналитические методы, прежде всего – иммуноферментный (ИФА) и иммунохроматографический анализ (ИХА). По сравнению с ИФА, ИХА имеет такие преимущества, как экспрессность (время анализа составляет 10–15 мин), простота реализации, отсутствие необходимости в сложном оборудовании и квалифицированном персонале. Кроме того, результаты анализа могут быть оценены как качественно (на наличие примесей несанкционированных сортов мяса), так и количественно (концентрация таких примесей), что позволяет использовать иммунохроматографические тест-системы для самых различных целей.

Идентификация видов сырого мяса иммуноаналитическими методами обычно проводится с использованием белковых маркеров и антител с определенной селективностью, а также видоспецифичных олигонуклеотидных зондов [3]. Ряд мышечных и сывороточных термостабильных белков используются в качестве биомаркеров для определения источника мяса [4–6]. При этом термостабильность белков обеспечивает сохранение конформации специфически антителами распознаваемых антигенных структур. Чувствительность анализа в представленных в литературе исследованиях позволяла детектировать до 0,01–2,5 % мясных добавок с пределами обнаружения маркеров 0,5 пг/мл – 0,5 мкг/мл. Основным недостатком использования термостабильных белков для выявления мясных фальсификатов и несанкционированных добавок является длительность пробоподготовки, обусловленная применением высокотемпературной обработки проб.

Альтернативным подходом для распознавания источников и оценки общего содержания мясного сырья является обнаружение иммуноглобулинов (Ig) – глобулярных гликопротеинов, которые присутствуют в плазме всех позвоночных и могут быть легко экстрагированы из мышечной ткани. Пригодность иммуноглобулинов для иммунохимической детекции примесей свинины в мясных продуктах была показана в работах [7, 8].

В настоящем исследовании разработана тест-система для иммунохроматографического определения иммуноглобулинов свиньи в полуфабрикатах и готовых мясных пищевых продуктов. ИХА реализован в «сэндвич» – формате, основанном на использовании антител кролика, полученных к иммуноглобулинам свиньи (здесь и далее – антивидовые антитела), их конъюгатов с наночастицами золота в качестве маркера и колориметрической детекции (как визуальной, так и инструментальной) результатов анализа. Разработана простая и быстрая методика пробоподготовки, исключая нагревание проб, что позволило значительно сократить продолжительность анализа в целом.

Свойства используемых в анализе антивидовых антител (аффинно очищенные иммуноглобулины кролика против иммуноглобулинов свиньи) характеризовали методом ИФА в «сэндвич» – формате. Для этого в лунках микропланшета иммобилизовали антивидовые антитела, которые затем последовательно инкубировали с определяемыми иммуноглобулинами свиньи и м антивидовыми антителами, мечеными ферментной меткой (пероксидазой), активность которой регистрировали фотометрически. Предел обнаружения IgG свиньи в «сэндвич» – ИФА составлял 2 нг/мл.

Полученные результаты позволили перейти к разработке иммунохроматографической тест-системы для детекции IgG свиньи. Маркер для ИХА – наночастицы золота (НЧЗ) – получали, восстанавливая золотохлористоводородную кислоту цитратом натрия. Характеристика НЧЗ методом просвечивающей электронной микроскопии показала, что их средний диаметр составляет 30.5 ± 4.3 нм (рис. 1). Конъюгаты антивидовых антител получали методом физической адсорбции. Используемая при этом концентрация антивидовых антител была выбрана на основании флокуляционной кривой.

ИХА был также реализован в «сэндвич» – формате. Для этого в аналитическую зону тест-полоски наносили антивидовые антитела. Контрольную зону формировали путем адсорбции антител козы к иммуноглобулинам кролика. Для проведения анализа в буфере в лунки микропланшета добавляли серию разведений IgG свиньи и конъюгат антивидовые антитела–НЧЗ и инкубировали 5 мин. В полученную смесь опускали тест-полоски и инкубировали еще 15 мин. Сформировавшиеся в растворе комплексы состава IgG свиньи – антивидовые антитела–НЧЗ с током жидкости достигали аналитической зоны, связывались с антивидовыми антителами и образовывали первую окрашенную полосу. Избыток комплекса концентрировался в контрольной зоне с образованием второй окрашенной полосы (рис. 2). Для обеспечения высокого аналитического сигнала и низкого предела обнаружения подобраны концентрации иммунореагентов в контрольной и аналитической зонах тест-полоски, время инкубации, состав реакционной среды и другие параметры. Предел обнаружения иммуноглобулинов свиньи в оптимизированном ИХА составил 0,5 нг/мл.

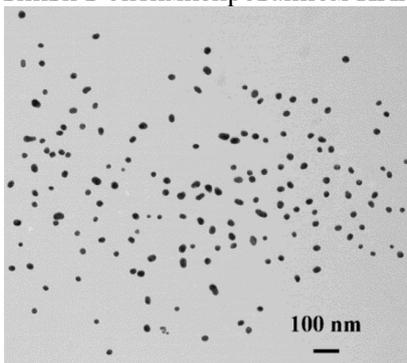


Рисунок 1. Микрофотография НЧЗ

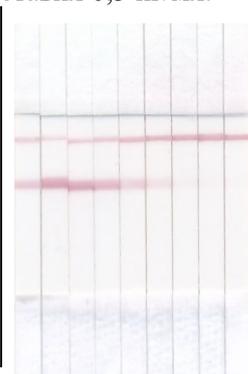


Рисунок 2. Вид тест-полосок после ИХА IgG свиньи (концентрации IgG 10000, 1000, 370, 123, 41, 13.7, 1.5, 0.2, 0 нг/мл)

Для детекции примесей свинины в продуктах питания (в том числе халяльных) разработана простая пробоподготовка, которая заключалась в гомогенизации мясных проб, экстракции IgG буфером специально подобранного состава и центрифугировании. Для определения чувствительности ИХА были

приготовлены говяжий, бараний и куриный фарши с добавлением свиного фарша в известном количестве (0,05–10 % по массе). После пробоподготовки экстракты анализировали с использованием изготовленных тест-полосок. Показана возможность детектировать до 0,1 % свинины во всех видах фарша. Высокая чувствительность определения IgG свиньи позволила перейти к анализу примеси свинины в различной мясной продукции.

В панель анализируемых мясных изделий и полуфабрикатов входила продукция, маркированная производителями как халяльная, а именно – пельмени разного состава (говядина, баранина), колбасы и сырой фарш – приобретенная в специализированных супермаркетах г. Москвы. Показано, что во всей проанализированной продукции IgG свиньи достоверно не детектировались.

Таким образом, разработанная тест-система позволяет провести быструю (20 мин) и чувствительную (до 0,1 %) детекцию примесей свинины в мясной продукции и может быть рекомендована для быстрого внелабораторного скрининга состава мясных продуктов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта 19–16–00108 Российского научного фонда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bansal S., Mangal M., Mangal A., Kumar S. Food adulteration: Sources, health risks, and detection methods. *Crit Rev Food Sci Nutr* (2017). 57(6):1174–1189.
2. Vlachos A., Arvanitoyannis I.S., Tserkezou P. An updated review of meat authenticity methods and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* (2016). 56(7):1061–1096.
2. Ali M.E., Razzak M.A., Hamid S.B.A., Rahman M.M., Amin M.A., Rashid N.R.A., Asing. Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. *Food Chem* (2015). 177:214–24.
4. Zvereva E.A., Kovalev L.I., Ivanov A.I., Kovaleva M.A., Zherdev A.V., Shishkin S.S., Lisitsyn A.B., Chernukha I.M., Dzantiev B.B. Enzyme immunoassay and proteomic characterization of troponin I as a marker of mammalian muscle compounds in raw meat and some meat products. *Meat Sci* (2015). 105:46–52.
5. Masiri J., Benoit L., Barrios-Lopez B. Development and validation of a rapid test system for detection of pork meat and collagen residues. *Meat Sci* (2016). 121:397–402.
6. Hsieh Y. – H.P., Ofori J.A. Detection of horse meat contamination in raw and heat-processed meat products. *J Agric Food Chem* (2014). 62(52):12536–12544
7. Kuswandi B., Gani A.A., Ahmad M. Immuno strip test for detection of pork adulteration in cooked meatballs. *Food Biosci* (2017). 19:1–6.
8. Mandli J., Fatimi I.E., Seddaoui N., Amine A. Enzyme immunoassay (ELISA/immunosensor) for a sensitive detection of pork adulteration in meat. *Food Chem* (2018). 255:380–389.