

УДК 637.072

ПОЛУЧЕНИЕ РАКТОПАМИН-СПЕЦИФИЧНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ СТИМУЛЯТОРА РОСТА В МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ

Каукабаева Г.К. , Мухлис Ш.Е. , Ахметкаримова Ж.С. , Ескендирова С.З.* 

Национальный центр биотехнологии, Кургальжинское шоссе, здание 13/5, Астана, Казахстан

*Автор корреспонденции: eskendirova@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Рактопамин - широко используемый в качестве кормовой добавки в промышленном животноводстве развитых стран нестероидный стимулятор роста, который увеличивает конверсию корма, способствует уменьшению жировой массы и увеличению мышечной массы. Однако остатки рактопамина накапливаемые в мясе животных крайне негативно влияют на здоровье человека. Эта добавка запрещена в странах Таможенного союза и Евросоюза, однако содержится в животноводческой продукции, поставляющейся из США, Канады, Мексики, Бразилии. Целью исследования явилось получение рактопамин-специфичных антител для разработки метода детекции стимулятора роста в мясной продукции. Успешный синтез конъюгатов рактопамина с высокомолекулярными носителями обеспечил получение поликлональных и моноклональных антител с направленной специфичностью к рактопамину в непрямом ИФА. Результаты определения аналитической чувствительности конкурентного ИФА (буфер и матрица) подтверждают возможность использования рактопамин-специфичных антител в качестве иммунореагентов для эффективного мониторинга остатков рактопамина в мясной продукции.

Ключевые слова: рактопамин, антитела, конъюгат, чувствительность, буфер, матрица

ВВЕДЕНИЕ

Одним из международных широко обсуждаемых вопросов обеспечения безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов является применение в животноводстве гормональных препаратов, в том числе стимуляторов роста, предназначенных для продуктивных животных.

Рактопамин – наиболее широко используемый в качестве кормовой добавки в промышленном животноводстве развитых стран нестероидный стимулятор роста [1-4]. Рактопамин является продуктом компании Elanco (США) и утвержден FDA с 2000 г. для животноводства и для промышленного свиноводства. Используется в США и Канаде под названием Paylean для свиней и Optaflex для крупного рогатого скота. Paylean популярен у производителей свинины, поскольку увеличивает среднесуточный прирост массы тела на 10 %, снижая потребление кормов на 25 %, что позволяет получить высокие прибыли. Для крупного рогатого скота использование препарата Optaflex обеспечивает дополнительное увеличение массы тела на 15% [1,3].

По своему физиологическому действию рактопамин является стимулятором β_2 – адренорецепторов, находящихся в бронхах, скелетных мышцах, сердце, кровеносных сосудах, нервной системы, матке и других органах [5,6]. Применение рактопамина в качестве кормовой добавки способствует образованию постного мяса у животных. При использовании рактопамина добавляют в корм, откуда он распространяется через кровь в мышечную ткань, где связывается со специфическими β – рецепторами в мембранах клеток мышц. Связывание его с рецепторами в мышечной ткани приводит к увеличению размера мышечных волокон за счет повышенного синтеза белка и усилению липолиза при действии на рецепторы в жировой ткани. Это обеспечивает стимуляцию роста и «жиросжигающий» эффект, приводящий к производству

привлекательной на вид продукции с пониженным содержанием жира. Таким образом, рактопамин увеличивает конверсию корма, способствует уменьшению жировой массы и увеличению мышечной массы [5-8].

Рактопамин является активным стимулятором сердечной деятельности и кровообращения (адреностимулятором), т. к. связывается с β – рецепторами сердца и кровеносных сосудов. Однако длительная активация β -агонистов вызывают увеличение частоты сердечных сокращений, системное расширение кровеносных сосудов и дестабилизацию сердечного ритма [5-7]. По данным Европейского агентства по безопасности пищевой продукции и Роспотребнадзора употребление мясopодуKтов при условии наличия допустимых остаточных количеств рактопамина может привести к функциональным нарушениям сердечно-сосудистой системы (повышенное артериальное давление, атеросклероз) [8,9].

Директива Евросоюза 96/22/ЕС содержит общий запрет на использование агонистов бета-адренорецепторов для сельскохозяйственных животных [8]. Однако на 35-й сессии Комиссии Codex Alimentarius с минимальным преимуществом были утверждены максимально допустимые уровни (МДУ) содержания рактопамина в мясе (свинина и говядина) – 0,01 мг/кг, в печени – 0,04 мг/кг, в почках – 0,09 мг/кг [10]. Использование рактопамина в качестве кормовой добавки запрещено в 160 странах, включая страны Таможенного союза и Евросоюза. Несмотря на это, рактопамин содержится в животноводческой продукции, поставляющейся из США, Канады, Мексики, Бразилии [5,6,8,10,11]

Физико-химические методы количественного анализа стимуляторов роста в мясной продукции основаны на высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ-МС). Эти методы имеют ряд недостатков, ограничивающих их широкомасштабное применение - высокая стоимость используемого оборудования, сложность приготовления

проб для анализа, необходимость привлечения высококвалифицированных специалистов, длительность и трудоемкость [5,6,10]. В последние годы в мировой лабораторной практике лидирующее положение занял иммуноферментный анализ (ИФА), что обусловлено сочетанием уникальной специфичности иммунохимического анализа с высокой чувствительностью детекции ферментативной метки. Высокие результаты достигаются благодаря использованию способности ферментов-биокатализаторов создавать каскадные системы усиления различных химических сигналов [5-8,10]. Основными достоинствами ИФА является высокая стабильность реактивов, простота методов регистрации, скорость постановки анализа и дешевизна оборудования.

С учетом достаточно высокого уровня потребления мясной продукции в статусе питания населения, а также необходимости контроля за содержанием рактопамина в животноводческой продукции, является актуальным разработка отечественного метода детекции рактопамина в продуктах животноводства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные животные: использованы 15 мышей линии BALB/c (возраст 1 месяц, живая масса 45 гр.) и 4 кролика породы шиншилла (в возрасте 3 месяцев, живая масса 3,2 кг) для получения поликлональных и моноклональных антител. Животные содержались по стандартам GLP (протокол №4 локальной этической комиссии ТОО «Национальный центр биотехнологии» от 24 октября 2023 года).

Коммерческие препараты рактопамина. В работе использовали коммерческий препарат рактопамина гидрохлорид, 100 мг (Sigma-Aldrich).

Конъюгация рактопамина с высокомолекулярными белковыми носителями – бычьим сывороточным альбумином (БСА) и овальбумином (ОВА) была осуществлена с использованием трех сшивающих агентов: глutarового альдегида (GA) («Sigma-Aldrich», Сент-Луис, США) [12], 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (EDC) («Sigma-Aldrich», Сент-Луис, США) [13] и формальдегида (FA) («Sigma-Aldrich», Сент-Луис, США) [14].

Методы приготовления конъюгатов рактопамина с высокомолекулярными носителями

Метод № 1. К 10% раствору носителя (БСА или ОВА) в 0,1 М бикарбонатном буфере (pH 8,5) добавляли гаптен-рактопамин (до концентрации 2 мг/мл) и вносили 2,5% раствор глutarового альдегида до конечной концентрации 1%. Инкубировали смесь при +4°C в течение 2 часов при покачивании. Для стабилизации конъюгата добавляли борогидрид натрия (в концентрации 10 мг/мл). Смесь выдерживали в течение 1 часа при 4°C. Конъюгат от избытка реагентов очищали диализом против PBS, pH 7,4.

Метод № 2. К 10 % раствору носителя (БСА или ОВА) в 0,1М буфере MES (морфолино-2-этансульфоновая кислота, pH 5,0) добавляли равное количество раствора рактопамина в 0,1М буфере MES в концентрации 7,5 мг/мл. При перемешивании по каплям к реакционной смеси добавляли 0,5 мл 0,1% водорастворимого карбодиимида в

ультрачистой воде. Выдерживали смесь 2 часа при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Конъюгат очищали гель-фильтрацией.

Метод № 3. 10% раствор носителя (БСА или ОВА) в 0,1М буфере MES (pH 4,5), первоначально смешивали с раствором гаптена-рактопамина (в концентрации 4 мг/мл) и добавляли 0,1 мл 37% раствора формальдегида (v/v). Смесь перемешивали и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение ночи. Конъюгат диализировали с использованием 0,01 М фосфатно-солевого буфера (PBS, pH 7,2).

Проведение гель-фильтрации. Сефадекс G-25 в количестве 4-5 г суспендировали в 0,05М трис-HCl pH 7,5 (из расчета на 1 г сефадекса 50 мл раствора), и оставляли для набухания на 2-3 суток при комнатной температуре. Заполняли хроматографическую колонку (размером 1,5х30см) гелем, предварительно установив ее строго вертикально. После заполнения колонки (образования плотного столбика геля высотой 20 см), через нее пропускали несколько объемов буфера для уравнивания. Открывали выходное отверстие колонки и выпускали буферный раствор до тех пор, пока его уровень в верхней части колонки не достигал уровня геля. Затем осторожно на гель насаивали 1,2 мл пробы. Для элюирования через колонку пропускали в общей сложности 150-200 мл буферного раствора со скоростью 40-60 мл/ч и собирали фракции по 5 мл.

Получение поликлональных антител. Иммунизация кроликов проведена с использованием антигена – рактопамин + БСА в концентрации 1 мг/мл. Антиген вводился подкожно в область спины в объеме 1 мл с использованием иммуностимуляторов -полного адьюванта Фрейдна (ПАФ) и неполного адьюванта Фрейдна – (НАФ), в несколько точек с интервалами иммунизации в 14 дней, в течение 84 суток (3 месяца). По завершении иммунизации проведён отбор сыворотки крови, из которой были выделены иммуноглобулины методом осаждения сульфатом аммония, с последующим диализом и хранением при -20°C. Специфичность полученных поликлональных антител определяли с помощью ИФА.

Иммунизация мышей. Для иммунизации мышей линии Balb/c в первый день вводили внутрибрюшинно по 50 мкг рактопамин+БСА в 0,1 мл ПАФ. На 7-й день иммунизации мышам вводили внутрибрюшинно по 25 мкг с равным объемом НАФ и на 11, 12, 13-й дни - в аналогичной дозе в PBS, pH 7,2. Взятие крови у мышей проводили через 3 дня после последней иммунизации и исследовали в непрямом варианте ИФА на содержание специфических антител.

Гибридизация. Из каждой группы мышей отбирали животных с максимальными титрами антител, селезенки которых были использованы в качестве источника иммунных лимфоцитов. Слияние клеток миеломы с иммунными лимфоцитами проводили с помощью полиэтиленгликоля-4000. Клетки миеломы X63-Ag 8.6.5.3 в фазе экспоненциального роста сливали и иммунными спленocyтocyтами в соотношении 1:10. Селекцию гибридных клеток проводили на среде ГАТ. Скрининг гибридом и исследование специфичности их взаимодействия осуществляли на основе непрямого ИФА.

Определение рактопамин-специфичных антител в прямом ИФА.

В лунки 96-луночного планшета для иммунологических реакции вносили раствор конъюгата «рактопамин+ОВА» в концентрации 2,5 мкг/мл, в 100 мкл 3ФР, pH 7,2-7,4 и выдерживали при - 4° С в течение ночи. Планшет отмывали 3 раза PBS, содержащим 0,1% твин-20 (PBS-Tw) и 3 раза PBS. После этого в лунки планшета по 100 мкл вносили разведения (1:50 и более) сывороток крови мышей и кроликов, иммунизированных конъюгатом «рактопамин+БСА» и инкубировали в термостате при 37° С в течение 1 часа. После инкубации содержимое лунок удаляли, повторяли процедуру отмывки планшета и в каждую лунку вносили по 100 мкл рабочего разведения антивидового конъюгата, меченного пероксидазой хрена, в PBS-Tw. Через 1 час после инкубации при 37° С повторяли процедуру отмывки планшета с целью удаления несвязанных продуктов реакции. Наличие специфических антител определяли количественно по расщеплению субстрата в присутствии хромогена – тетраметилбензидина (ТМБ). Результаты реакции учитывали на спектрофотометре путем измерения оптической плотности жидкости в каждой лунке при длине волны 450 нм.

Получение препаративных количеств моноклональных антител. Клетки гибридом ресуспендировали в неполной ростовой среде и вводили 2×10⁶ клеток внутривенно мышам линии Balb/c, которым за 7-10 дней до введения гибридомы был инъецирован пристан - 2,6,10,14-тетраметилпентадекан (Sigma, США) в дозе по 0,5 мл на голову. После образования асцитной опухоли через 12-14 дней мышь забивали методом цервикальной дислокации. Асцитную жидкость отделяли от гибридных клеток центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 минут и использовали для выделения из нее иммуноглобулинов.

Очистку моноклональных антител из асцитной жидкости осуществляли методом высаливания сульфатом аммония до 50% насыщения. Очищенные моноклональные антитела в виде асцитной жидкости хранили при -70°С без консерванта или при +4°С с добавлением 0,1% азида натрия.

Константу связывания моноклональных антител определяли по методу J. Beatty et al. [15].

Постановка конкурентного варианта ИФА. Лунки 96-луночного полистиролового планшета сенсibilizировали по 0,1 мл раствора конъюгата рактопамин + ОВА в концентрации 1,0 мкг/мл в PBS, pH 7,2. Затем планшет выдерживали при +4°С в течение 18 часов. После инкубации содержимое лунок удаляли и планшет отмывали трехкратно PBS, содержащим 0,5% твина-20 (PBS-Tw). Затем в лунки планшета вносили по 0,05 мл стандартных растворов рактопамина (в PBS) в порядке возрастания концентраций (от 0 нг до 100 нг/мл) и по 0,05 мл рабочего раствора моноклональных (МКА) или поликлональных (ПКА) антител (в концентрации 1,0 мкг/мл). Планшет инкубировали в термостате при 37° С в течение 1 часа. После инкубации содержимое лунок удаляли, повторяли процедуру отмывки планшета и в каждую лунку вносили по 0,1 мл рабочего разведения конъюгата - антител кролика против иммуноглобулинов мышей, меченные пероксидазой хрена, в PBS-Tw. Через 1 час после инкубации при 37° С повторяли процедуру отмывки планшета с целью удаления несвязанных продуктов реакции. Наличие специфических антител определяли количественно по расщеплению субстрата – тетраметилбензидина (ТМБ). Результаты реакции учитывали на спектрофотометре путем измерения оптической плотности жидкости в каждой лунке при длине волны 450 нм.

Статистические данные представлены в виде средних значений ± стандартное отклонение (SD). Статистическое сравнение между двумя группами проводили с использованием непарного двустороннего *t*-критерия Стьюдента. Графики были построены с использованием программы GraphPad Prism 11.0.2 (92) (GraphPad Software, Inc., Boston, USA). Значение *p* считалось статистически значимым при *p* < 0,05. Для оценки зависимости между исследуемыми показателями применяли линейный регрессионный анализ с расчетом уравнения линейной регрессии и коэффициента детерминации (*R*²).

Таблица 1. Конъюгация рактопамина с высокомолекулярными носителями

Сшивающий агент	Параметры конъюгации					
	Концентрация сшивающего агента	Соотношение для конъюгации рактопамин: носитель	Буфер для конъюгации	Продолжительность конъюгации	После диализа	Оптическая плотность (абсорбция) конъюгатов (A ₂₈₀ нм)
Формальдегид (FA)	4,0 мг/мл	20:1	0,1М буфер MES, pH 5,0	при комнатной температуре 18 часов	денатурация конъюгата	0,171± 0,9
Глutarовый альдегид (GA)	1,25 мг/мл	11:1	0,1М бикарбонатный буфер, pH 8,5	3 часа при 4°С с перемешиванием	однородные гомогенные растворы	1,010± 0,087
Карбодимид (EDC)	1,5 мг/мл	13:1	0,1М буфер MES, pH 5,0	2 часа при комнатной температуре	однородные гомогенные растворы	0,957±0,051

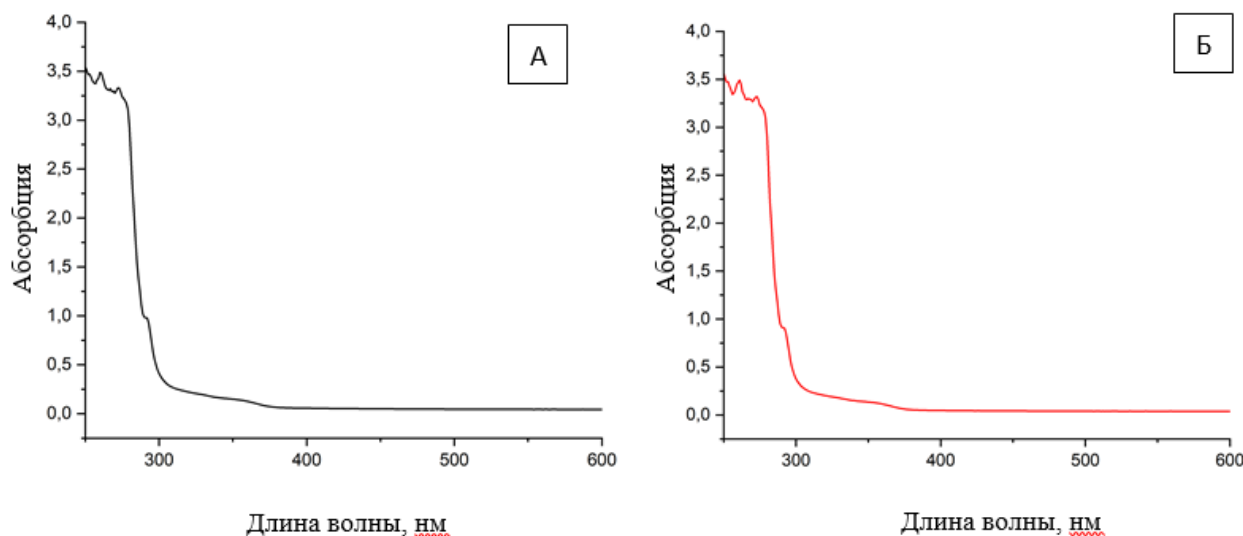


Рисунок 1. УФ- спектроскопия конъюгатов рактопамина с БСА (А) и ОВА (Б)

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение конъюгатов рактопамина с высокомолекулярными носителями.

Получение специфических антител (иммуноглобулинов) к гаптенам является трудновыполнимой задачей, поскольку гаптены самостоятельно не вызывают иммунного ответа. В связи с неиммуногенностью рактопамина осуществлено получение конъюгированных препаратов рактопамина методами сшивания гаптена с высокомолекулярными носителями – БСА и/или ОВА. Были испытаны 3 способа конъюгации рактопамина с БСА и/или ОВА с использованием в качестве сшивающих агентов - глутарового альдегида (GA), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (EDC) и формальдегида (FA).

При использовании формальдегида (FA) для получения рактопамина-белковых конъюгатов отмечалось недостаточное растворение компонентов, входящих в состав конъюгата, что потребовало длительной инкубации раствора в течение ночи. При диализе (PBS, pH 7,2) наблюдалась денатурация конъюгата в виде выпадения нерастворимого осадка.

Успешный синтез конъюгатов рактопамина с БСА и/или ОВА достигнут в случае использования глутарового альдегида и карбодиимида, как агентов, сшивающих аминогруппы гаптена с карбоксильными группами БСА и/или ОВА. В результате 5 серии опытов получены однородные и гомогенные растворы конъюгатов рактопамина в достаточном объеме.

Конъюгаты рактопамина с высокомолекулярными носителями характеризуются спектрами поглощения в ультрафиолетовой (УФ) области, которые объединяют абсорбцию исходного белка и гаптена. При добавлении рактопамина к белку (БСА и/или ОВА) поглощение на длине волны 280 нм возрастает с ростом концентрации гаптена. Рактопамин имеет максимум поглощения около 274 нм. В конъюгате этот пик часто сливается с белковым пиком или вызывает его незначительный сдвиг.

УФ-спектроскопия подтвердила эффективность конъюгации рактопамина с БСА и/или ОВА увеличением

поглощения конъюгатов при длине волны 290 нм (рисунок 1).

Приготовленные конъюгаты распознавались коммерческим моноклональным антителом, специфичным к рактопамину (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) в непрямом ИФА в титре 1:3200.

Получение поликлональных антител (ПКА)

Для получения специфических поликлональных антител против рактопамина проводили иммунизацию кроликов конъюгированным антигеном - рактопамин+БСА сроком 84 дня. Как известно, использование для иммунизации лабораторных животных конъюгированных препаратов гаптена с высокомолекулярным носителем создает трудности при тестировании сыворотки крови на наличие специфических иммуноглобулинов. Специфические антитела вырабатываются в большей степени на антигенные детерминанты высокомолекулярного носителя - БСА, так как они составляют подавляющее преимущество титров антител иммунной сыворотки крови. Специфичность полученных кроличьих антисывороток анализировали непрямой ИФА с использованием для сенсibilизации планшета как гомологичного антигена - рактопамин+БСА (препарат иммуноген), так и гетерологичного антигена - рактопамин+ОВА (с заменой высокомолекулярного носителя БСА на ОВА) (рисунок 2).

Как и следовало ожидать, в случае использования гомологичного антигена - рактопамин+БСА установлены максимальная активность титров ПКА в сыворотках крови иммунизированных кроликов (n=3), которые составили в среднем - 1:59733. При иммобилизации на планшет гетерологичного антигена - рактопамин+ОВА аналогичный показатель составил 1:17066, что указывает уровень детекции рактопамина-специфических поликлональных антител. Все сыворотки крови контрольных (неиммунизированных) кроликов показали отрицательный результат. Специфичность ПКА к гаптену-рактопамину подтверждена активным взаимодействием положительного контроля - коммерческих моноклональных антител (МКА) к рактопамину – 1:72000.

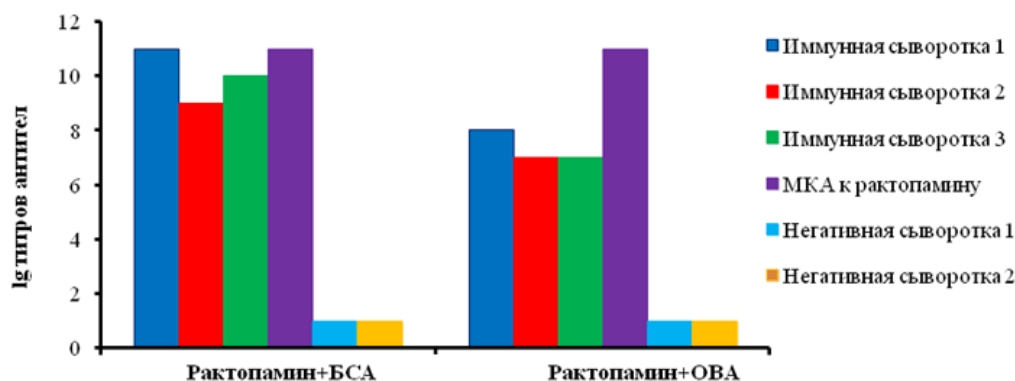


Рисунок 2. Специфическая активность кроличьих ПКА против рактопamina

Таблица 2. Результаты гибридизации миеломных клеток со спленоцитами мышей *Balb/c*, иммунизированных конъюгатом рактопамин+БСА

Гибридизация	Число засеянных лунок	Лунки, в которых наблюдался рост клонов гибридом		Выход позитивных клонов продуцентов МКА	
		количество	%	количество	%
1	384	125	32,5	15	12,0
2	384	57	14,8	3	5,2
3	384	169	44,0	21	12,4
Итого	1152	351	30,4	39	11,1

Получение штаммов гибридом-продуцентов моноклональных антител

Для получения штаммов гибридом – продуцентов МКА проводили иммунизацию инбредных мышей линии *BALB/c* с использованием в качестве иммуногена конъюгата рактопамин+БСА. Используемая длительная схема иммунизации (15 дней) мышей линии *BALB/c* оказалась пригодна для стимулирования иммунной системы организма подопытных животных на выработку специфических антител против испытуемого антигена. Средние титры антител к гетерологичному антигену - рактопамин+ОВА составили 1:21333 ((n=3).

Проведено 3 гибридизаций клеток миеломной линии *X63-Ag 8.6.5.3* с иммунными лимфоцитами мышей с целью достижения наилучшего результата слияния клеток (таблица 2).

Максимальный рост гибридом наблюдался в 125-169 лунках из 384 засеянных, т.е. процент гибридизации клеток был сравнительно высок (32,5- 44,0%). При исследовании культуральной жидкости (супернатанта) антигетерологичного антигену - рактопамин+ОВА в ИФА была установлена у 39 клонов из 351 образовавшихся гибридом, что составляет 11,1%. Выход позитивных клонов из общего числа полученных гибридом в наших опытах находился в пределах 5,2% до 12,4%, что свидетельствует о довольно высоком иммунном фоне пула В - лимфоцитов и о возможности изолирования активных клонов с желаемыми свойствами.

Активность продукции антител 39 клонами, положительными по отношению к гетерологичному антигену - рактопамин+ОВА снижалась в течение трех тестиро-

ваний. Стабильную секрецию специфических иммуноглобулинов показали лишь 5 клонов гибридом (1A10, 1F5, 5G3, 8E7, 9H11), у которых максимальные титры надосадочной культуральной жидкости находились в пределах 1:8-1:128. Клоны клеток 8E7 и 1A10 как наиболее активные и стабильные линии гибридом были подвергнуты клонированию методом лимитирующих разведений.

Одной из основных характеристик МКА является определение константы связывания (аффинность), которая характеризует степень химической связи антигенного эпитопа с активным центром молекулы иммуноглобулина. Высокие показатели константы связывания МКА, продуцируемых штаммами гибридом 8E7 и 1A10 - $4,5 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ и $1,2 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ соответственно – обусловили их специфическую активность в ИФА (таблица 3).

Согласно результатам определения специфичности в непрямом варианте ИФА МКА штаммов-гибридом 8E7 и 1A10 оказались высокоспецифичны к антигену-конъюгату, состоящему из гаптена рактопamina и другого (гетерологичного) высокомолекулярного носителя ОВА (овальбумина), что позволяет детектировать наличие антител специфичных непосредственно к использованному гаптену. МКА 8E7 показали высокую степень сродства к рактопамину в титрах 1:1024 в культуральной жидкости и 1:409 600 в асцитной жидкости, тогда как у МКА штамма гибридомы 1A10 уровень взаимодействия с аналогичным антигеном составил 1:256 и 1:102400 соответственно.

Специфичность детекции рактопamina МКА штаммов-гибридом 8E7 и 1A10 доказана отсутствием связывания с другими бета-адреностимуляторами (кленбутерол, сальбутамол) и антибиотиками (канамицин, гентамицин) как в культуральной, так и в асцитной жидкости.

Таблица 3. Изучение специфичности и активности МКА штаммов-гибридом 8Е7 и 1А10 в непрямом варианте ИФА

Наименование антигенов	Титры МКА штаммов-гибридом	
	8Е7	1А10
рактопамин + ОВА	$\frac{1:1024}{1:409600}$	$\frac{1:256}{1:102400}$
кленбутирол+ОВА	PO	PO
салбутамол+ОВА	PO	PO
канамицин+ОВА	PO	PO
гентамицин+ОВА	PO	PO
Примечание - в числителе – в культуральной жидкости, в знаменателе – в асцитной жидкости; PO - реакция отрицательная		

Разработка конкурентного ИФА для детекции рак-топамина

Для достижения максимальной чувствительности конкурентного ИФА методом шахматного титрования оптимизировали условия проведения ИФА, варьируя концентрацию рактопамина, иммобилизованного на твердой фазе, и концентрацию детектируемых МКА или ПКА в растворе. Несоответствие между количеством антигена, иммобилизованного на твердой фазе, и концентрацией детектируемых антител в растворе приводило к усилению неспецифической реакции при формировании иммунного комплекса «антиген-антитело». Подобраны оптимальные соотношения рабочих концентрации основных иммуноре-агентов – антигена (конъюгата рактопамин + ОВА) и детектирующих антител (МКА или ПКА) - 1,0 мкг/мл и 2,5 мкг/мл соответственно.

Для реализации конкурентного ИФА использовали МКА штамма гибридомы 8Е7 или кроличьи ПКА. В ходе реакции рактопамин в образцах или стандартах конкурирует с рактопамином на твердой фазе за центры связывания антител к рактопамину. Количество первичных антител, связавшихся с иммобилизованным антигеном, определяют с помощью вторичных (антивидовых) антител, меченых ферментом пероксидазой. Существует обратная зависимость между значениями оптической плотности образцов и концентрацией рактопамина.

Для определения аналитической чувствительности

конкурентного ИФА использовали двукратные разведения стандартных растворов рактопамина в буфере PBS в интервале концентрации от 100 до 1,5 нг/мл. Минимальную детектируемую концентрацию определяли как концентрацию, соответствующую значению ниже 85% оптического поглощения отрицательного контроля.

Анализ с каждой стандартной концентрацией рактопамина проводился в 5 повторах. Рассчитывали средние значения оптической плотности (ОП) каждого стандартного раствора рактопамина, полученные в результате пяти параллельных измерений. Определяли значение относительной оптической плотности стандартов, выраженное в процентах поглощения, по формуле:

$$\frac{\text{Средняя ОП лунки со стандартом (пробой)}}{\text{Средняя ОП лунки с нулевым стандартом}} \times 100 = \% \text{ поглощения (относительная ОП)}$$

По результатам определения чувствительности конкурентного варианта ИФА на основе МКА штамма гибридомы 8Е7 и кроличьих ПКА установлен минимальный предел детекции рактопамина в стандартных растворах - 1,5 нг/мл (рисунок 3).

При разработке методики проведения анализа пищевых продуктов важное место занимает пробоподготовка, целью которой является наиболее полное извлечение следовых количеств аналита и эффективная очистка от ком-

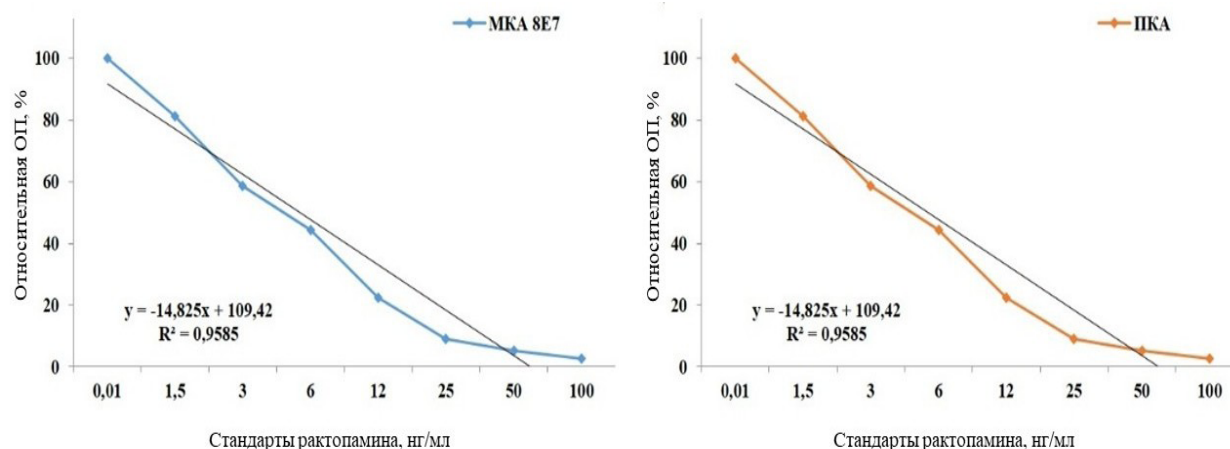


Рисунок 3. Калибровочные кривые стандартных растворов рактопамина в конкурентном варианте ИФА на основе МКА и ПКА

Таблица 4. Параметры пробоподготовки образцов мяса

Этапы пробоподготовки	Параметры пробоподготовки коммерческих тест-систем	
	Ridascreen Ractopamine ELISA	MaxSignal Ractopamine ELISA
Гомогенизация пробы (10 гр)	измельчение	измельчение
Экстракция	8 мл ацетонитрила + 1 мл этилацетата 30 минут перемешивание	6 мл 100% метанола + 2 мл n-гексана 10 минут перемешивание
Осаждение	Центрифугирование 5000 об/мин 10 минут	Центрифугирование 5000 об/мин 10 минут
Высушивание	Испарение надосадочной жидкости при температуре 60°C	Испарение нижнего (метанольного) слоя при температуре 60°C
Растворение сухого осадка	1 мл буфера для разбавления	1 мл буфера для разбавления

понентов биологической матрицы. Наиболее широко используемым приемом извлечения анализируемых веществ из биологических сред, в том числе продуктов питания, является экстракция.

Для оценки влияния матрицы образца (исследуемых проб мяса) на результаты анализа осуществлено приготовление модельных проб мяса, содержащих рактопамин. Подготовка обогащенных мясных стандартов для обнаружения рактопамина включало гомогенизацию образцов мяса, добавление в них известных концентраций стандартов рактопамина и выдерживание при температуре 4°C в течение 12 ч для обеспечения связывания стандарта с матрицей. Растворы стандартов рактопамина вносили в образцы мяса в таких объемах, чтобы получить пробы с содержанием рактопамина от 100 нг/г до 1,5 нг/г. После выдержки проб проводили экстракцию в соответствии с рекомендациями коммерческих тест-наборов.

Процедура пробоподготовки заключалась в экстракции 10 г мясного фарша с заданным содержанием рактопамина органическими растворителями (таблица 4). Эти варианты пробоподготовки основаны на методах экстракции коммерческих тест-систем Ridascreen Ractopamine ELISA ("R-Biopharm", Германия) и MaxSignal Ractopamine ELISA ("PerkinElmer", США), предназначенных для определения рактопамина в мясных продуктах.

Для определения эффективности методов экстракции образцы мяса были обогащены рактопамином на различных уровнях (от 100 нг/г до 1,5 нг/г) и проанализированы с помощью конкурентного ИФА (рисунок 4). Каждый образец оценивался не менее 5 раз для проверки воспроизводимости.

Установлено, что в конкурентном варианте ИФА на основе МКА и ПКА степень извлечения остатков рактопамина во всех модельных образцах мяса составила менее 100%. Однако показатели относительной оптической плотности модельных образцов мяса с содержанием рактопамина на уровне 1,5 нг/г составили 92,8-93,7%, что указывают на незначительное снижение чувствительности анализа до 3 нг/г. Согласно требованиям международной организации «Кодекс Алиментариус» максимально допустимый уровень детекции остатков рактопамина для мышечной ткани говядины составляет 10 нг/мл.

Стандартные кривые, построенные на показателях модельных образцов мяса, содержащих рактопамин и экстрагированные разными органическими растворителями (ацетонитрил и метанол), оказались идентичны. Таким образом, эффективность этапов и параметров пробоподготовки модельных образцов мяса, содержащих рактопамин позволила решить проблему матричных эффектов в конкурентном варианте ИФА на основе полученных МКА и ПКА.

ОБСУЖДЕНИЕ

В промышленном животноводстве нередко прибегают к использованию стимуляторов роста, так как они позволяют добиться значительного повышения эффективности производства продукции животного происхождения [1-7]. Использование стимуляторов роста (в т.ч. рактопамина) в качестве кормовой добавки для откорма животных в странах Евросоюза и Таможенного Союза запрещено и находится под строгим контролем ветеринарных служб в соответствии с Директивами ЕС и регламентами ТС [8,11].

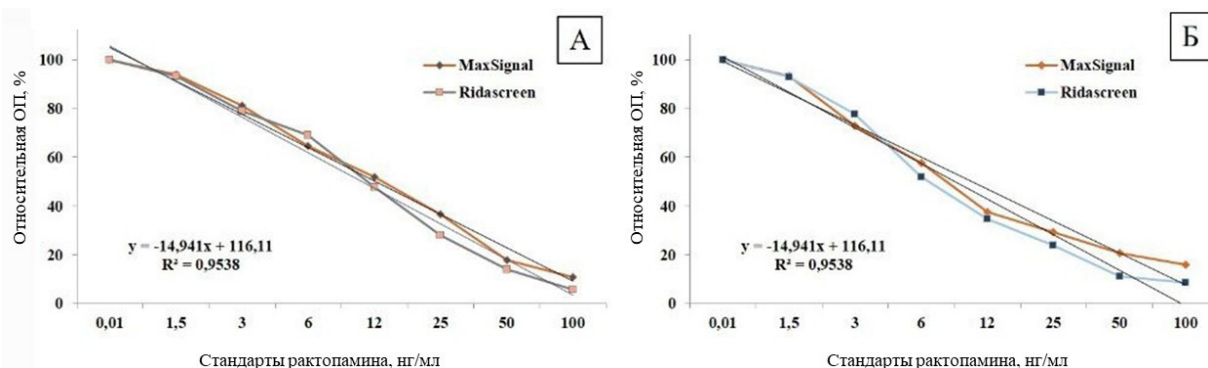


Рисунок 4. Калибровочные кривые модельных образцов мяса, обогащенных стандартными растворами рактопамина в конкурентном варианте ИФА на основе МКА (А) и ПКА (Б)

Для снижения риска для потребителя необходимо осуществление постоянного ветеринарного контроля за импортом мяса на наличие рактопамина, который позволит исключить его попадание с продуктами животноводства в организм человека. В этой связи нами проведены исследования по получению рактопамин-специфичных поликлональных и моноклональных антител как основных иммунореагентов для разработки метода обнаружения стимулятора роста - рактопамина в мясной продукции.

По своей химической природе рактопамин является гаптеном, т.е. имеет незначительную молекулярную массу и не обладает иммуногенными свойствами. Получение специфических антител (иммуноглобулинов) к гаптенам является трудновыполнимой задачей, поскольку гаптены самостоятельно не вызывают иммунного ответа [12-14]. В связи с неиммуногенностью рактопамина осуществлено получение конъюгированных препаратов рактопамина методами сшивания гаптена с высокомолекулярными носителями – бычьим сывороточным альбумином (БСА) и овальбумином (ОВА).

Для усиления иммуногенных свойств конъюгата важно число молекул гаптена, конъюгированных с носителем. Установлено, что слишком малое и слишком большое количество молекул гаптена, пришитых к носителю, ухудшает иммуногенные свойства. Для конъюгирования с БСА, наиболее оптимально вводить 10-20 молекул гаптена на молекулу носителя [12-14]. Используемые нами методы конъюгирования рактопамина основаны на образовании ковалентной пептидной связи между карбоксильной группой гаптена и аминокислотной группой носителя с применением наиболее распространенных сшивающих агентов – глутарового альдегида и карбодиимида. Строгое соответствие методическим условиям и параметрам использованных методов конъюгации рактопамина с высокомолекулярными носителями позволило успешно получить конъюгаты рактопамина. Эффективность конъюгирования рактопамина с БСА и/или ОВА подтверждена УФ-спектроскопией увеличением поглощения конъюгатов при длине волны 290 нм, а также непрямым ИФА с коммерческим моноклональным антителом, специфичным к рактопамину.

Первичное антитело является ключевым иммунореагентом, обеспечивающим специфичность детекции при иммуноферментном тестировании. Для получения специфических поликлональных антител (ПКА) против рактопамина проводили иммунизацию кроликов конъюгированным антигеном - рактопамин+БСА сроком 84 дня.

Оценка эффективности иммунизации лабораторных кроликов конъюгатом рактопамина с БСА обуславливает необходимость специфической детекции в сыворотках крови антител, направленных к антигенной детерминанте гаптена-рактопамина [12-14]. Уровень иммуногенности конъюгированных препаратов гаптена-рактопамина в сыворотках крови иммунизированных кроликов оказался достаточно высоким – $1:59733$, поскольку специфические антитела вырабатываются в большей степени на антигенные детерминанты высокомолекулярного носителя – БСА. Наличие рактопамин-специфичных антител в составе поликлональной сыворотки кроликов – $1:17066$ достоверно подтверждено использованием в качестве антигена конъюгата,

состоящий из рактопамина и другого (гетерологического) высокомолекулярного носителя - ОВА.

Методом гибридной технологии получены штаммы гибридных культивируемых клеток 8Е7 и 1А10, стабильно продуцирующие высокоспецифичные моноклональные антитела к рактопамину. Высокие показатели константы связывания МКА, продуцируемых штаммами гибридом 8Е7 и 1А10 – $4,5 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ и $1,2 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ соответственно – обусловили высокую степень сродства к рактопамину в титрах $1:256$ - $1:1024$ в культуральной жидкости и $1:102400$ - $1:409\,600$ в асцитной жидкости. Специфичность детекции рактопамина МКА штаммов-гибридом 8Е7 и 1А10 доказана отсутствием связывания с другими бета-адреностимуляторами (кленбутерол, сальбутамол) и антибиотиками (канамицин, гентамицин).

Минимальный предел детекции рактопамина в стандартных растворах МКА штамма гибридомы 8Е7 и кроличьих ПКА, определенная конкурентным ИФА, составила $1,5 \text{ нг/мл}$. Диагностическая значимость полученных нами МКА и ПКА определяется их высокой чувствительностью в сравнении с аналогичными препаратами антител к рактопамину [16-19]. Таким образом, МКА штамма гибридомы 8Е7 и кроличьи ПКА являются специфическими иммунореагентами для разработки метода обнаружения стимулятора роста в мясной продукции.

Химические соединения, присутствующие в образцах или экстрактах образцов, такие как белки, жиры и другие, могут неспецифически влиять на связывание антитела и аналитов, а также могут иметь высокий потенциальный риск неспецифического связывания. Эти так называемые «матричные эффекты» могут снизить чувствительность и надежность иммуноанализа [20,21]. В нашем исследовании матричные эффекты анализировались с помощью конкурентного ИФА на модельных образцах мяса, содержащих рактопамин. Для пробоподготовки были использованы известные методы экстракции коммерческих тест-систем Ridascreen и MaxSignal, предназначенных для определения рактопамина в мясных продуктах, на основе органических растворителей (ацетонитрила и метанола).

Совместимость стандартных кривых двух методов экстрагирования, построенные на показателях аналогичных модельных образцов мяса, содержащих рактопамин, определяют эффективность этапов и параметров пробоподготовки для решения проблемы матричных эффектов. Устранение матричных помех количественно оценивают путем сравнения стандартной кривой, построенной в буфере PBS, с калибровочной кривой, построенной в матрице образца, которая содержит аналит [13,14,20,21]. Достигнутое совпадение показателей стандартной и калибровочной кривых (буфер и матрица) на основе полученных нами МКА и ПКА подтверждает их диагностическую ценность в качестве основных иммунореагентов для детекции остатков рактопамина в мясной продукции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успешный синтез конъюгатов рактопамина с высокомолекулярными носителями обеспечил получение поликлональных и моноклональных антител с направленной специфичностью к рактопамину в непрямом ИФА.

Результаты определения аналитической чувствительности конкурентного ИФА (буфер и матрица) подтверждают возможность использования МКА или ПКА в качестве специфичных иммуореагентов для эффективного мониторинга остатков рактопamina в мясной продукции.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция, методология и научное руководство Е.С.; проведение экспериментов, интерпретация результатов исследования, статистический анализ К.Г., М.Ш., А.Ж., оформление, редактирование и рецензирование статьи - К.Г., М.Ш., А.Ж., Е.С.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан по научно-технической программе ИРН BR22885795 «Повышение уровня безопасности пищевых продуктов» в рамках проекта: «Получение рактопамин-специфичных антител и разработка метода обнаружения стимулятора роста в мясной продукции».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lean I.J., Thompson J.M., Dunshea F.R. A meta-analysis of zilpaterol and ractopamine effects on feedlot performance, carcass traits and shear strength of meat in cattle // *PLoS ONE*. – 2014. - Vol.9, No.12. e115904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115904>
2. Moreno L., Lanusse C. Specific veterinary drug residues of concern in meat production // In *New Aspects of Meat Quality. - Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*. – 2017. – P.605-627. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100593-4.00025-4>.
3. Ritter M.J., Johnson A.K., Benjamin M.E., Carr S.N., Ellis M., Faucitano L., Grandin T., Salak-Johnson J.L., Thomson D.U., Goldhawk C., Calvo-Lorenzo M.S. Effects of ractopamine hydrochloride on welfare indicators for market weight pigs // *Transl. Anim. Sci.* – 2017. – Vol.22.No.1. – P.533-558. <https://doi.org/10.2527/tas2017.0060>.
4. Trotta R.J., Carlin K.M., Swanson K.C. Effects of ractopamine hydrochloride supplementation on feeding behavior, growth performance, and carcass characteristics of finishing steers // *Transl. Anim. Sci.* – 2019. – Vol.34, No.3. – P.1143–1152, <https://doi.org/10.1093/tas/txz114>.
5. Abbas A., Raza R.D., Vasquez M.J.M., Roldan N., Malhotra J.C., Huang O.E.M., Buenafe K.H.C., Chen S.S., Liang C.D. Ractopamine at the center of decades-long scientific and legal disputes: a lesson on benefits, safety issues, and conflicts // *Biomolecules*. – 2022. – Vol.12, No.10. – P.1342. <https://doi.org/10.3390/biom12101342>
6. Dilger A.C. Johnson B.J., Brent P. and Ellis R.L. Comparison of beta-ligands used in cattle production: structures, safety, and biological effects // *Journal of Animal Science*. – 2021. – Vol. 99, No. 8 – P.1–16. <https://doi.org/10.1093/jas/skab094>

doi:10.1093/jas/skab094

7. Davis H.E., Geornaras I., Lindstrom V., Chaparro J.M., Nair M.N., Delmore R.J. Effects of differing withdrawal times from ractopamine hydrochloride on residue concentrations of beef muscle, adipose tissue, rendered tallow, and large intestine // *PLoS ONE*. – 2020. – Vol.15, No.12: e0242673. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242673>.
8. Nino A.M., Granja R.H., Wanschel A.C., Salerno A.G. The challenges of ractopamine use in meat production for export to European Union and Russia // *Food Control*. – 2017. – Vol.72, No.4. – P.289-292 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.015>
9. Chen, C., Guo, B., Hu, P., Lee, H., Hu, H., Hsu, M. Ractopamine at legal residue dosage accelerates atherosclerosis by inducing endothelial dysfunction and promoting macrophage foam cell formation // *Environ. Pollut.* – Vol.313. – e120080. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120080>
10. Codex. Codex Alimentarius-Maximum Residue Limit (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods // 2018 <https://static1.squarespace.com/static/5e0e1d15dcd662506441ff4b/t/60dbe31480d1ed178cc069fb/1625023259816/MRL2e.pdf>
11. Технический регламент Таможенного Союза (ТР ТС 021/2011) «О безопасности пищевой продукции» – URL: <https://adilet.zan.kz/rus/docs/H11T0000880> (дата обращения 28.04.2026).
12. Hermanson, G. Preparation of Hapten–Carrier Immunogen Conjugates // *Bioconjugate Techniques*. – 2013. – Second Edition. Academic Press. – P. 745-783. ISBN: 9780123822390
13. Han X., Liu C., Guo X. Controlling the amount of coupling agents on the synthesis of coating antigens to enhance the sensitivity of fluoroquinolone immunodetection // *Heliyon*. – 2023. – Vol. 9, No.6. e16821. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16821>
14. Preechakasedkit P., Ngamrojanavanich N., Khongchareonporn N., Chailapakul O. Novel ractopamine-protein carrier conjugation and its application to the lateral flow strip test for ractopamine detection in animal feed // *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. – 2019. – Vol.20, No.2. – P.193-204. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1800112>
15. Beatty J., Beatty P., Vlahos W. Measurement of monoclonal antibody affinity by non – competitive immunoassay // *J. Immunol. Meth.* – 1987. – Vol. 100, No.2 – P. 173-179. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(87\)90187-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(87)90187-6)
16. Li M., Chen Z., Zhu Q. Development and identification of monoclonal antibodies against ractopamine // *Hybridoma*. – 2017 – Vol. 26, No.3. – P. 148-154. <https://doi.org/10.1089/hyb.2006.045>
17. Chang X. Preparation and application of anti-ractopamine monoclonal antibodies. // *J. Food. Agric. Environ.* – 2014. – Vol. 12, No.1. – P. 298-301. <https://doi.org/10.1234/4.2014.4222>
18. Shelver W., Smith D., Berry M. Production and

characterization of a monoclonal antibody against the B-adrenergic agonist ractopamine // *J. Agric. Food Chem.* – 2019. – Vol. 48, No.9.– P. 4020-4026. <https://doi.org/10.1021/jf000528n>

19. Jinqing J., Haitang Z., Li R., Jinyou M., Ziliang W. Preparation of anti-ractopamine polyclonal antibody and the development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay // *Energy Procedia.* - 2011.- Vol.11,No.5.- P.2104-2109. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2011.10.512>

20. Zhang Y., Wang F., Fang L., Wang S., Fang G.

Rapid determination of ractopamine residues in edible animal products by enzyme-linked immunosorbent assay: development and investigation of matrix effects // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2009. – ID579175. <https://doi.org/10.1155/2009/579175>

21. Pleadin J., Persi N., Vulic A., Milic D., Vahcic N. Determination of residual ractopamine concentrations by enzyme immunoassay in treated pig's tissues on days after withdrawal // *Meat Sci.* – 2012. – Vol. 90, No.3. – P. 755-758. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.11.007>

ЕТ ӨНІМДЕРІНДЕГІ ӨСУ СТИМУЛЯТОРЫН АНЫҚТАУ ҮШІН РАКТОПАМИНГЕ ТЕЛІМДІ АНТИДЕНЕЛЕРДІ ӨНДІРУ

Каукабаева Г.К., Мухлис Ш.Е., Ахметкаримова Ж.С., Ескендинова С.З.*

Ұлттық биотехнология орталығы, Қорғалжын тас жолы 13/5, Астана, Қазақстан

Корреспондент автор: eskendirova@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Рактопамин - дамыған елдердегі өнеркәсіптік мал шаруашылығында жем қоспасы ретінде кеңінен қолданылатын стероидты емес өсу стимуляторы. Ол жемнің конверсиясын жақсартатын, майлық салмағың жиналуын төмендететін және бұлшықет салмағың артуына ықпал етеді. Дегенмен, жануарлар етінде жиналған рактопамин қалдықтары адам денсаулығына өте теріс әсер етеді. Осыған байланысты рактопаминді қолдануға Кеден одағы және Еуропалық одақ елдерінде тыйым салынған, бірақ Америка, Канададан, Мексикадан және Бразилиядан импортталатын мал шаруашылығы өнімдерінде кездесуі мүмкін.

Осы зерттеудің мақсаты - ет өнімдеріндегі өсу стимуляторларын анықтау әдісін әзірлеу үшін рактопаминге жоғары телімді антиденелер өндіру. Рактопаминнің жоғары молекулалық ақуыз тасымалдаушыларымен конъюгаттарын сәтті синтездеу нәтижесінде жанама иммуноферменттік талдау (ИФТ) арқылы рактопаминге бағытталған поликлоналды және моноклоналды антиденелер алынды. Бәсекеге қабілетті ИФТ аналитикалық сезімталдығын анықтау нәтижелері (буфер және матрица) ет өнімдеріндегі рактопамин қалдықтарын тиімді бақылау үшін МКА немесе ПКА телімді иммунорегенттер ретінде пайдалану мүмкіндігін растайды.

Түйінді сөздер: рактопамин, антиденелер, конъюгат, сезімталдық, буфер, матрица

PRODUCTION OF RACTOPAMINE-SPECIFIC ANTIBODIES FOR THE DETECTION OF GROWTH PROMOTER RESIDUES IN MEAT PRODUCTS

Kaukabayeva G.K., Mukhlis S.E., Akhmetkarimova Z.S., Eskendirova S.Z.*

National Center for Biotechnology, 13/5 Korgalzhyn Highway, Astana, Kazakhstan

Corresponding author: eskendirova@biocenter.kz

ABSTRACT

Ractopamine is a non-steroidal β -adrenergic growth promoter widely used as a feed additive in intensive livestock production in developed countries to improve feed conversion efficiency, reduce adipose tissue deposition, and enhance lean muscle growth. However, residual ractopamine accumulated in animal tissues may pose significant risks to human health. Consequently, the use of ractopamine is prohibited in member states of the Eurasian Economic Union and the European Union. Nevertheless, residues of this compound may be present in livestock products imported from United States, Canada, Mexico, and Brazil.

The aim of this study was to generate highly specific antibodies against ractopamine for the development of an immunoassay-based method for detecting ractopamine residues in meat products. Successful synthesis of ractopamine conjugates with high-molecular-weight protein carriers enabled the production of polyclonal and monoclonal antibodies exhibiting strong specificity toward ractopamine in indirect ELISA. The analytical sensitivity achieved in competitive ELISA using both buffer solutions and meat matrixes demonstrated that the obtained monoclonal and polyclonal antibodies can serve as highly specific immunoreagents for the effective monitoring of ractopamine residues in meat products.

Keywords: ractopamine, antibodies, conjugate, sensitivity, buffer, matrix