

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕТА-ЛАКТОГЛОБУЛИНА В МОЛОКЕ И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Зверева Е. А.¹, Смирнова Н. И.¹, Жердев А. В.¹, Дзантиев Б. Б.¹, Юрова Е. А.²,
Денисович Е. Ю.², Жижин Н. А.², Харитонов В. Д.², Агаркова Е. Ю.², Ботина С. Г.²,
Пономарева Н. В.³, Мельникова Е. А.⁴

¹Институт биохимии им. А. Н. Баха Российской академии наук, Москва, Россия (119071, Москва, Ленинский проспект, 33), e-mail: zverevaea@yandex.ru;

²Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности Российской академии сельскохозяйственных наук, Москва, Россия (115093, Москва, ул. Люсиновская, 35/7);

³Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия (394000, Воронеж, пр. Революции, 19);

⁴ОАО Молочный комбинат «Воронежский», Воронеж, Россия (394000, Воронеж, ул. 45 Стрелковой Дивизии, 259).

Разработана методика определения β -лактоглобулина (БЛГ) в молоке и молочных продуктах с применением метода иммуноферментного анализа (ИФА). Контроль содержания β -лактоглобулина (БЛГ) осуществляют в молоке и молочных продуктах, включая продукты с пониженной аллергенностью, получаемые путем ферментативного гидролиза молочного белка. Изучены концентрационные и кинетические характеристики взаимодействий в системе иммуноанализа, определен оптимальный режим проведения иммунодетекции. Показано, что оптимальные аналитические характеристики ИФА обеспечиваются при иммобилизации в лунках планшета БЛГ в концентрации 5 нг/мл и использовании антител против БЛГ в концентрации 0,2 мкг/мл. Сокращение продолжительности конкурентной стадии в два раза, с обычного часа до 30 минут, не приводит к потере ни чувствительности, ни амплитуды детектируемого сигнала. Предлагаемая методика позволяет проводить все стадии анализа при комнатной температуре. Рабочий диапазон определяемых концентраций составляет от 0,03 до 2,5 мкг/мл. Коэффициент вариации в рабочем диапазоне составляет от 1,8 % до 9,2 %, а в экспериментах по воспроизводимости измерений в течение недели – не более 10,5 %.

Ключевые слова: β -лактоглобулин, аллергенность, иммуноанализ, ИФА, молоко и молочная продукция.

DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION OF BETA-LACTOGLOBULIN IN MILK AND MILK PRODUCTS BY ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

Zvereva E. A.¹, Smirnova N. I.¹, Zherdev A. V.¹, Dzantiev B. B.¹, Yurova E. A.²,
Denisovich E. Y.², Zhizhin N. A.², Kharitonov V. D.², Agarkova E. Y.², Botina S. G.²,
Ponomareva N. V.³, Melnikova E. A.⁴

¹A.N. Bach Institute of biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia (119071 Moscow, Leninsky Prospect 33), e-mail: zverevaea@yandex.ru;

²All-Russian research institute of dairy industry, Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow, Russia (115093 Moscow, Lyusinovskaya street 35/);

³Voronezh state university of engineering technologies, Voronezh, Russia (394000 Voronezh, Prospect Revolyutsii 19);

⁴Public corporation Dairy combine "Voronezhsky", Voronezh, Russia (394000 Voronezh, 45th Strelkovoy Divizii street 259).

Method for determination of beta-lactoglobulin (BLG) in milk and milk products by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been developed. This method is used for the content control of beta-lactoglobulin in milk and milk products, including products with reduced allergenicity, obtained by enzymatic hydrolysis of milk protein. Concentration and kinetic characteristics of the interactions in the immunoassay system were studied and the optimal mode of immunodetection has been determined. It is shown that the optimal analytical parameters are provided when BLG is immobilized in ELISA microplate wells from a concentration of 5 ng/ml and the antibodies against BLG are used in a concentration of 0.2 μ g/ml. Shortening competitive step twice (from conventional 1 h to 30 min) does not lead to loss neither sensitivity nor amplitude of the detected signal. The proposed method allows to carry out all stages of the analysis at room temperature. Working range of the measured BLG concentration is from 0.03 to 2.5 μ g/ml. The coefficient of variation in the working range is from 1.8 % to 9.2 %; the reproducibility of measurements in the course of a week – not more than 10.5 %.

Keywords: β -lactoglobulin, allergenicity, immunoassay, enzyme immunoassay, dairy industry.

Введение

В последние годы мировая медицинская статистика констатирует рост числа аллергических заболеваний. Причины этого связаны с рядом факторов, способствующих аллергизации населения: ухудшением экологической обстановки; увеличением случаев контакта населения с химическими веществами как на производстве, так и в быту; нерациональным питанием, применением продуктов с пищевыми добавками; растущей урбанизацией, изменением образа жизни, увеличением числа стрессовых ситуаций; увеличением потребления лекарственных препаратов [5].

Коровье молоко входит в число наиболее распространенных пищевых аллергенов. По данным отечественных и зарубежных исследователей аллергия к молоку выявляется у 17,5 % детей младшего возраста, 13,5 % – детей в возрасте от 5 до 16 лет и 4 % – взрослого населения [5]. Сенсибилизация к белкам молока является началом формирования ряда патологических процессов, таких как бронхиальная астма, крапивница, атопический дерматит, дисфункции желудочно-кишечного тракта. Кроме того, пищевая аллергия в ряде случаев предшествует развитию выраженной пыльцевой аллергии [8, 10]. Тем не менее, учитывая востребованность молока как элемента пищевого рациона, содержащего ряд ценных биологически активных соединений, представляется наиболее оправданным не отказ от употребления молока и молочных продуктов при наличии аллергических реакций, а использование гипоаллергенных продуктов с низким содержанием основных аллергенных компонентов.

Белковая фракция коровьего молока содержит более 20 антигенов, из которых приоритетное внимание уделяется β -лактоглобулину (БЛГ) [8]. На долю БЛГ приходится 50 % белка сыворотки и около 10 % всех белков коровьего молока. БЛГ состоит из 162 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 18 кДа [5]. Молекула БЛГ содержит ряд IgE-связывающих эпитопов, часть из которых образована последовательно расположенными аминокислотами (линейные детерминанты), а часть имеют сложную пространственную структуру из компонентов разных участков пептидной цепи (конформационные детерминанты) [7].

Снижение аллергенности молока возможно за счет удаления или расщепления аллергенных компонентов при предварительной обработке молочного сырья. Элиминация или деструкция антигенных детерминант исключает возможность иммунохимических взаимодействий и инициацию аллергических процессов.

Производство гипоаллергенных продуктов предполагает наличие аналитического метода, дающего достоверную информацию о содержании аллергенных компонентов и

используемого для контроля, как технологических стадий производства, так и готовой продукции. Для выявления и количественной характеристики содержания БЛГ применяются различные физико-химические методы (высокоэффективная жидкостная хроматография, электрофорез [4, 6, 9]), а также иммунохимические методы анализа, основанные на специфическом связывании антител с соответствующими детерминантами белка. Преимуществами иммунодетекции являются сравнительная дешевизна используемого оборудования, а также большая производительность при работе с сериями проб [1]. Применение иммунохимических методов для контроля содержания БЛГ позволяет выявлять как нативные молекулы, так и антигенные детерминанты в составе фрагментов БЛГ.

Известные на сегодняшний день альтернативные аналитические системы используют, либо определение нативных молекул белковых аллергенов в двухсайтных схемах анализа (иммуноферментные тест-системы фирмы «RidaScreen»), либо прямую детекцию взаимодействия с антителами иммобилизованной белковой фракции молочного продукта [2]. В первом случае контроль суммарного содержания аллергенных компонентов осложнен тем, что частично разрушенные фрагменты белков с единичными сохранившимися антигенными детерминантами не могут образовывать детектируемые комплексы антитело-антиген-антитело. Во втором случае на результаты определения оказывают влияние неаллергенные компоненты тестируемой пробы, конкурентно сорбирующиеся на поверхности полистирола. Кроме того, сорбция разных биомолекул может сопровождаться разной степенью экранирования сайтов связывания антител, что также приведет к некорректной количественной оценке остаточной антигенности.

Чтобы исключить данные факторы, искажающие количественную оценку содержания аллергенных компонентов, оптимально использование конкурентной схемы иммуноанализа. В непрямом конкурентном формате иммуноферментного анализа (ИФА) на поверхности микропланшета иммобилизуется стандартный антиген, затем добавляются антитела и анализируемая проба. По конкурентному распределению антител между иммобилизованным антигеном и антигеном в пробе судят о содержании антигена в пробе (чем его больше, тем меньше связывание антител с поверхностью). Для детекции же связывания антител используют комплексообразование с ферментной меткой (пероксидазой), активность которой на последней стадии (после отмывки непрореагировавших компонентов) контролируют фотометрически – по образованию окрашенного продукта при трансформации субстрата.

Реализация конкурентного ИФА для технологического контроля в молочной промышленности требует решения ряда дополнительных методических задач для обеспечения эффективности и конкурентоспособности анализа. Важное значение для

разработки методики контроля приобретает время выполнения анализа. Традиционные микропланшетные тесты, используемые в медицине, предусматривают 1–1,5 часовые стадии инкубации иммунореагентов и суммарную продолжительность определения до 3 часов. Указанная продолжительность обеспечивает максимальный уровень связывания иммунореагентов при достижении системой химического равновесия, однако вопрос о том, насколько критично соблюдение этого максимального времени, остается открытым. Вторая сложность связана с тем, что в большинстве традиционных иммуноферментных методик инкубация реагирующих антигенов и антител проводится при повышенной температуре (37 °С), приближающей условия к естественным для иммунохимической реакции *in vivo*. Однако термостатирование усложняет анализ, особенно с учетом того, что промежуточные манипуляции (кроме полностью автоматизированных систем) проводятся при комнатной температуре. Более того, экзотермическая реакция антиген-антитело характеризуется сдвигом равновесия в сторону комплексообразования при уменьшении температуры.

Исходя из вышеизложенного, цель проведенного исследования состояла в разработке методики измерений содержания β -лактоглобулина и оптимизации иммуноферментного метода анализа, эффективного для применения в производственном контроле предприятий молочной промышленности, в том числе при производстве гипоаллергенных продуктов. Апробация разработанной методики измерений проводилась на различных объектах, включая молочную сыворотку, полученную при производстве полутвердых сыров на производственной площадке ЗАО «Молвест», а также гидролизаты и концентраты сывороточных белков, выработанных в ходе изготовления экспериментальных партий гипоаллергенных молочных продуктов.

Материалы и методы

При проведении работы были использованы следующие реагенты: поликлональные антитела кролика против БЛГ GTX77272 («GeneTex», США), конъюгат антител быка против IgG кролика с пероксидазой («Медгамал», Россия), β ЛГ, Тритон X-100, дигидрохлорид 3,3',5,5'-тетраметилбензидина («Sigma», США), цитрат натрия, диметилсульфоксид (ДМСО) («MP Biomedicals», Великобритания), NaCl («ДиаэМ», Россия), лимонная кислота, K_2HPO_4 , КОН («Химмед», Россия). Все вспомогательные реагенты (соли, кислоты, щелочи, органические растворители) были аналитической или химической чистоты.

ИФА проводили в 96-луночных прозрачных полистироловых микропланшетах Costar 9018 («Corning Costar», США). Для этого БЛГ в концентрации 5 нг/мл в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 7.4, с 0.1 М NaCl (ФБС) иммобилизовали из объема 100 мкл в лунках микропланшета в течение ночи при 4 °С. Затем четырехкратно отмывали микропланшет ФБС с 0.05 % Тритона X-100 (ФБСТ).

Образцы молока и молочной продукции перед тестированием доводили до pH 4.6, добавляя по каплям раствор 2М HCl и тщательно перемешивая. Образцы инкубировали 20 мин при комнатной температуре, после чего, центрифугировали в течение 15 мин при 14000 об/мин и разбавляли ФБС в определенных соотношениях.

Далее в лунки микропланшета вносили по 50 мкл раствора БЛГ (интервал концентраций от 100 мкг/мл до 5 нг/мл – для построения калибровочной кривой) или 50 мкл пробы в ФБСТ и добавляли по 50 мкл антител против БЛГ в концентрации 0.2 мкг/мл в ФБСТ. Микропланшет инкубировали 30 мин при комнатной температуре, затем четырехкратно отмывали ФБСТ, добавляли в лунки по 100 мкл иммунопероксидазного конъюгата (разведение 1:6.000 в ФБСТ) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре.

После отмывки (трижды ФБСТ и один раз – дистиллированной водой) определяли пероксидазную активность связавшейся с носителем ферментной метки. Для этого в лунки микропланшета вносили по 100 мкл 0.4 мМ раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в 40 мМ Na-цитратном буфере, pH 4.0, с 3 мМ H₂O₂, инкубировали 15 мин при комнатной температуре, останавливали реакцию добавлением 50 мкл 1 М H₂SO₄ и измеряли оптическую плотность (D₄₅₀) при длине волны 450 нм.

В предварительных экспериментах условия проведения ИФА – длительность стадий, концентрация антител против БЛГ, температура – варьировались с целью выбора оптимальных условий измерений.

Зависимости оптической плотности (y) от концентрации антигена в пробе (x) аппроксимировали 4-х-параметрической сигмоидной функцией $y=(A-D)/(1+(x/C)^B)+D$ с помощью программного обеспечения Origin 7.5 (OriginLab, США). Значение параметра C соответствует концентрации антигена, ингибирующей связывание антител на 50 % (IC₅₀).

Результаты и обсуждение

Выбор оптимальных концентраций иммунореагентов

Для того, чтобы минимизировать предел обнаружения БЛГ при сохранении точности анализа, была осуществлена серия экспериментов по выбору оптимальной концентрации БЛГ при иммобилизации в лунках микропланшета. Обнаружено, что характерные для большинства иммуноферментных микропланшетных систем нагрузки адсорбируемого белка в диапазоне 1–0,1 мкг/мл избыточны для разрабатываемой системы. БЛГ эффективно адсорбируется на поверхности полистирола даже из низких концентраций. В этой ситуации оправдано снижение концентрации БЛГ для адсорбции, что позволяет минимизировать риск формирования низкоаффинных полислоев адсорбированного белка, снижающих точность определения. Установлено, что значимые снижения амплитуды сигнала наблюдались ли при

концентрациях БЛГ от 10 нг/мл и ниже. Результаты соответствующего оптимизационного эксперимента представлены на рис. 1.

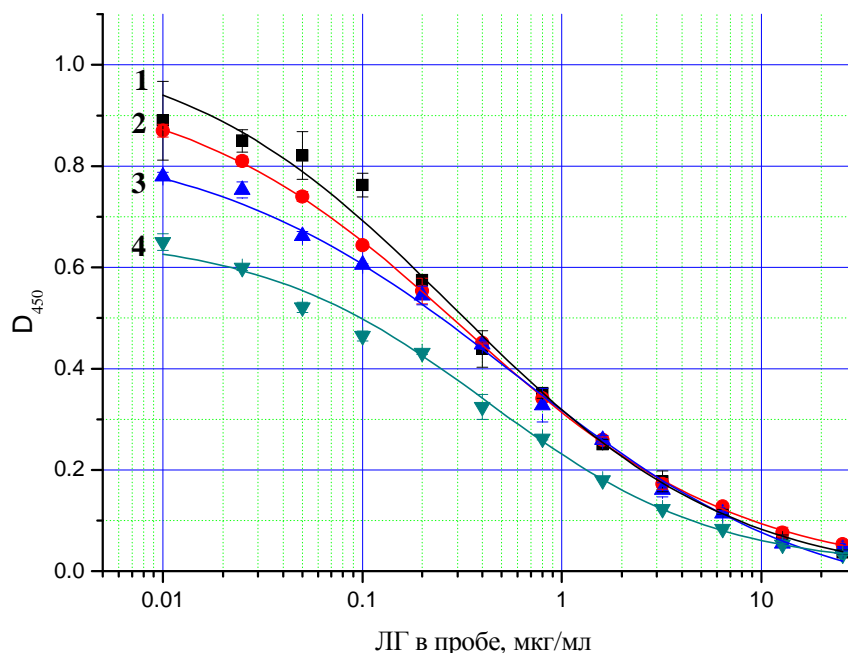


Рис. 1. Градуировочные кривые ИФА БЛГ (зависимости оптической плотности от концентрации БЛГ), полученные при разных концентрациях БЛГ, иммобилизуемого в лунках микропланшета. Кривые 1–4 соответствуют концентрациям БЛГ, равным 10, 7, 5 и 2 нг/мл

Полученные градуировочные кривые достоверно приближались четырехпараметрической сигмоидной функцией, рекомендуемой для описания хода кривых конкурентного ИФА. Аналитические параметры кривых, рассчитанные с использованием данного приближения, представлены в таблице 1.

Таблица 1

Влияние концентрации БЛГ при иммобилизации в лунках микропланшета на аналитические параметры градуировочной кривой иммуноферментного определения БЛГ

Концентрация БЛГ при сорбции, мкг/мл	IC20, мкг/мл	IC50, мкг/мл	IC80, мкг/мл
0,01	3,50	0,49	0,06
0,007	3,78	0,51	0,09
0,005	4,40	0,65	0,10
0,002	2,73	0,50	0,10

Как следует из сравнения величин IC₂₀, IC₅₀ и IC₈₀, при снижении концентрации БЛГ от 10 до 5 нг/мл происходит незначительное снижение амплитуды (т.е. уровня связывания в отсутствие конкурента), при этом чувствительность анализа не меняется. Дальнейшее понижение концентрации БЛГ существенно снижает амплитуду сигнала и, соответственно, ухудшает точность анализа. Исходя из этих данных, выбранная для дальнейшего использования в методике ИФА концентрация БЛГ при иммобилизации составила 5 нг/мл.

Для определения рабочей концентрации антител против БЛГ данный параметр варьировали от 0,04 до 0,4 мкг/мл и сопоставляли получаемые градуировочные кривые ИФА, получаемые при использовании различных концентраций антител. Оптимальные аналитические характеристики ИФА были достигнуты при использовании антител против БЛГ в концентрации 0,2 мкг/мл. Снижение концентрации антител ниже этого уровня влекло за собой падение амплитуды сигнала и соответствующее ухудшение точности, увеличение концентрации антител – при сохранении насыщающей амплитуды сдвигало конкурентную кривую в область более высоких концентраций.

Выбор оптимального времени инкубации иммунореагентов

С целью перехода от равновесного к кинетическому режиму проведения ИФА БЛГ было изучено влияние времени инкубации реагентов на конкурентной стадии на чувствительность и воспроизводимость результатов анализа (рис. 2).

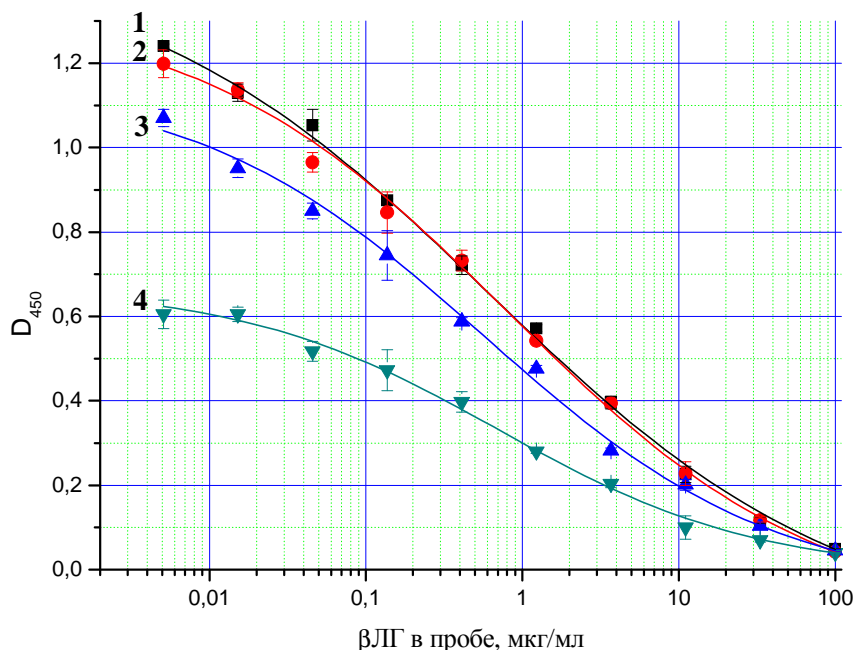


Рис. 2. Градуировочные кривые ИФА БЛГ, полученные при разной продолжительности конкурентной стадии: 1–60 мин.; 2–45 мин.; 3–30 мин.; 4–15 мин

Показано, что сокращение продолжительности конкурентной стадии в два раза, с обычного часа до 30 минут, не приводит к потере чувствительности и амплитуды детектируемого сигнала, что позволяет вдвое сократить продолжительность анализа. Соответствующие аналитические характеристики для разных вариантов проведения ИФА представлены в таблице 2.

Таблица 2

Влияние времени инкубации реагентов на конкурентной стадии на аналитические характеристики ИФА БЛГ

Время инкубации на конкурентной стадии, мин	IC20, мкг/мл	IC50, мкг/мл	IC80, мкг/мл
60	12,10	0,86	0,07
45	11,70	0,96	0,09
30	9,77	0,75	0,07
15	13,20	1,20	0,16

Предотвращение влияния матрикса пробы на результаты ИФА

Влияние матрикса молока на параметры иммуноферментной реакции обусловлено наличием в нем большого количества белков и жира (в цельном молоке от 3,5 до 5,5 %). Для того чтобы уменьшить или устранить это влияние, используются разные способы: разведение пробы, осаждение белковой фракции, экстракция органическими растворителями.

Показано, что простое разведение пробы молока и молочной продукции не приводит к устранению влияния матрикса на результаты анализа, что обуславливает необходимость осуществления ряда вспомогательных операций, снижающих матриксное влияние. На основании [3] разработан способ пробоподготовки, который заключался в подкислении пробы молочной продукции до pH 4,6 с помощью 2М HCl и дальнейшего центрифугирования для отделения казеиновой фракции.

Разработанная система иммуноферментной детекции БЛГ позволяет проводить все стадии анализа при комнатной температуре без потери в характеристиках точности определения.

Аналитические характеристики разработанного метода определения БЛГ

Типичная калибровочная кривая зависимости оптической плотности от концентрации БЛГ (полученная в оптимизированных условиях) представлена на рис. 3.

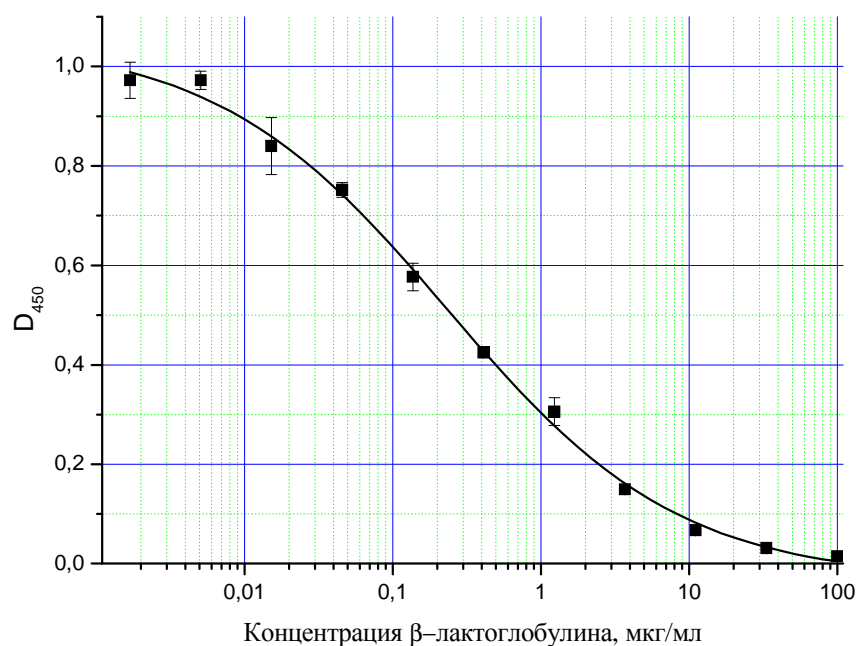


Рис. 3. Калибровочная кривая иммуноферментного определения БЛГ

Рабочий диапазон определяемых концентраций составляет от 0,03 до 2,5 мкг/мл. Значения коэффициента вариации в рабочем диапазоне определяемых концентраций составляет от 1,8 % до 9,2 %, а в экспериментах по воспроизводимости в течение недели – не более 10,5 %. (см. таблицу 3).

Таблица 3

Значения коэффициента вариации в рабочем диапазоне определяемых концентраций при проведении ИФА БЛГ в оптимизированном режиме

Концентрация БЛГ, мкг/мл	Коэффициент вариации, %
2,50	6,00
1,23	9,20
0,41	1,75
0,14	4,68
0,046	1,90
0,03	6,91

Заключение

В настоящее время увеличивается производство продуктов функционального назначения, появляются новые, современные технологии, позволяющие создавать продукт с

заданными свойствами. Продукты с пониженной аллергенностью, вырабатываемые на основе ферментативного гидролиза молочного белка, наиболее востребованы на рынке функционального питания. Такие гипоаллергенные продукты предназначены для питания с целью коррекции патологических процессов и профилактики осложнений при пищевой аллергии.

Разработанная методика измерения β -лактоглобулина с применением метода ИФА обеспечивает возможность определения содержания β -лактоглобулина в молоке-сырью и на всех стадиях его переработки, что позволяет контролировать эффективность технологического процесса производства гипоаллергенных молочных продуктов.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы», государственный контракт № 12.527.11.0008 от 04.06.2012).

Список литературы

1. Егоров А. М., Осипов А. П., Дзантиев Б. Б., Гаврилова Е. М. Теория и практика иммуноферментного анализа – М.: Высш. шк., 1991. – 288 с.
2. Патент РФ на изобретение № 2375910, 03.06.2008.
3. Blanc F., Bernard H., Alessandri S. et al. Update on optimized purification and characterization of natural milk allergens // Mol. Nutr. Food Res. – 2008. Vol. 52. – P. 166–175.
4. Bonfatti V., Grigoletto L., Cecchinato A. et al. Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants // J. Chromatogr. A. – 2008. Vol. 1195. – P. 101–106.
5. Fiocchi A., Brozek J., Schunemann H. et al. World Allergy Organization (WAO) diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA) guidelines // Pediatr. Allergy Immunol. – 2010. Suppl. 21. – P. 57–161.
6. Galvani M., Hamdan M., Righetti P.G. Two-dimensional gel electrophoresis/matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry of a milk powder // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2000. Vol. 14. – P. 1889–1897.
7. Picariello G., Ferrantia P., Fierro O. et al. Peptides surviving the simulated gastrointestinal digestion of milk proteins: Biological and toxicological implications // J. Chromatogr. B. – 2010. Vol. 878. – P. 295–308.
8. Restani P., Ballabio C., Di Lorenzo C. et al. Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events // Anal. Bioanal. Chem. – 2009. Vol. 395. – P. 47–56.

9. Strange E. D., Malin E. L., Van Hekken D. L., Basch J. J. Chromatographic and electrophoretic methods used for analysis of milk proteins // J. Chromatogr. – 1992. Vol. 624. – P. 81–102.
10. Wal J.M. Bovine milk allergenicity // Ann. Allergy Asthma Immunol. – 2004. Vol. 93. – P. 2–11.

Рецензенты:

Сахаров И.Ю., д.х.н., профессор химического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, г.Москва.

Ярополов А.И., д.х.н., профессор, заведующий лабораторией химической энзимологии Института биохимии им. А. Н. Баха Российской академии наук, г.Москва.