

## **ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВЫХ БИОМАРКЕРОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ПОДЛИННОСТИ И СОСТАВА МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ**

*Е.А. Зверева, О.Д. Гендриксон, Н.И. Смирнова, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев*

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

В современном обществе важное значение имеет достоверность информации о составе и качестве сырья при производстве мясной продукции. Это связано прежде всего с тем, что некоторые технологически процессы предусматривают частичную замену мясного сырья белок-содержащими добавками животного или растительного происхождения [1]. Кроме того, известны случаи фальсификации продуктов, когда предусмотренное технологией мясо частично заменяли на мясо других видов животных [2]. В связи с этим актуален контроль состава на всех стадиях производства мясных продуктов (сырья, промежуточных изделий, готовой продукции). Для эффективности этого контроля необходимы достоверные и производительные методы анализа, которые позволят количественно и качественно идентифицировать отдельные ингредиенты, а также эффективные молекулярные идентификаторы, отражающие содержание разных видов сырья в готовом продукте.

Микроструктурные или гистологические методы анализа не подходят для анализа готовых мясных продуктов, прошедших все стадии технологического процесса. Молекулярно-генетические методы, электрофорез, различные виды хроматографии могут рассматриваться лишь в качестве подтверждающих методов, поскольку для их реализации необходимы специализированные лаборатории, обеспеченные соответствующим оборудованием и квалифицированным персоналом [3].

Иммуноаналитические методы имеют несомненные преимущества как средства скринингового анализа, обусловленные сравнительной дешевизной и большой производительностью измерений при работе с сериями проб [4]. В качестве основных методов в работе были рассмотрены микропланшетный иммуноферментный анализ (ИФА) и иммунохроматографический анализ (ИХА). ИФА обеспечен серийно производимым недорогим оборудованием и позволяет количественно характеризовать целевые соединения с высокой точностью. ИХА основан на использовании мультимембранного композита с иммобилизованными специфическими реагентами, поэтому для проведения анализа достаточно контакта тест-полоски с пробой, а для характеристики результатов – оценки наличия и интенсивности окрашивания определенных зон на тест-полоске.

Принципиальное значение имеет выбор молекулярного идентификатора, контролируемого иммунометодом. Такой биомаркер должен быть уникальным, характеризоваться стабильным высоким содержанием в мышечной ткани, иметь отличия в строении антигенных детерминант у разных животных. Кроме того, требуется стабильность маркера при различных видах обработки, которым подвергается мясное сырье. С учетом установленных критериев в качестве биомаркеров были охарактеризованы скелетный тропонин I, миоглобин, иммуноглобулины G, а также белок сои – соевый ингибитор трипсина (СИТ), поскольку именно соевое сырье чаще всего добавляют в мясные изделия для обеспечения требуемых пищевых и функциональных качеств готового продукта [5, 6].

В качестве основного формата проведения анализа был реализован «сэндвич» – формат, который подходит для оценки сохранения нативной структуры белка и используется для анализа антигенов, на поверхности которых существуют по крайней мере две антигенные детерминанты. К иммобилизованному на поверхности планшета или мембраны антителам добавляли раствор, содержащий анализируемый биомаркер; в результате чего образовывался комплекс антиген-антитело. Затем в систему вносили специфические антитела, конъюгированные с биотином (ИФА) или наночастицами золота (ИХА).

На основании проведенного скрининга отобраны пары антител, характеризующиеся максимальной амплитудой аналитического сигнала и минимальным пределом обнаружения. Разработаны методики иммуноферментного анализа скелетного тропонина I и СИТ, а также иммунохроматографические тест-системы для детекции скелетного тропонина I и миоглобина.

Данные методики позволили детектировать скелетный тропонин I с пределами определения 4.8 нг/мл в ИФА [7] и 25 нг/мл в ИХА. Показано, что использование в анализе моноклональных антител определенной специфичности позволяет с близкой эффективностью выявлять тропонин I в пробах мяса млекопитающих (говядина, свинина, баранина, конина). При этом тропонин I, присутствующий в мясе птицы (курица, индейка), разработанные системы ИФА и ИХА не детектируют. Иммунохроматографическая тест-система позволяет выявлять добавки говядины вплоть до 1 % в курином фарше.

ИХА миоглобина характеризовался пределом определения 5 нг/мл. Тест-система специфически выявляет свиной миоглобин и не взаимодействует с миоглобинами других видов млекопитающих и птиц. Продолжительность иммунохроматографического тестирования составила 15 мин.

Для контроля наличия соевого сырья в мясных продуктах была разработана методика конкурентного ИФА с применением антител к соевогмуингибитору трипсина. Анализ основан на конкурентном взаимодействии с антителами антигена, содержащегося в пробе, и иммобилизованного на поверхности лунок микропланшета. Использование конкурентной схемы было обусловлено тем, что в результате ферментативной и высокотемпературной обработки продуктов происходит нарушение нативной структуры СИТ, приводящее к его фрагментации [8]. Чувствительность детекции СИТ – 3.5 нг/мл, диапазон определяемых концентраций – 7.7–110 нг/мл. Общая продолжительность анализа была сокращена с 2 ч 30 мин до 1 часа за счет уменьшения продолжительности конкурентной стадии и стадии взаимодействия с антивидовыми антителами, мечеными пероксидазой. Потери в чувствительности и амплитуде аналитического сигнала при этом не наблюдалось. Разработанная методика ИФА позволяет проводить выявление сои в мясных продуктах, прошедших все стадии технологической обработки.

Таким образом, выбранные белки – скелетный тропонин I, миоглобин, соевый ингибитор трипсина – могут быть использованы в качестве биомаркеров в тест-системах для контроля состава мясных продуктов. Разработанные методики иммуноферментного и иммунохроматографического анализа представляются эффективным средством проверки аутентичности и заявленного состава мясных продуктов.

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Olmedilla-Alonso B., Jimenez-Colmenero F., Sanchez-Muniz F.J. (2013). Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. *Meat Science*, 95(4), 919–930.
2. Ballin, N.Z. (2010). Authentication of meat and meat products. *Meat Science*, 86(3), 577–587.
3. Chernukha I.M., Vostrikova N.L., Khvostov D.V., Zvereva E.A., Taranova N.A., Zherdev A.V. (2019). Methods of identification of muscle tissue in meat products. prerequisites for creating a multi-level control system. *Theory and Practice of Meat Processing*. 4(3):32–40.
4. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V. (2014). Immunochromatographic methods in food analysis. *TRAC – Trends in Analytical Chemistry*, 55, 81–93.
5. Chen F. – C., Hsieh Y-H.P. Porcine troponin I: a thermostable species marker protein. (2002). *Meat Science*. 61, 55–60.
6. Kotoura S., Murakami-Yamaguchi Y., Kizu K., Nakamura M., Fuchu H., Miake K., Sugiyama M., Narita H. Establishment of a sandwich ELISA for the determination of beef content in processed foods by using monoclonal antibodies to myoglobin. (2012). *Food and Agricultural Immunology*. 23(3), 289–230.
7. Zvereva E.A., Kovalev L.I., Ivanov A.V., 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. (2015). *Meat Science*, 105, 46–52.
8. Smirnova N.I., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development of immunoenzyme assay for detection of soybean raw material in food products *Applied Biochemistry and Microbiology*. (2020), 56(4), 483–487.