

МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА
УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р АСЕН ЗЛАТАРОВ“ – ГР.БУРГАС
КАТЕДРА „БИОТЕХНОЛОГИЯ“

МАРИНА ЯНЕВА ЯНЕВА

**Разработване на имуноанализи на базата на магнитни
наночастици за определяне концентрацията на
фосфороорганични пестициди в мляко**

АВТОРЕФЕРАТ

**На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна
степен „ДОКТОР“ по научна специалност:02.11.11. Технология на
биологично активни вещества**

БУРГАС, 2018

МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА
УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р АСЕН ЗЛАТАРОВ“ – ГР.БУРГАС
КАТЕДРА „БИОТЕХНОЛОГИЯ“

МАРИНА ЯНЕВА ЯНЕВА

**Разработване на имуноанализи на базата на магнитни
наночастици за определяне концентрацията на
фосфороорганични пестициди в мляко**

АВТОРЕФЕРАТ

**На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна
степен „ДОКТОР“ по научна специалност:02.11.11. Технология на
биологично активни вещества**

Научен ръководител:
Проф. Дтн Цонка Иванова Годжевъргова

БУРГАС, 2018

Дисертационният труд е обсъден на разширен катедрен съвет при катедра Биотехнология, Университет „Проф. д-р Асен Златаров” – гр. Бургас, на заседание, състояло се на 27.10.2017г. и е насочен за разкриване на процедура за защита пред жури, определено със заповед на Ректора на Университет „Проф. д-р Асен Златаров”.

Дисертационния труд съдържа 168 страници, 12 таблици и 41 фигури. В библиографията са включени 231 заглавия.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на от часа в зала, ОК, Университет „Проф. д-р Асен Златаров” – гр. Бургас.

Материалите за защитата са на разположение на интересуващите се в деловодството на Университет „Проф. д-р А. Златаров” – гр. Бургас

Автор: Марина Янева Янева

Заглавие: Разработване на имуноанализи на базата на магнитни наночастици за определяне концентрацията на фосфоорганични пестициди в мляко

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Ab-антитяло

AChE-ацетилхолинестераза

APTES- 3-аминопропил триетоксисилан

BSA - говежди серум албумин

cBSA- катйонизиран говежди серум албумин

cOVA- катйонизиран овалбумин

CV- коефициент на вариация

DDVP-дихлорвос

DMF- диметилформамид

DTNB- 5, 5'-дитиобис-2-нитробензоена киселина

EDC- 1-етил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимид

EDTA- етилендиаминтетраоцетна киселина

ELISA- ензимно-свързани имуносорбентни анализи

GC- газова хроматография

FITC- флуоресцеин изотиоцианат

FTIR-Инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация

HPLC- високоефективна течна хроматография

IC₅₀ концентрацията на антибиотика, осигуряваща 50% инхибиране и съответно 50% редуциране на първоначалния нормализиран сигнал

Ig-имуноглобулинов клас

IgG-имуноглобулин G

HSA-човешки серум албумин

KLH-хемоцианин

LOD- граница на откриване или чувствителност

mAbs- моноклонално антитяло

NHS- N-хидроксисукцинимид

OVA-овалбумин

pAbs- поликлонални антитела

PBS - фосфатен буфер

pI- изоелектрична точка

SD-стандартно отклонение

SEM- сканираща електронна микроскопия

TMB-3,3',5,5'-тетраметилбензидин

АОАС-Асоциация на официалните аналитични химици

BETX-високоэффективна течна хроматография

ГА-глутаров алдехид

ДДТ-дихлото-дифенил-трихлороетан

ЕС-Европейски съюз

МНЧ– магнитни наночастици

ОСФ-Оксидаза със смесена функция

ПАМ-повърхностно активни молекули

ПДК-Пределно допустима концентрация

ФИА- флуоресцентен имуноанализ

ФОС-фосфорорганични пестициди

ХОП-хлорорганични пестициди

ВЪВЕДЕНИЕ

Поради нарастващата необходимост от повишаване на качеството и безопасността на храните и опазване на околната среда е наложително разработването на модерни и бързи методи с висока чувствителност и селективност за количествено определяне на пестициди във водите и храните. В последните десетилетия органохлорните инсектициди (ДДТ, алдрин, линдан и др.) постепенно се изместват от органофосфорните инсектициди (паратион, малатион и др.), както и от инсектициди, производни на карбамиловата киселина (карбарил, алдикарб и др.), които сравнително лесно се разграждат в околната среда, но и крият сериозен риск заради високата си токсичност. По същество те са инхибитори на холинестеразните ензими, които участват в съкращаването на мускулните влакна и в пренасянето на импулсите в нервната система.

Основно в практиката анализа на пестициди се осъществява чрез течна, газова и вискоефективна течна хроматография (LC, GC и HPLC) и ензимни биосензори. Тези методи са много подходящи за мониторинг на токсичните пестициди, но имат редица недостатъци: скъпи са, отнемат много време, изискват добре обучен персонал и не са адаптирани за провеждане на анализа на място и в реално време.

За да се избегнат забавянията в пунктовете за прием на мляко, е необходимо да се развият бързи, евтини и чувствителни методи за анализ. Такива са имунофлуоресцентните методи, при които реакцията между антиген (изследваните пестициди) и съответното специфично антитяло е много селективна и бърза. Тъй като пестицидите са молекули с малки размери, те не могат да бъдат открити чрез сандвичев имуноанализ. Вместо това, трябва да бъде използван конкурентния метод, при който антигенът от пробата се конкурира с белязания пестицид за свързване с антитялото. Хетерогенният флуоресцентен имуноанализ (ФИА) се предпочита пред хомогенния, тъй като осигурява по-стабилни тестове, благодарение на имобилизацията на антителата към твърди носители. За увеличаването на качеството на теста е важно използването на подходящи методи за имобилизация на антителата върху подходящи носители. Прилагането на наночастици увеличава степента на имобилизация на антитялото и подобрява чувствителността на имуноанализа. Особено подходящи за тази цел са магнитните наночастици (МНЧ), тъй като благодарение на приложената магнитна сепарация се ускорява и улеснява провеждането на.

В дисертационния труд е създаден високочувствителен имунофлуоресцентен анализ за индивидуално и едновременно определяне на ниски концентрации на пестицидите дихлорвос и параоксон, в мляко на базата на имобилизирани антителата върху МНЧ и флуоресцентни конюгати.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е разработване на хетерогенен имунофлуоресцентен анализ базиран на магнитни наночастици за индивидуално и едновременно определяне на дихлорвос и параоксон в мляко.

За постигане на целта са поставени следните задачи:

1. Получаване и функционализиране на магнитни наночастици.
2. Получаване, пречистване и доказване на имуногените DDVP-cBSA, параоксон-BSA.
3. Производство и характеристика на поликлонални антитела чрез имунизация с индивидуални и смесени имуногени.
4. Разработване на индиректна конкурентна ELISA за индивидуално и едновременно определяне концентрацията на дихлорвос и параоксон в мляко.
5. Разработване на флуоресцентен имуноанализ на базата на МНЧ за индивидуално и едновременно определяне концентрацията на дихлорвос и параоксон в мляко.
 - 5.1. Имобилизация на поликлонални антитела анти-дихлорвос и анти-параоксон върху магнитни наночастици и определяне на оптималните условия за имобилизация.
 - 5.2. Получаване на флуоресцентни конюгати DDVP-cBSA-FITC; BSA-FITC и BSA-ATTO 620.
 - 5.3. Определяне на оптималните условия за провеждане на флуоресцентните имуноанализи за индивидуално и едновременно определяне концентрацията на дихлорвос и параоксон в мляко.
 - 5.4. Построяване на калибрационни криви за дихлорвос и параоксон и определяне на основните характеристики на имуноанализите.
 - 5.5. Проследяване влиянието на вида на млякото върху имуноанализа.
6. Разработване на флуоресцентен имуноанализ на базата на МНЧ за едновременно определяне концентрацията на дихлорвос и параоксон в мляко чрез мулти-поликлонално антитяло.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Получаване на поликлонални антитела срещу DDVP и параоксон

1.1. Получаване и пречистване на конюгата DDVP-cBSA и определяне съотношението на свързване на дихлорвоса към протеин.

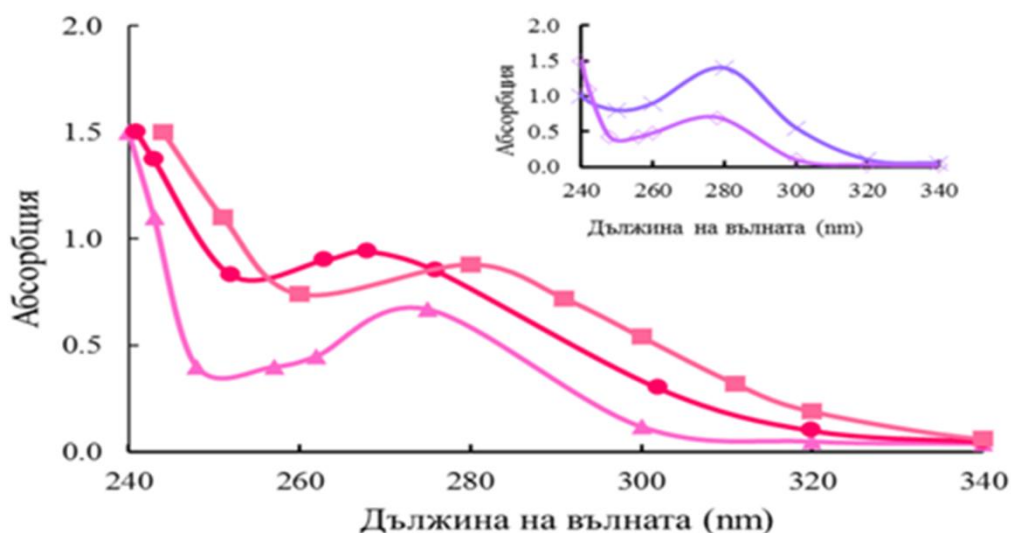
Един от най-важните компоненти за разработването на имуноанализ е антитялото. За да бъде получено поликлонално антитяло е необходимо първо да се синтезира имуногена. За получаване на поликлонално антитяло срещу дихлорвос и параоксон, не е възможно като имуногени да се приложат директно дихлорвос и параоксон, тъй като те са с малка молекулна маса и имат малка имуногенна активност. Необходимо е те да се свържат с биосъвместима по-голяма молекула като албумин и така имуногенната активност се засилва. В молекулата на дихлорвоса няма реактивни групи, като карбокси, амидо или меркапто, които да взаимодействат с протеини по обичайните свързващи методи. Затова е необходимо първо да се синтезира катионизиран протеин, който може да реагира с дихлорвос и да образува конюгат. Катионизиращият говежди серумен албумин (cBSA), се получава чрез модифициране на нативен говежди серумен албумин с етилендиамин, като всички отрицателно заредени карбоксилни групи на албумина се покриват с положително заредени първични amino групи. Резултатът е силно положително зареден протеин ($pI > 11$), което значително повишава имуногенността му в сравнение с нативния говежди серумен албумин. В допълнение, увеличеният брой първични amino групи към албумина дава възможност по-голям брой антигенни молекули да се включат в конюгата cBSA-антиген. Приготвянето на катионизиран протеин се провежда съгласно метода на Muckerheide (1987). BSA се обработва последователно съответно с 1-етил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимид хидро-хлорид и етилендиамин.

Конюгатът DDVP-cBSA се получава чрез кондензация на етилендиаминовата група в катионизиращия протеин с формалдехид и α -водородния атом съседен на карбонилова група в дихлорвоса, чрез модифициращия метод на Mannich (Feng и колектив, 2009). След получаването на хаптен-протеин конюгата, следва етап на пречистване от нереагиралите молекули на хаптена, от соли и други примеси, които ще се отразят на качеството на антитялото. Пречистването на конюгата DDVP-cBSA се провежда върху гелна хроматография (Sephadex G-25) и елуент 10 mM PBS, pH 7.4. След пречистването, е необходимо да се извърши процедура по идентификация на конюгата, за да се потвърди дали хаптена

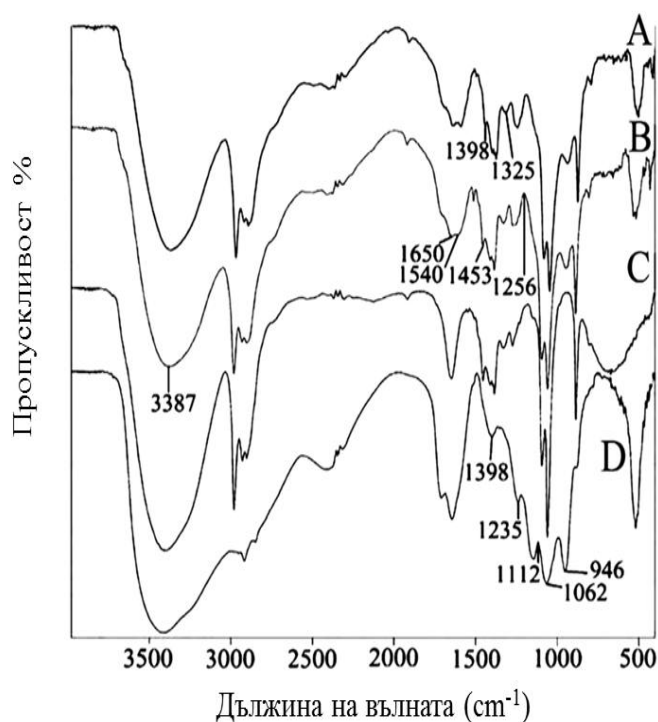
успешно се е свързал с носителю и колко хаптен молекули са свързани към една молекула носител.

Свързването на дихлорвоса с катионизирувания протеин е доказано чрез ултравиолетов спектrophотометричен метод. Ултравиолетовите абсорбционни спектри на cBSA и конюгата DDVP-cBSA са показани на Фигура 1 и са сравнени с ултравиолетовите абсорбционни спектри на BSA и DDVP. Абсорбционният максимум в спектъра на cBSA, характерен за протеините е леко изместен от 280 на 275 nm в сравнение със същия на BSA (Фигура 1, вътре). Получените резултати са идентични с резултатите представени от други автори (Zhou и колектив, 2007; Feng и колектив, 2009; Feng и колектив, 2010). Установено е леко изместване на абсорбционния максимум в спектъра на DDVP-cBSA в сравнение с максимума на cBSA (Фигура 1) от 275 до 270 nm, което се дължи на взаимодействието на cBSA с DDVP и това убедително доказва образуването на конюгата DDVP-cBSA.

Свързването на DDVP с cBSA се доказва също чрез инфрачервен спектроскопски метод с Фурие трансформация. Инфрачервените спектри на конюгата на DDVP-cBSA, cBSA, BSA и DDVP са показани на Фигура 2. Спектърът на BSA на фигура 2, Б показва ивици при 1650 cm^{-1} за амид I група, при 1540 cm^{-1} за амид II групата, при 1256 cm^{-1} за амид III групата, при 3387 cm^{-1} за N-H групата и при 1453 cm^{-1} за COO- група. cBSA има почти същия инфрачервен спектър като BSA (Фигура 2 А). Инфрачервеният спектър на конюгата дихлорвос-катионизиран албумин убедително доказва формирането на конюгата, тъй като има характерните ивици за катионизирувания албумин в областта $1235 - 1139\text{ cm}^{-1}$ и на дихлорвоса в областта на $1062 - 946\text{ cm}^{-1}$, дължащи се на P=O and P-O-C.



Фигура. 1. UV-видими спектри на катионизиран албумин (▲), конюгат на дихлорвос-катионизиран албумин (●), дихлорвос (■); вътре: албумин (x) и катионизиран албумин (◇). (Отговаря на фигура 17 в дисертацията)



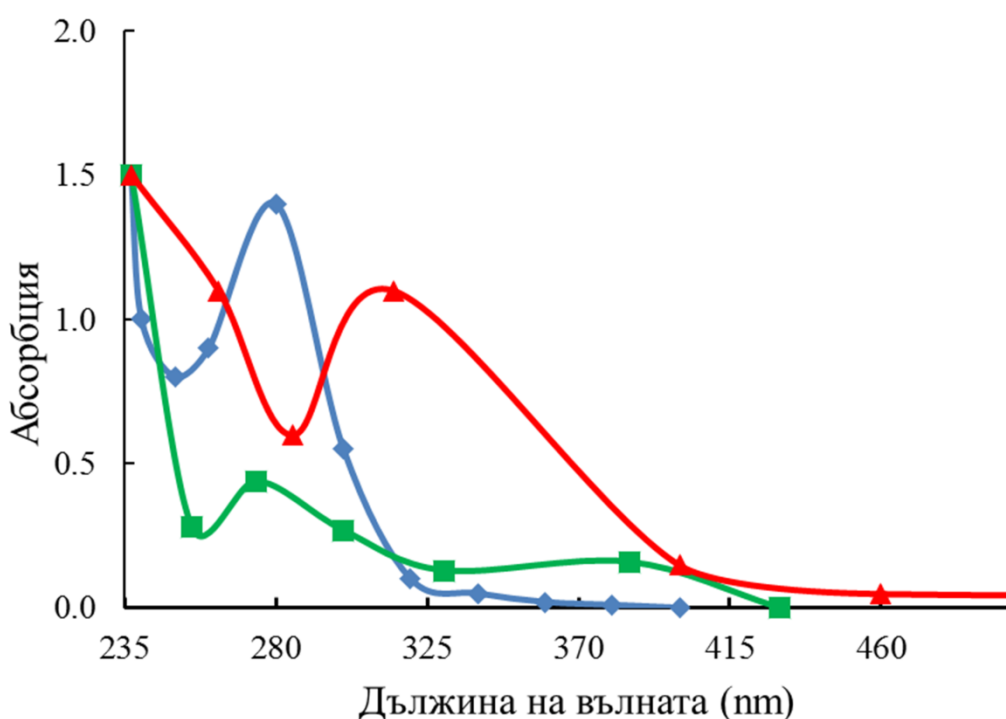
Фигура 2. Инфрочервени спектри на катионизиран албумин (А), албумин (В), дихлорвос (С), конюгат на дихлорвос-катионизиран албумин (D). (Отговаря на фигура 18 в дисертацията)

1.2. Получаване и пречистване на конюгата параоксон-BSA и определяне съотношението на свързване на параоксон към протеин.

Фосфоорганичните пестициди имат еднаква тиофосфатна група и се различават само по структурата на ароматните пръстени. В молекулата на параоксон няма реактивна група, която да може да реагира с протеини чрез обичайните методи на свързване. В структурата на параоксона в ароматните пръстени има нитро група. В този случай, бе използван различен механизъм за получаване на конюгат (без катионизиран говежди серумен албумин), тъй като нитро групата на параоксон лесно се редуцира с цинков прах до amino група в кисела среда (Liang и колектив, 2008). След това amino групата се свързва с първата алдехидна група на глутаровия алдехид. Формира се шифова база между amino групата от параоксона и алдехидната група на глутаровия алдехид в основна среда, рН 8.0. Втората алдехидна група на глутаровия алдехид се свързва с amino група на говеждия серумен албумин (Liang и колектив, 2008). BSA е популярен протеинов носител за антигени с малка молекулна маса. Той съдържа 59 лизинови остатъка, като от 30 до 35 имат първични amino групи, които са способни да взаимодействат с конюгиращ реагент.

Реакцията на омрежване с глутаровия алдехид е много ефективна и по този начин става свързването на по-голям брой параоксонови молекули към една молекула от BSA. Пречистването на конюгата параоксон-BSA се провежда през колона с Sephadex G-25 и елуент 10 mM PBS, pH 7.4. Конюгатите се съхраняват при -20°C .

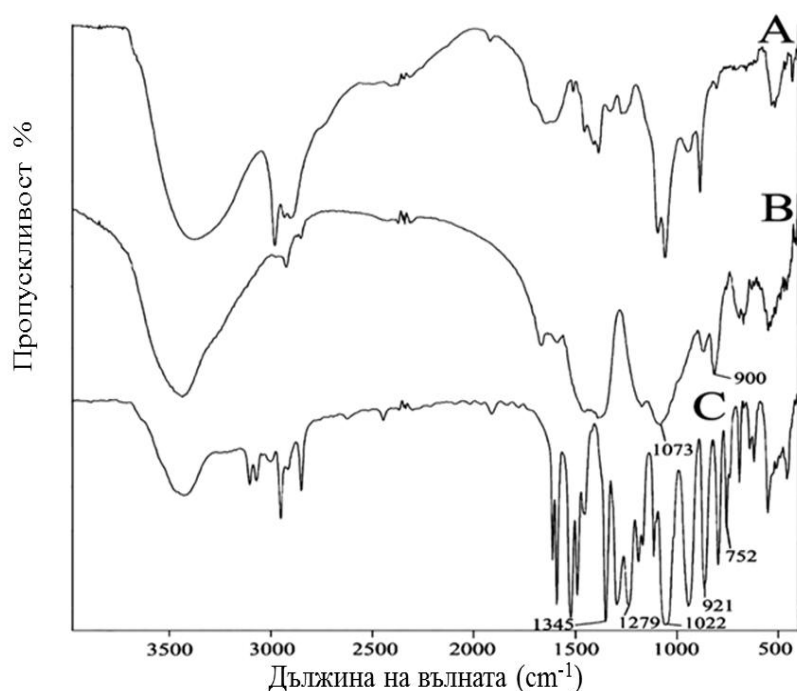
Полученият конюгат е доказан чрез използването на ултравиолетов спектрофотометричен метод. На фигура 3 са представени ултравиолетовите спектри на BSA, параоксон и параоксон-BSA.



Фигура 3. УВ-видими спектри на албумин (◆), параоксон (▲) и конюгат на параоксон-албумин (■). (Отговаря на фигура 19 в дисертацията)

От получените резултати става ясно, че BSA има абсорбционен максимум при дължина на вълната 278 nm, докато параоксона абсорбира при 315 nm. Полученият конюгат параоксон-BSA, има два абсорбционни максимума, които съответстват на пиковете на албумина и параоксона, но са изместени. Първият пик е изместен от 280 на 275 nm вследствие на реакцията на параоксон с говежди серумен албумин. Вторият пик е изместен от 315 nm на 385 nm, отново поради същото взаимодействие.

На Фигура 4 са представени инфрачервените спектри на BSA, параоксон и конюгата параоксон-BSA. Инфрачервеният спектър на BSA се характеризира със същите ивици както на фигура 2.



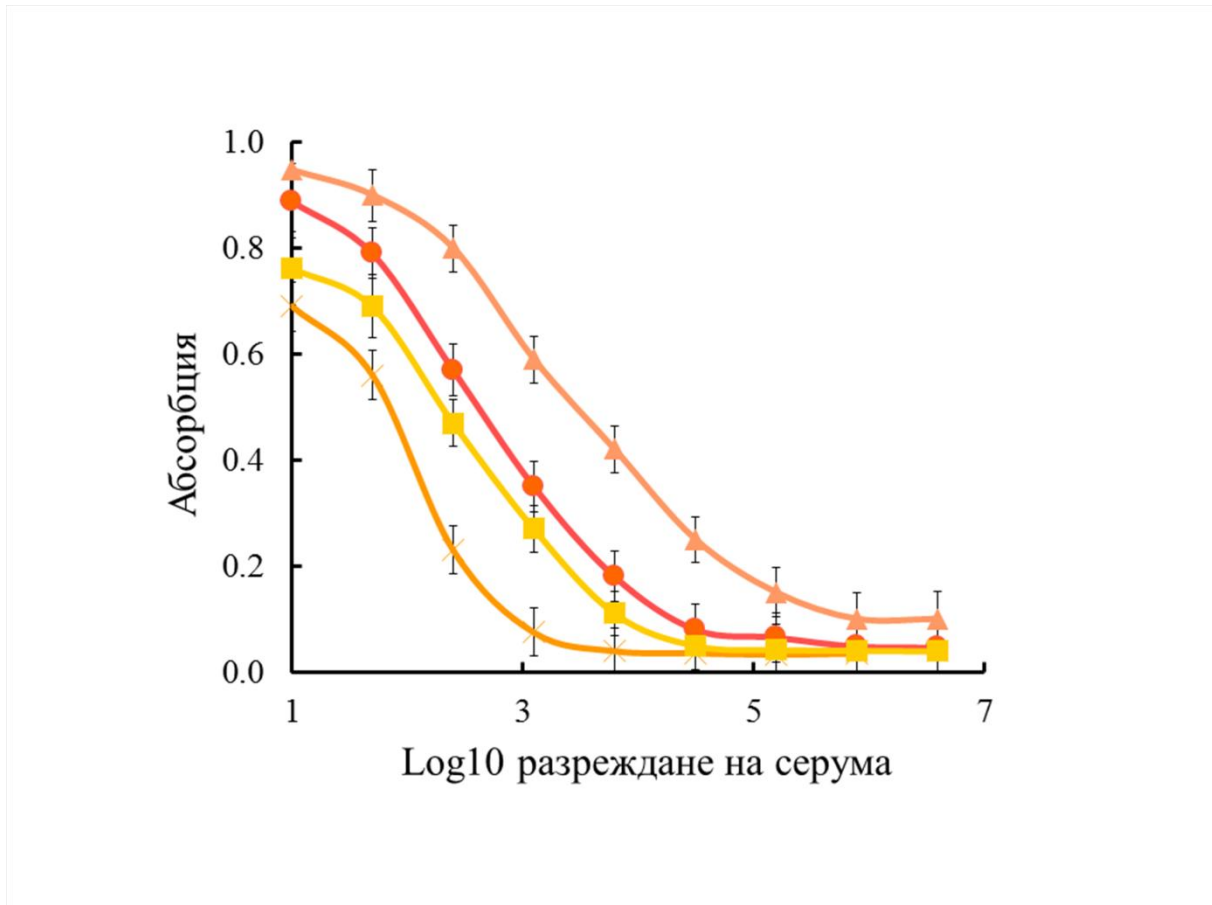
Фигура 4. Инфрачервени спектри на албумин (А),параоксон-албумин (В),параоксон (С). (Отговаря на фигура 20 в дисертацията)

Инфрачервеният спектър на параоксона се характеризира с изявиени ивици при 1022 и 921 cm^{-1} поради $\nu\text{O-C-C}$ разтягане на $\text{PO-C}_2\text{H}_5$. Абсорбционите ивици при 1345 cm^{-1} и 1279 cm^{-1} съответстват на симетрично разтягане на арил- NO_2 и симетрично разтягане на NO_2 групите, съответно. Абсорбционите ивици при 752 cm^{-1} в спектъра на параоксона характеризират вибрациите на ароматния пръстен, които се появяват в спектъра на параоксон-BSA. Инфрачервеният спектър на конюгата параоксон-BSA показва леко изместване на $(\text{PO-C}_2\text{H}_5)$ ивиците при $1073\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ което се дължи на взаимодействието между параоксона и BSA.

1.3 Получаване на поликлонални антитела срещу дихлорвос и параоксон

Получените имуногени - конюгатите DDVP-cBSA и параоксон-BSA се използват за производство на антитела срещу DDVP и параоксон. В същото време смес от DDVP-cBSA и параоксон-BSA (1:1) се използва за имунизация на овце за производство на мулти-антитяло (анти-DDVP и анти-параоксон). Имунизацията се провежда през две седмици. Следят се непрекъснато антисерумните титри. Установено е, че те се повишават до 13-та седмица след първата инжекция и след това не се променят. Определен е титър на антисерумите взети след 105 дни третиране чрез използването на индиректна ELISA и резултатите са представени на

фигура 5. На таблица 1 са представени титрите на антисерумите след 84 и 105 дни третирането. Установено е, че след 84 дни антисерумните титри са ниски ($1 \times 10^2 - 1 \times 10^4$), но след 105 дни титрите се увеличават в интервала $3.1 \times 10^3 - 5.2 \times 10^5$ (Таблица 1). Получените антитела се изолират и пречистват от антисерумите чрез афинитетна и йонообменна хроматография. Експерименталната грешка във всички експерименти е от 4.0 до 7.0% ($n = 6$).



Фигура 5. Криви на титруване на анти-параоксон антитяло (■), анти-дихлорвос антитяло (▲), мулти-антитяло (имунореакция с конюгат параоксон-протеин), (x) и мулти-антитяло (имунореакция с конюгат дихлорвос-протеин), (●). (Отговаря на фигура 21 в дисертацията)

Резултатите от фигура 5 и в таблица 1 показват, че антителата получени срещу DDVP и параоксон и мулти-антитялото, получено чрез инжектиране на смес от DDVP-cBSA и параоксон-BSA в съотношение 1:1 имат добра активност. Това показва, че използваните имунизационни и пречистващи методи са успешни.

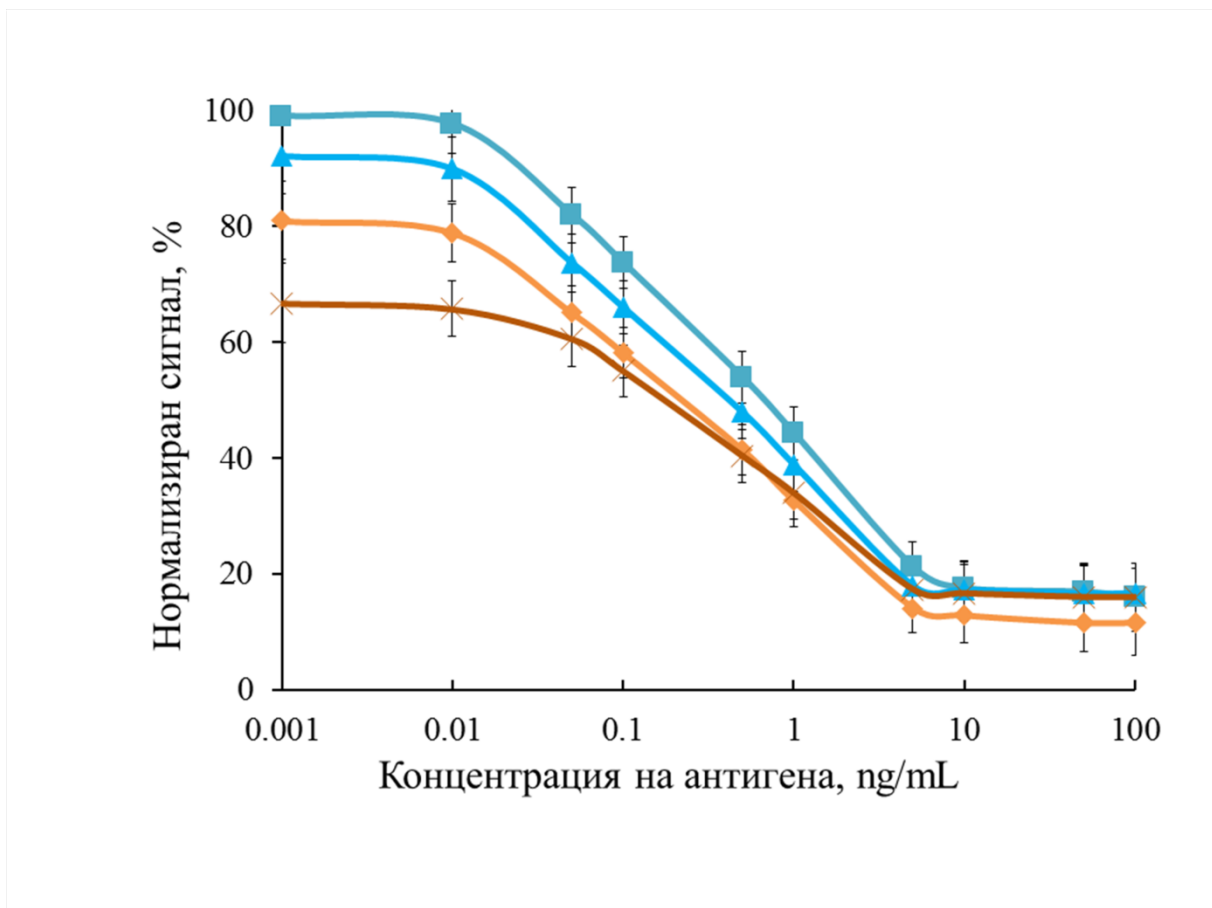
Таблица 1. Имунен отговор на антителата спрямо конюгатите дихлорвос-протеин и параоксон-протеин. (Отговаря на таблица 2 в дисертацията)

Антитяло	Конюгат	Титър (85 дни)	Титър (105 дни)
Анти-DDVP антитяло	DDVP-сBSA	1:1.10 ⁴	1:5.2x10 ⁵
Анти-параоксон антитяло	Параоксон-BSA	1:1.10 ³	1:4.5x10 ⁴
Мулти-антитяло	DDVP-сBSA	1:1.10 ³	1:4.5x10 ⁴
Мулти-антитяло	Параоксон-BSA	1:1.10 ²	1:3.1x10 ³

2. Разработване на индиректна конкурентна ELISA за определяне концентрацията на дихлорвос и параоксон

Разработен е ELISA за индиректно индивидуално и едновременно определяне концентрацията на дихлорвос и параоксон на базата на получените поликлонални антитела. Получен е и конкурентен конюгат хаптен-OVA за да се осъществи конкурентен имуноанализ. Този конюгат се използва като конкурентен агент и е различен от имуногена хаптен-BSA. Хетероложният конкурентен конюгат хаптен-OVA се предпочита пред хомоложния хаптен-BSA, тъй като се получават по-чувствителни имуноанализи. Конкурентният конюгат хаптен-OVA се приготвя в следното съотношение на свързване— дихлорвос:cOVA=6:1 и параоксон:OVA=5:1. Известно е, че по-чувствителен имуноанализ се получава при ниско съотношение на свързване на конкурентния конюгат (Singh et al., 2004). ELISA протича на базата на свързване на конкурентния конюгат към полистироловите ямки. След това се добавят разтвори на антитяло и антиген. Част от активните центрове на антителата се свързват с антигена от пробата, но свободните антитела се свързват с адсорбирания

конкурентен конюгат. След промиване на ямките с измиващ буфер, се добавя вторично антитяло свързано с пероксидаза. Вторичното антитяло се свързва към първичното антитяло предварително свързано към конкурентния конюгат. Накрая се добавя субстрат на ензима пероксидаза и се измерва сигнала във видимата област. Полученият аналитичен сигнал е обратно пропорционален на концентрацията на антигена в пробата. На този принцип е осъществен ELISA и са получени четири типични калибрационни криви, показани на Фигура 6. Първата крива е с анти-дихлорвос, втората е с анти-параоксон, третата с мулти-антитяло, а четвъртата - със смес от анти-дихлорвос и анти-параоксон (1:1).



Фигура 6. Криви на калибриране на индиректен конкурентен ELISA за определяне на дихлорвос (■), параоксон (◆), дихлорвос + параоксон с мулти-антитяло (▲), дихлорвос + параоксон със смес от анти-дихлорвос и анти-параоксон антитела (1:1), (x). (Отговаря на фигура 22 в дисертацията)

Определени са оптималните концентрации на антитялото (50 $\mu\text{g/mL}$) и конюгата хаптен-OVA (5 $\mu\text{g/mL}$) за провеждане на индиректен конкурентен ELISA чрез шахматно титруване. Броят на анализите с всяка концентрация е шест. Експерименталната грешка при всички

експерименти е от 4.0 до 7.0%. Границата на откриване и линейният диапазон за определяне на дихлорвос и параоксон с посочените по-горе антитела са дадени в Таблица 2. В съответствие с правилата на IUPAC (Inczedy и колектив, 1998) границата на откриване се изчислява като най-ниската концентрация на анализираният вещество даваща статистически различен отговор от този, наблюдаван в отсъствие на аналит и се изчислява като 95 % от B0 (флуоресцентния сигнал измерен в изходния разтвор на белязания антиген) (Simersky и колектив, 2007). Концентрациите на изследваните пестициди, при която се инхибира антитялото с 50% (IC₅₀), се определя от калибрационните криви (Фигура 6) и са представени в Таблица 2. Очевидно е, че характеристиките на първите три анализа са с близка чувствителност и по-големи линейни диапазони на измервани концентрации. Само последната ELISA крива получена със смес от анти-дихлорвос и анти-параоксон антитела има малък линеен концентрационен диапазон и висока граница на откриване. Много интересно е, че едновременният анализ на дихлорвос и параоксон в една и съща проба, получен чрез мулти-антитяло, показва по-добри аналитични характеристики, отколкото мултианализа, получен от смес на отделни антитела (1:1). Причината за това е по-високата активност на мулти-антитялото, отколкото тази на сместа от индивидуални анти-дихлорвос и анти-параоксон антитела. Доказателство за това твърдение е определената по-ниската IC₅₀ стойност при използването на мулти-антитяло в сравнение с IC₅₀ стойността при смес от анти-дихлорвос и анти-параоксон антитела (Таблица 2).

Таблица 2. Основни аналитични характеристики на индиректен конкурентен ELISA за определяне концентрацията на дихлорвос и параоксон в дестилирана вода. (Отговаря на таблица 3 в дисертацията).

№	Антиген	IC ₅₀ , ng/mL	Линеен диапазон, ng/mL	Граница на откриване, ng/mL	Коефициент на вариация, %
1	Дихлорвос	0.5	0.01-5	0.006	5.9
2	Параоксон	0.7	0.01-5	0.008	6.2
3	* Дихлорвос + Параоксон (1:1)	0.6	0.01-5	0.009	6.7
4	** Дихлорвос + Параоксон (1:1)	1.0	0.05-5	0.03	7.0

* с мулти-антитяло; ** смес от анти-дихлорвос и анти-параоксон антитела

Получените резултати от имуноанализа на параоксон и дихлорвос са сравнени с резултатите, получени чрез аналогичен ELISA от други автори (Таблица 3). Очевидно е, че полученият имуноанализ за параоксон и дихлорвос показва по-висока чувствителност в сравнение с резултатите на тези автори и освен това линейният измервателен диапазон е изместен към по-ниски концентрации на пестициди.

Таблица 3. Сравнение на аналитичните характеристики на разработения ELISA метод за дихлорвос и параоксон с аналогични резултати получени от други автори (Отговаря на таблица 5 в дисертацията).

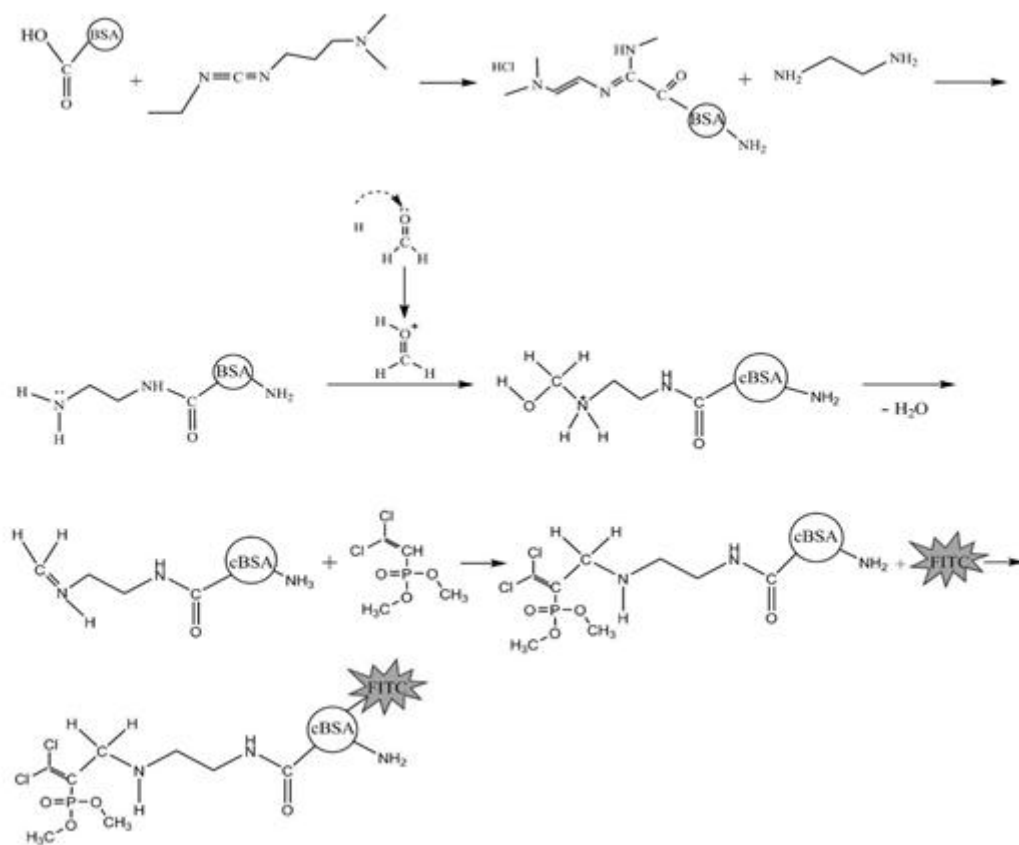
Пестицид	Линеен интервал , ng/mL	Граница на откриване, ng/mL	Други автори
Дихлорвос	100-10,000	48.0	Tang et al., 2008
Дихлорвос	0.1-1,000	1.0	Feng et al., 2010
Дихлорвос	0.01-5	0.06	Yaneva et al., 2017 Наша публикация
Параоксон	0.01-5	0.08	Yaneva et al., 2017 Наша публикация
Параоксон	100-20,000	10.0	Limei et al., 2008
Параоксон	12-1,158	5.0	Li et al., 2009

3. Разработване на имуофлуоресцентен анализна базата на магнитни наночастици за определяне концентрацията на дихлорвос и параоксон

3.1 Получаване, пречистване и доказване на конюгата DDVP-cBSA-FITC

Конкуретният флуоресцентен конюгат е приготвен чрез три последователни стъпки. В този случай като маркер се използва флуоресцентно багрило флуоресцеин (FITC). Първият и вторият етап са приготвяне на катионизиран говежди серумен албумин (cBSA) и свързване на cBSA с DDVP чрез кондензация с формалдехид. Третият етап е получаване на DDVP-cBSA-FITC конюгат чрез свързване на DDVP-cBSA с FITC (Фигура 7). Дихлорвосът няма функционална група, която да реагира с протеини чрез обичайните методи за свързване. Необходимо е да се синтезира катионизиран протеин за свързване на дихлорвос-протеин.

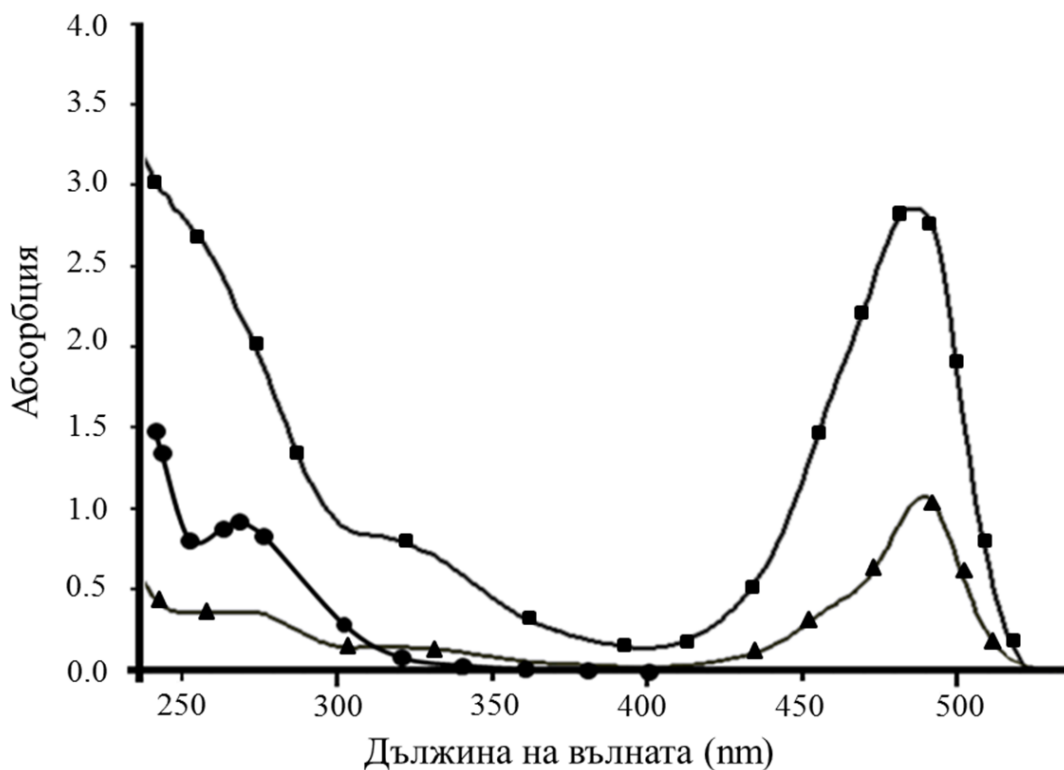
Приготвянето на катионизиращия протеин се извършва съгласно метода на Muckerheide et al. (1987). Говежди серумният албумин се третира с 1-етил-3-[3-диметиламинопропил] карбодиимид хидрохлорид и етилендиамин, вследствие на това. Конюгатът на дихлорвос-сBSA се **получава** чрез кондензиране с формалдехид, като се използва модифициран метод (Feng et al., 2009). В третия етап, полученият DDVP-сBSA е белязан с флуоресцентно багрило (FITC) и се оформя DDVP-сBSA-FITC конюгата. Изотиоцианатните групи на FITC се свързват с аминогрупи на DDVP-сBSA конюгата. Пречистването на DDVP-сBSA-FITC конюгата се извършва чрез гел хроматография при същите условия описани в предишните етапи на пречистване на конюгатите. Оптималното съотношение на флуоресцентното багрило към протеина (стойности на F / P) е 5.5 за изследвания конюгат. UV-Vis спектъра на DDVP-сBSA-FITC конюгата е измерен и сравнен с UV-Vis спектрите на DDVP-сBSA и FITC, за доказване на конюгирането. Резултатите са показани на фигура 8.



Фигура 7. Реакционна схема за получаване на дихлорвос-катионизиран говежди серумен албумин-FITC конюгат. (Отговаря на фигура 23 в дисертацията).

От фигурата се вижда, че в спектъра на DDVP-сBSA има абсорбционен максимум при дължина на вълната 270 nm, докато в спектъра на FITC

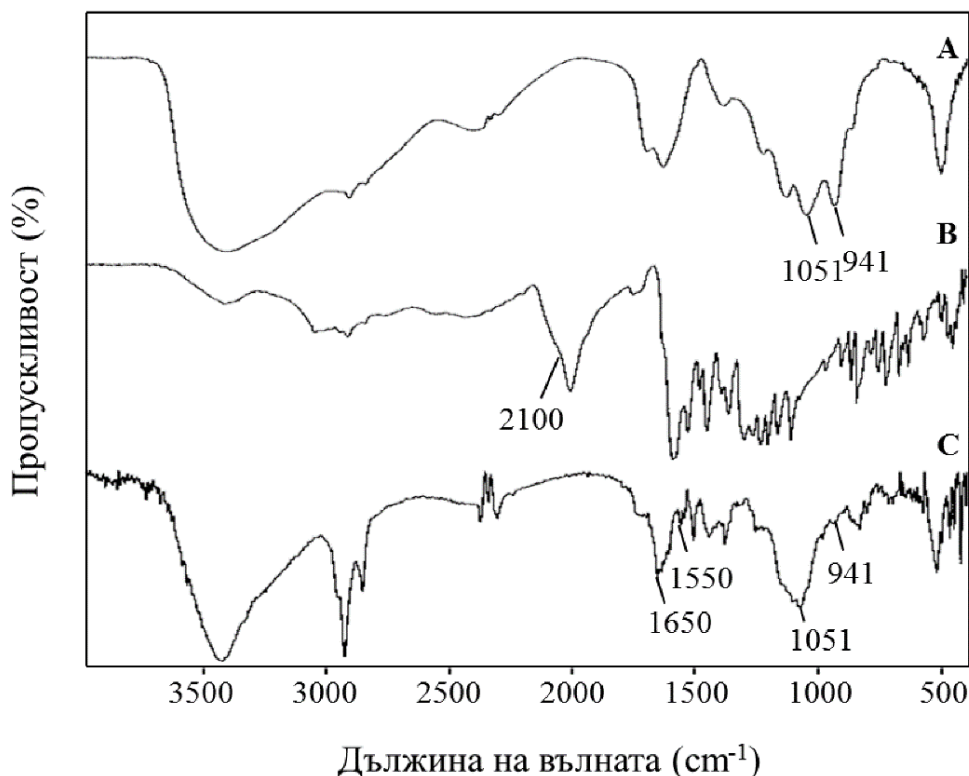
максимума е при 490 nm. UV-Vis спектъра на конюгата дихлорвос-катионизиран говежди серумен албумин-FITC (Фигура 8) показва наличие на силно поглъщане в областта 240-280 nm и 487 nm. Забелязва се изместване на абсорбционния максимум характерен за неконюгирания FITC от 490 до 487 nm, поради взаимодействието на дихлорвос-катионизирания говежди серумен албумин и FITC.



**Фигура 8. UV-Vis спектри на DDVP-cBSA (●), FITC (▲) и DDVP-cBSA-FITC (■).
(Отговаря на фигура 24 в дисертацията)**

Образуването на DDVP-cBSA-FITC конюгата се доказва и чрез IR анализ. Инфрачервените спектри на конюгата DDVP-cBSA-FITC, DDVP-cBSA и FITC са показани на фигура 9. Отсъствието на характерна ивица в диапазона $600-800\text{ cm}^{-1}$ за хлорния атом на дихлорвос в трите спектра доказва осъщественото свързване между дихлорвос и cBSA. Представените характерни ивици за групите amid I и amid II в BSA при 1650 и 1550 cm^{-1} в DDVP-cBSA-FITC спектъра доказват връзката между DDVP и cBSA. Характерният пик на FITC е при 2100 cm^{-1} , съответстващ на $\text{Ar-N}=\text{C}=\text{S}$. Отсъствието на тази ивица в DDVP-cBSA-FITC спектъра показва, че изотиоцианатната група (-NCS) на FITC реагира с първични аминогрупи на BSA и образува тиоамидна група. Инфрачервеният спектър на DDVP-cBSA показва наличие на ивици за $\text{PO-C}_2\text{H}_5$ при 1051 и 941 cm^{-1} , характерни за DDVP. Инфрачервеният спектър на DDVP-cBSA-FITC има

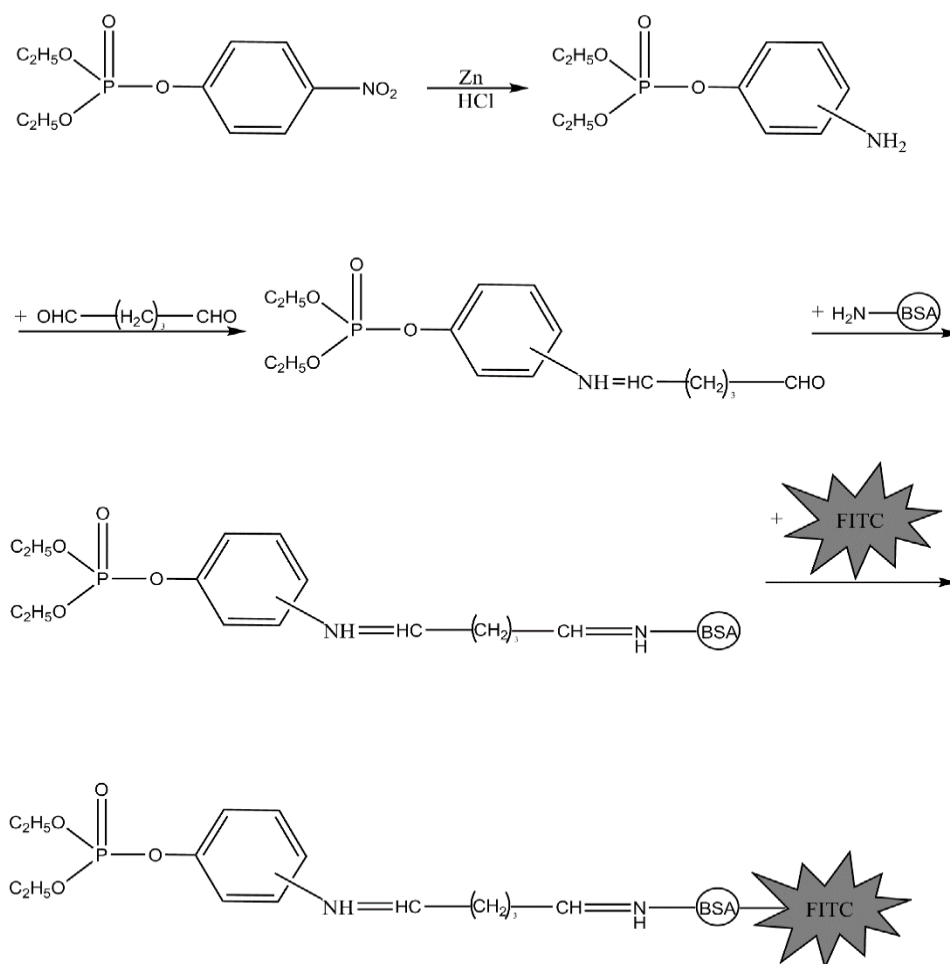
ивица при 1051 cm^{-1} - ν (P-O C), но втората ивица отсъства, вероятно поради наличие на конформационна промяна.



Фигура 9. Инфрачервени спектри на DDVP-cBSA конюгат (A), FITC (B) и DDVP-cBSA-FITC конюгат (C). (Отговаря на фигура 25 в дисертацията)

3.2 Получаване, пречистване и доказване на конюгата параоксон-BSA-FITC

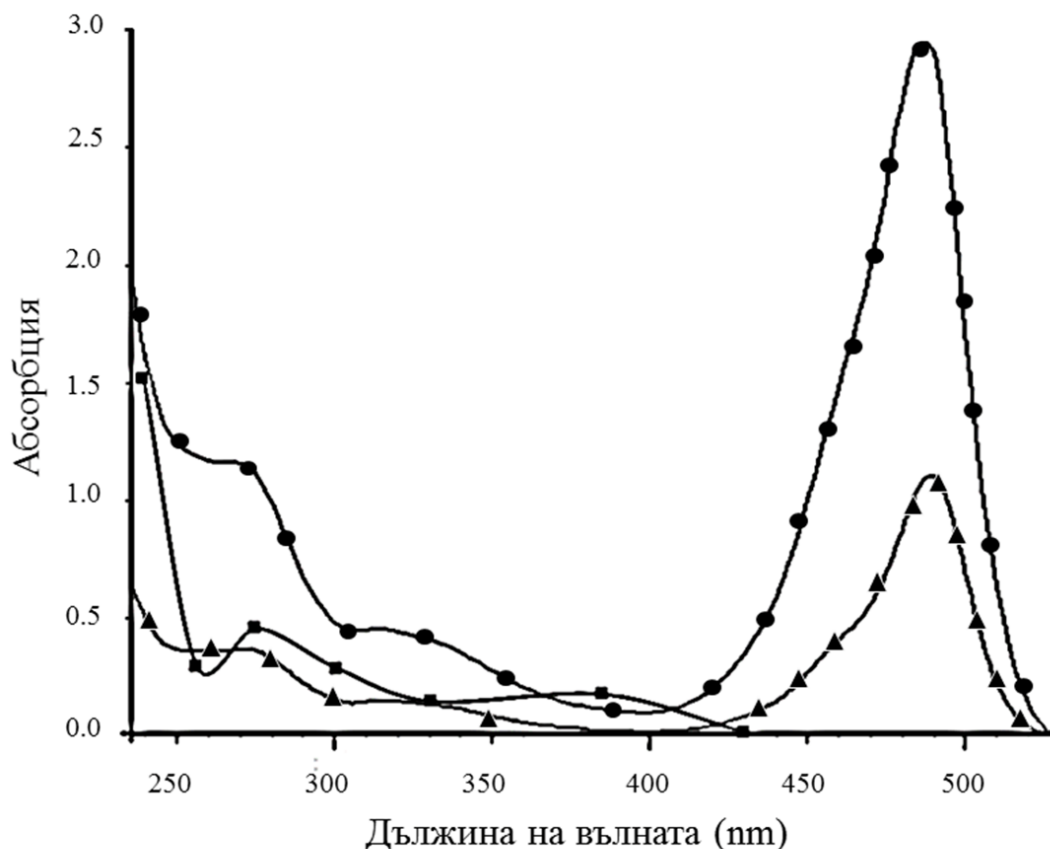
Конюгатът се приготвя чрез три последователни стъпки. При първият етап се осъществява редукция на нитро групата на параоксона до аминогрупа. При вторият етап се осъществява свързване на модифицирания параоксон с BSA с помощта на глутаров алдехид. Третият етап е получаването на параоксон-BSA-FITC конюгата. Оптималното съотношение на флуоресцентното багрило към протеина F/P е 5.2 за изследвания конюгат.



Фигура 10. Реакционна схема за получаване на конюгат на параоксон-BSA-FITC.

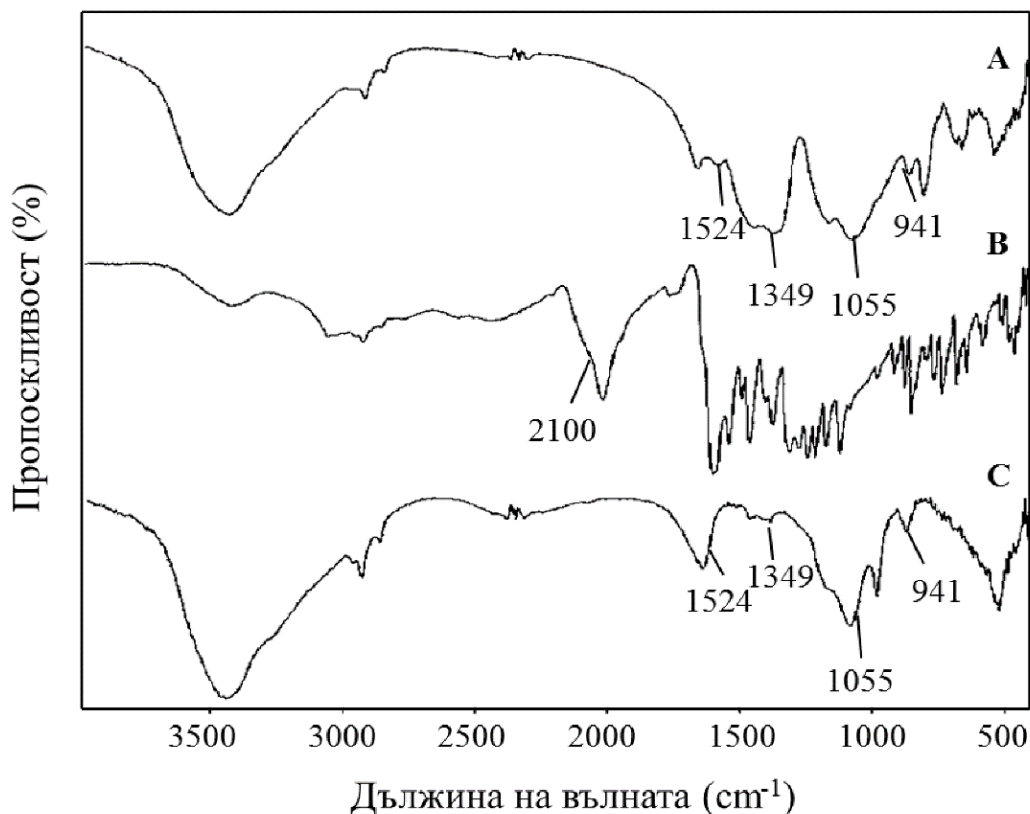
(Отговаря на фигура 26).

За потвърждаване на образуването на параоксон-BSA-FITC конюгата се използва ултравиолетов спектрофотометричен метод. На Фигура 11 са представени ултравиолетови спектри на конюгат на параоксон-говежди серумен албумин, FITC и параоксон-BSA-FITC конюгат. Очевидно е, че параоксон-BSA конюгатът има два абсорбционни максимума. Първият максимум е при 275 nm, а вторият при 385 nm. FITC абсорбира при дължина на вълната 490 nm. Полученият параоксон-BSA-FITC конюгат има два абсорбционни максимума, които съответстват на максимумите на параоксон-говежди серумен албумин и FITC. Първият абсорбционен максимум се измества от 275 до 271 nm, поради реакцията на параоксон-BSA с FITC. Вторият абсорбционен максимум се измества от 490 nm на 489 nm, отново поради същото взаимодействие.



Фигура 10. UV-Vis спектри на параоксон-BSA (■), FITC (▲) и параоксон-BSA-FITC (●). (Отговаря на фигура 26 в дисертацията).

Приготвянето на параоксон-BSA-FITC конюгат се доказва и чрез IR анализ. Фигура 11 показва инфрачервените спектри на параоксон-BSA-FITC конюгата, параоксон-BSA и FITC. Отсъствието на характерни ивици при 1349 и 1524 cm^{-1} отговарящи за нитрогрупата на параоксона в първите два спектъра доказват редуцирането на нитро групите до аминогрупи и осъществяване на връзката между параоксон и BSA. Инфрачервените спектри на параоксон-BSA и параоксон-BSA-FITC показват ивици при 1055 и 941 cm^{-1} , съответстващи на V (P-O-C) групи от параоксона. Характерни ивици за амида I и амид II в BSA при 1650 и 1550 cm^{-1} в спектъра параоксон-BSA-FITC доказват осъществяването на връзката между параоксон и BSA. Отсъствието на характерната ивица на FITC при 2100 cm^{-1} , съответстваща на $\text{Ag-N}=\text{C}=\text{S}$ в спектъра на параоксон-BSA-FITC показва, че изотиоцианатната група (-NCS) на FITC реагира с първичната аминогрупа на BSA и формира амидна група.

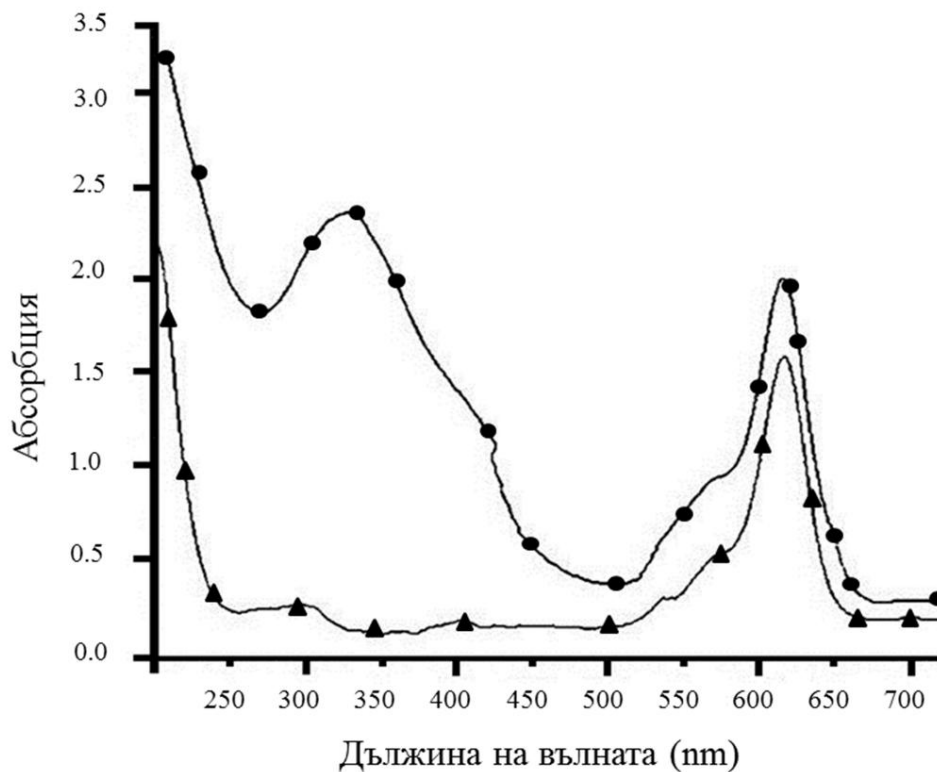


Фигура 11. Инфрачервени спектри на параоксон-BSA конюгат (А), FITC (В) и параоксон-BSA-FITC конюгат (С). (Отговаря на фигура 27 в дисертацията).

3.3. Получаване, пречистване и доказване на конюгата параоксон-BSA- АТТО 620

За да се осъществи едновременно определяне на дихлорвос и параоксон в една и съща проба е необходимо да са налице два конкурентни конюгати с различни маркери. За целта бе приготвен параоксон-BSA-АТТО 620 конюгат за едновременно определяне на параоксон и дихлорвос в млякото. Оптималното съотношение на F/P е 4.6 за изследвания конюгат. За потвърждаване на образуването на конюгата параоксон-BSA-АТТО 620 се използва отново ултравиолетов спектрофотометричен метод. На фигура 12 са представени ултравиолетови спектри на АТТО 620 и на конюгата параоксон-BSA-АТТО 620. АТТО 620 абсорбира при 620 nm. Полученият конюгат параоксон-BSA-АТТО 620 има два абсорбционни максимума, които съответстват на максимумите на параксон-BSA (фигура 12) и АТТО 620. Първият максимум при 332 nm е широк и включва характерните пикове на параксон-BSA при 275 и 385 nm. Вторият максимум е при 618

nm, съответстващ на характерния максимум на АТТО 620. Изместването на този пик се дължи на реакцията на параоксон-BSA с АТТО 620.



Фигура 12. UV-Vis спектри на АТТО 620 (▲) и параоксон-BSA-АТТО 620 (●).
(Отговаря на фигура 28 в дисертацията)

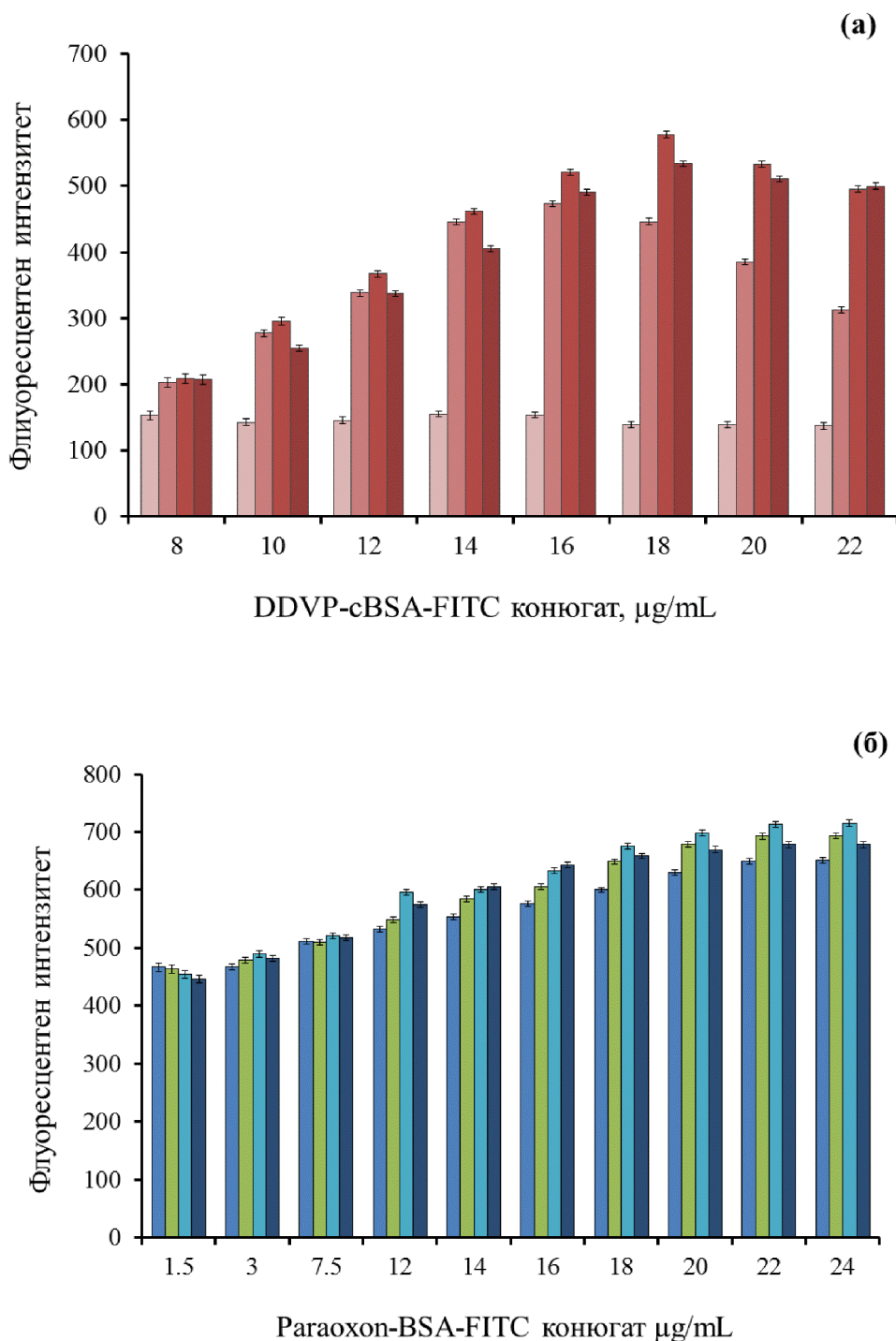
3.4. Определяне на оптималните условия за провеждане на имунофлуоресцентния анализ за определяне концентрацията на дихлорвос и параоксон

Антигените (дихлорвос и параоксон) са малки молекули, които имат само едно място на свързване с антителата, така че конструкцията на имунологичния анализ е ограничена до конкурентен формат. По този начин свободният пестицид в пробата и точно определено количество флуоресцентно белязан антиген (конкурентен конюгат) се инкубират с определено количество имобилизирано антитяло върху магнитни наночастици. Така се осъществява конкуренция за свързващите места на антитялото, което е имобилизирано върху магнитни наночастици (MNPs). Флуоресцентният имуноанализ, основан на MNPs, се провежда със стандартни разтвори на двата пестицида в 10 mM PBS, pH 7.4 и в мляко. След магнитно отделяне на MNPs върху страничната стена на микроцентрифужна епруветка се измерва интензивността на

флуоресценцията на свободния несвързан конюгат в супернатантата. Флуоресцентният сигнал е обратно пропорционален на концентрацията на антигена в пробата. След това се начертава кривата на инхибиране, характерна за флуоресцентния имуноанализ на инхибитори. Получените по-горе конюгати се използват като маркери във флуоресцентния имуноанализ за определяне на дихлорвос и параоксон. Другият важен компонент за имуноанализа са имобилизираните антители. Поликлоналните антители срещу дихлорвос и параоксон са ковалентно свързани с магнитни наночастици. Магнитните наночастици (Fe_3O_4) се синтезират по химичен метод чрез съвместно утаяване на Fe^{2+} и Fe^{3+} водни солеви разтвори. След това те се модифицират с 3-(аминопропил) триетоксисилан като покривен материал за въвеждане на аминокрупи (Smith & Chen 2008; Wu, He, Chen, Tang, & Nie, 2007). Определят се размерите на изходните и функционализираните магнитни наночастици чрез анализатор за размера на частици (IZON qNano, Англия), съответно 182 и 292.5 nm. Размерът на наночастиците с имобилизирано анти тяло дава възможност за обработка на частиците в суспензия. Лесното събиране на магнитните частици с постоянен магнит позволява отделяне на свързаната и свободна фракция на индикатора. Други предимства на магнитните частици в сравнение с конвенционалните твърди носители използвани при имуноанализите са лесна манипулация, висока скорост на масообмен, добър контакт на двете фази, перспективи за автоматизация на системата и миниатюризация (Solé, Merkoçi & Alegret, 2001; Rad, Yavuz, Kocakulak & Denusli, 2003; Zhao & Shippy, 2004). Изборът на процедурата за разделяне е важен за повишаване на чувствителността при хетерогенните имуноанализи. Следователно разработването на нов имунофлуоресцентен метод на базата на магнитни наночастици за определяне на пестициди в млякото е много интересно.

Поликлоналните антители срещу дихлорвос и параоксон са ковалентно свързани чрез техните аминокрупи към функционализираните магнитни наночастици с аминокрупи с помощта на глутаров алдехид. Ефективността на свързването на анти тялото се оценява, използвайки метода на Брадфорд (Bradford 1976). Установено е, че количеството на имобилизираните поликлонални анти-дихлорвос и анти-параоксон антители върху MNPs е 0.0226 mg Ab на mg магнитни наночастици. Проведени са индивидуални имуноанализи за определяне на параоксон и дихлорвос. За тази цел бяха определени оптималните концентрации на конюгатите DDVP-cBSA-FITC и параоксон-BSA-FITC и съответните имобилизирани антители. Варирани са концентрациите на конюгатите и имобилизираните антители, Фигура 13а и 13б. Най-добри резултати за имуноанализ на дихлорвос бяха получени при 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DDVP-cBSA-FITC конюгат и 0.375 mg анти тяло-магнитни наночастици (0.0165 mg имобилизирано анти тяло), както е показано на Фигура 13а. Определени са оптималните концентрации на

параоксон-BSA-FITC конюгат- 22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ и имобилизирано антитяло - 0.375 mg антитяло-магнитни наночастици (0.0165 mg имобилизирано антитяло), както е показано на Фигура 13б. С така определените оптимални концентрации за конюгатите и антителата се провежда индивидуален имуноанализ за определяне на параоксон и дихлорвос.

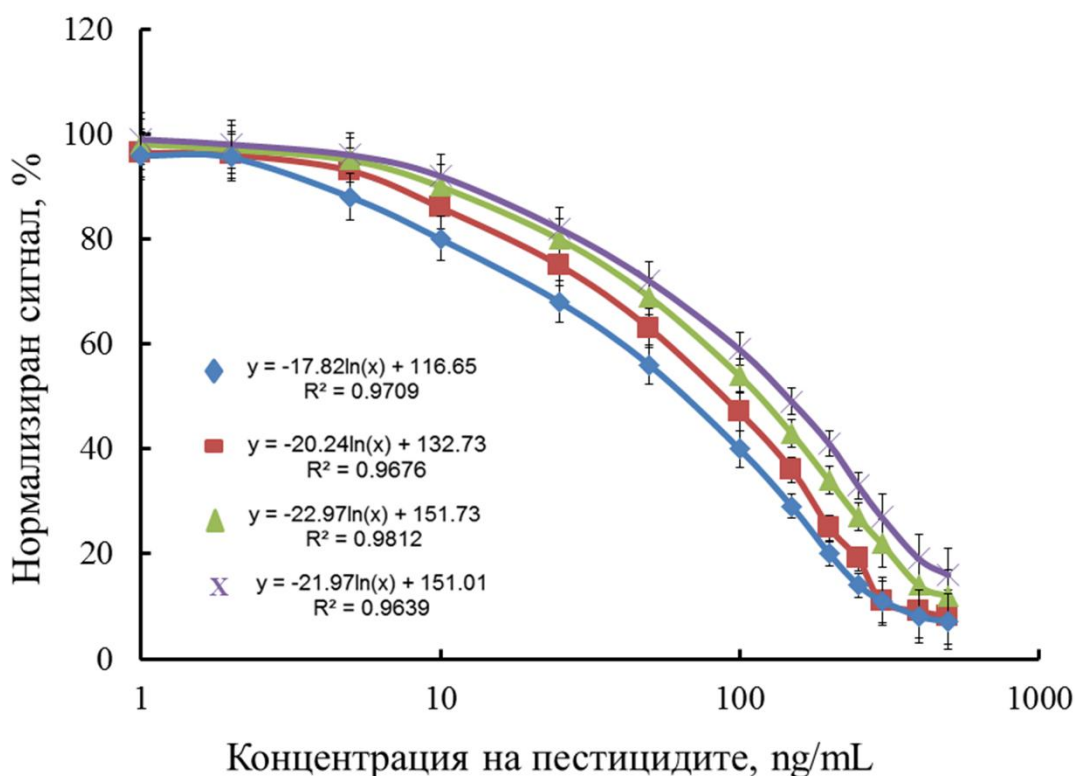


Фигура 13. Влияние на концентрацията на конюгата DDVP-cBSA-FITC (а), на конюгата параоксон-BSA-FITC (б) и количеството на имобилизираното антитяло-MNPs (0.125; 0.25; 0.375 и 0.5 mg) върху индивидуалния имунофлуоресцентен анализ за дихлорвос и параоксон. (Отговаря на фигура 29 в дисертацията).

Обикновено имуноанализите са разработени по начин, който дава възможност да се определи един пестицид. Но ако сместа е сложна и съдържа няколко пестицида е необходимо провеждане на имуноанализа няколко пъти. Това води до по-голям разход на време и реагенти и допълнително оскъпяване на анализа. За да бъдат избегнати тези недостатъци, са разработени т. нар. мултианализи, които позволяват едновременното определяне на няколко пестицида в една проба. Техните предимства са висока производителност, подобрена ефективност на анализа, малка консумация на реагенти и редуцирана цена на анализа. Флуоресцентният имуноанализ може да бъде разработен като мултианализ, тъй като могат да се използват няколко флуоресцентни багрила с различни абсорбционни и емисионни спектри, с които да се конюгират антигените. Именно за това са получени и пречистени два конюгата с различни флуоресцентни багрила - параоксон-BSA-ATTO 620 и DDPV-BSA-FITC. Отделно са определени оптималните концентрации на конюгатите параоксон-BSA-ATTO 620 и DDPV-BSA-FITC и съответните антители за едновременно определяне на дихлорвос и параоксон в една и съща проба. Двете антители се поставят едновременно в пробата в концентрации равни на концентрациите на антителата използвани при индивидуалните анализи. Установено е, че оптималните концентрации на конюгатите (DDPV-BSA-FITC и параоксон-BSA-ATTO 620) и имобилизираните антители са същите както при индивидуалните имуноанализи.

3.5. Калибрационни криви на имунофлуоресцентен анализ за индивидуално и едновременно определяне на дихлорвос и параоксон в буфер и краве мляко

Изследвани са калибрационните криви на имунофлуоресцентния анализ за индивидуално и едновременно определяне на параоксон и дихлорвос в сурово краве мляко, фигура 14.



Фигура 14. Калибрационни криви на параоксон (Ab1, ♦); дихлорвос (Ab2, ■); параоксон (Ab1 + Ab2, ▲), DDVP (Ab1 + Ab2, x) в краве мляко чрез конкурентен имунофлуоресцентен анализ. Всяка точка представлява средната стойност от пет експеримента, CV = 4-7%. (Отговаря на фигура 30 в дисертацията)

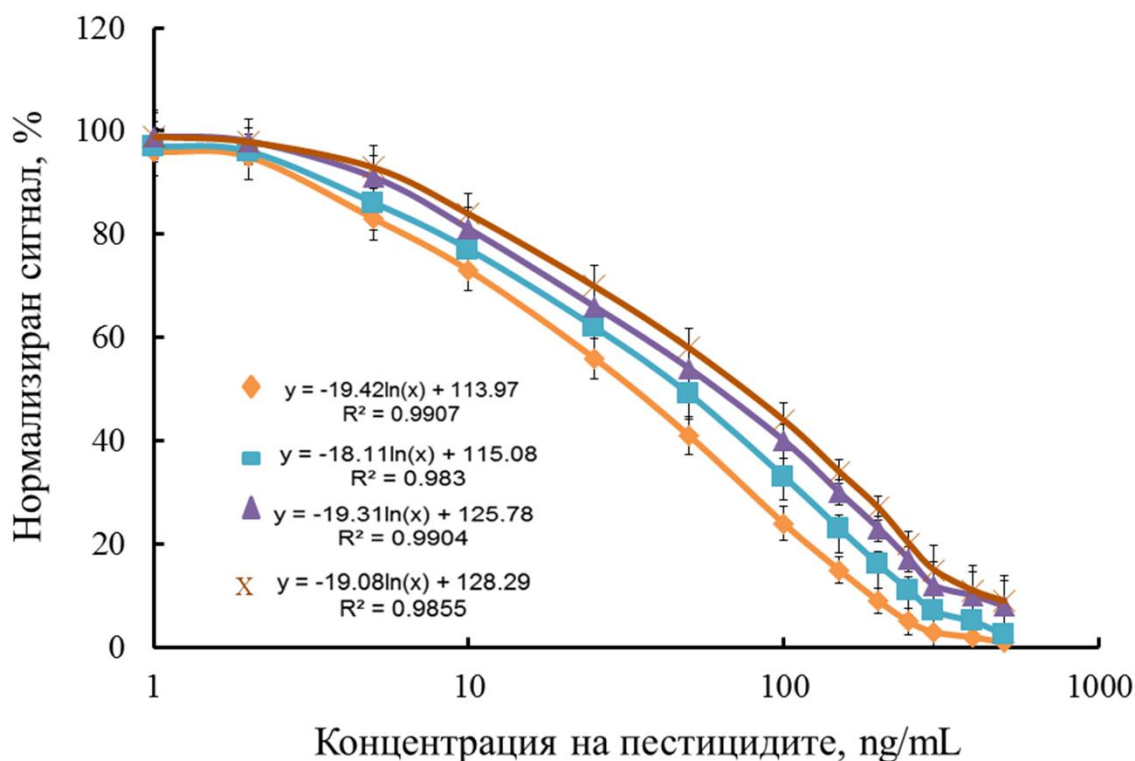
Фигура 14 показва, че в суровото краве мляко IC_{50} стойността на индивидуалния имуноанализ на параоксон е 60 ng/mL, а границата на откриване е 1.9 ng/mL (5% инхибиране). Линеиният концентрационен интервал за определяне на параоксон е от 2 до 300 ng /mL (Таблица 4).

Таблица 4. Основни аналитични характеристики за индивидуално определяне на параоксон (Ab1), DDVP (Ab2) и едновременно определяне на параоксон (Ab1 + Ab2), DDVP (Ab1 + Ab2) в краве, пастъоризирано мляко и в буферен разтвор чрез имунофлуоресцентен анализ на базата на MNPs. (Отговаря на таблица 7 в дисертацията)

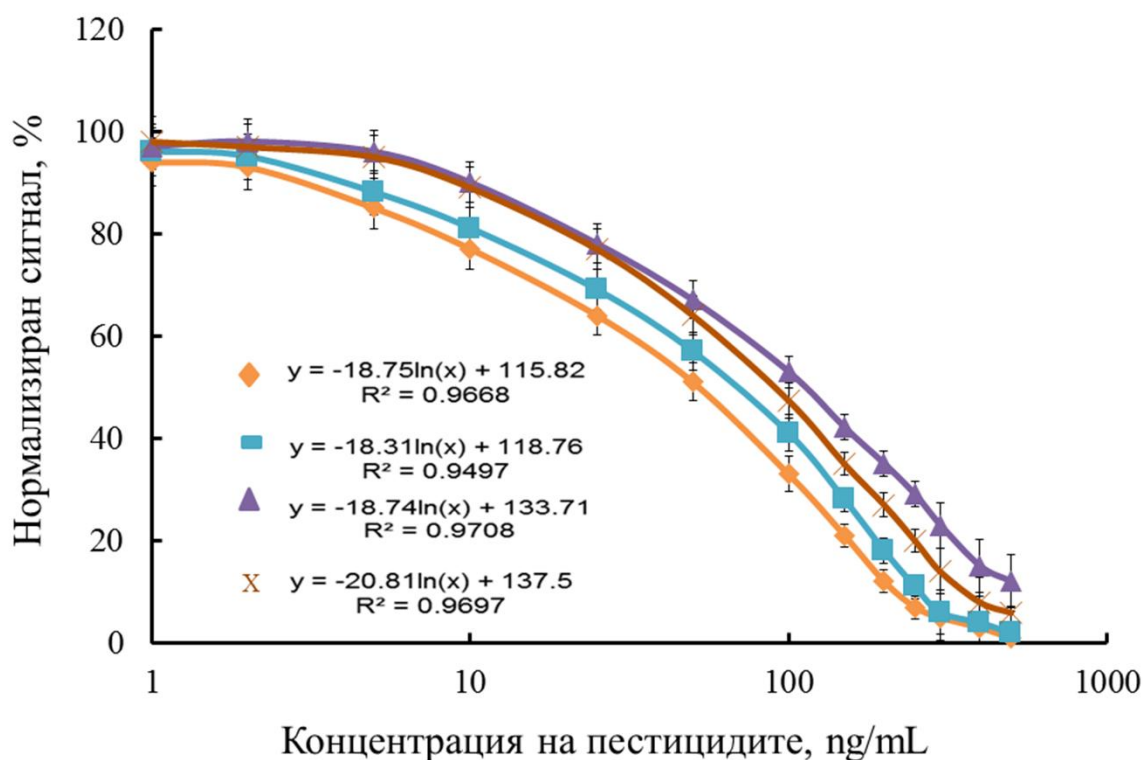
Пестициди/ антитела	IC ₅₀ , ng/mL			Линейна област, ng/mL			Граница на откриване, ng/mL		
	Крав е мляк о	Буфе р	Пастъ ориз. мляко	Краве мляко	Буфе р	Пастъ ориз. мляко	Краве мляко	Буфе р	Пастъ ориз. мляко
Параоксон /Ab1	60	39	55	2-300	2-250	2-300	1.9	1.9	1.9
DDVP /Ab2	70	50	70	5-300	2-250	2-300	4.75	1.9	1.95
Параоксон/А b1+Ab2	100	60	80	10-400	5-350	5-400	7.5	2.5	4.75
DDVP /Ab1+Ab2	120	70	110	10-400	5-350	5-400	8.0	3.5	4.85

Резултатите за индивидуалното определяне на DDVP са подобни на резултатите за параоксона. Стойността на IC₅₀ на индивидуалния имуноанализ за DDVP е 70 ng / mL и границата на откриване е 4.75 ng/mL. Линейният работен обхват на този анализ е от 5 до 300 ng/mL. Линейните работни интервали за едновременно определяне на параоксон и DDVP са изместени към по-високи концентрации на пестициди 10-400 ng/mL. Стойностите на IC₅₀ на параоксон и дихлорвос в имуноанализа за едновременно изследване на двата пестицида са по-високи от тези за индивидуалния анализ, съответно 100 и 120 ng/mL. Границите на откриване на едновременното определяне на параоксон и DDVP, съответно са 7.5 ng/mL и 8.0 ng/mL. Доказано е, че при измерването на концентрацията на единия пестицид няма наличие на пречещо влияние на другия пестицид. Това е потвърдено чрез изследване на специфичността на антителата чрез индиректен конкурентен ELISA. Установено е, че кръстосаната реактивност на анти-дихлорвос антитялото спрямо дихлорвоса е 100%, а спрямо параоксона е нула. Обратно кръстосаната реактивност на анти-параоксон антитялото спрямо етилпараоксон е 100% и не е налице кръстосана реактивност спрямо дихлорвос. Линейните

уравнения на четирите калибрационни криви са представени на Фигура 14. Постигнати са високи корелационни коефициенти и при четирите анализа (0.96-0.98). Разработеният имунофлуоресцентен анализ на базата на MNPs се прилага за оценка на концентрацията на двата пестициди в буферен разтвор и в пастъоризирано краве мляко с ниска концентрация на мазнини - 1% (Фигура 15, 16 и Таблица 4).



Фигура 15. Калибрационни криви на параоксон (Ab1, ♦); дихлорвос (Ab2, ■); параоксон (Ab1 + Ab2, ▲), DDVP (Ab1 + Ab2, x) в буферен разтвор чрез конкурентен имунофлуоресцентен анализ. Всяка точка представлява средната стойност от пет експеримента, CV = 4-7%. (Отговаря на фигура 31 в дисертацията)



Фигура 16. Калибрационни криви на параоксон (Ab1, ♦); дихлорвос (Ab2, ■); параоксон (Ab1 + Ab2, ▲), DDVP (Ab1 + Ab2, x) в пастъоризирано мляко (1% мазнина) чрез конкурентен имунофлуоресцентен анализ. Всяка точка представлява средната стойност от пет експеримента, CV = 4-7%.

(Отговаря на фигура 32 в дисертацията)

Серии от стандартни разтвори с различни концентрации на пестициди се приготвят с буферни разтвори и пастъоризирано мляко за аналитичното представяне на предложения флуоресцентен имуноанализ. Получените резултати се сравняват с резултатите в прясно сурово мляко. Установено е, че калибрационните криви в пастъоризираното мляко с ниска концентрация на мазнини и в буфер имат по-къс линеен интервал и по-ниска граница на откриване в сравнение със същите характеристики на анализа в краве мляко. Очевидно матрицата – сурово мляко, съдържаща мазнини, протеини, соли и др. влияе върху чувствителността на анализа на пестицидите. Линеиният диапазон на всички криви в буферните разтвори е най-кратък и чувствителността е най-висока (Таблица 4). Постигнати са високи корелационни коефициенти в пробите с буфер и в пробите с пастъоризирано краве мляко(0.94-0.99).

Получените резултати от разработения имунофлуоресцентен анализ на параоксон и дихлорвос се сравняват със стойностите, получени от аналогични изследвания с ELISA от други автори (Таблица 5). От таблицата се вижда, че полученият имуноанализ за параоксон и дихлорвос

има по-висока чувствителност, с линейна област изместена към по-ниски концентрации в сравнение с публикуваните резултати от други автори.

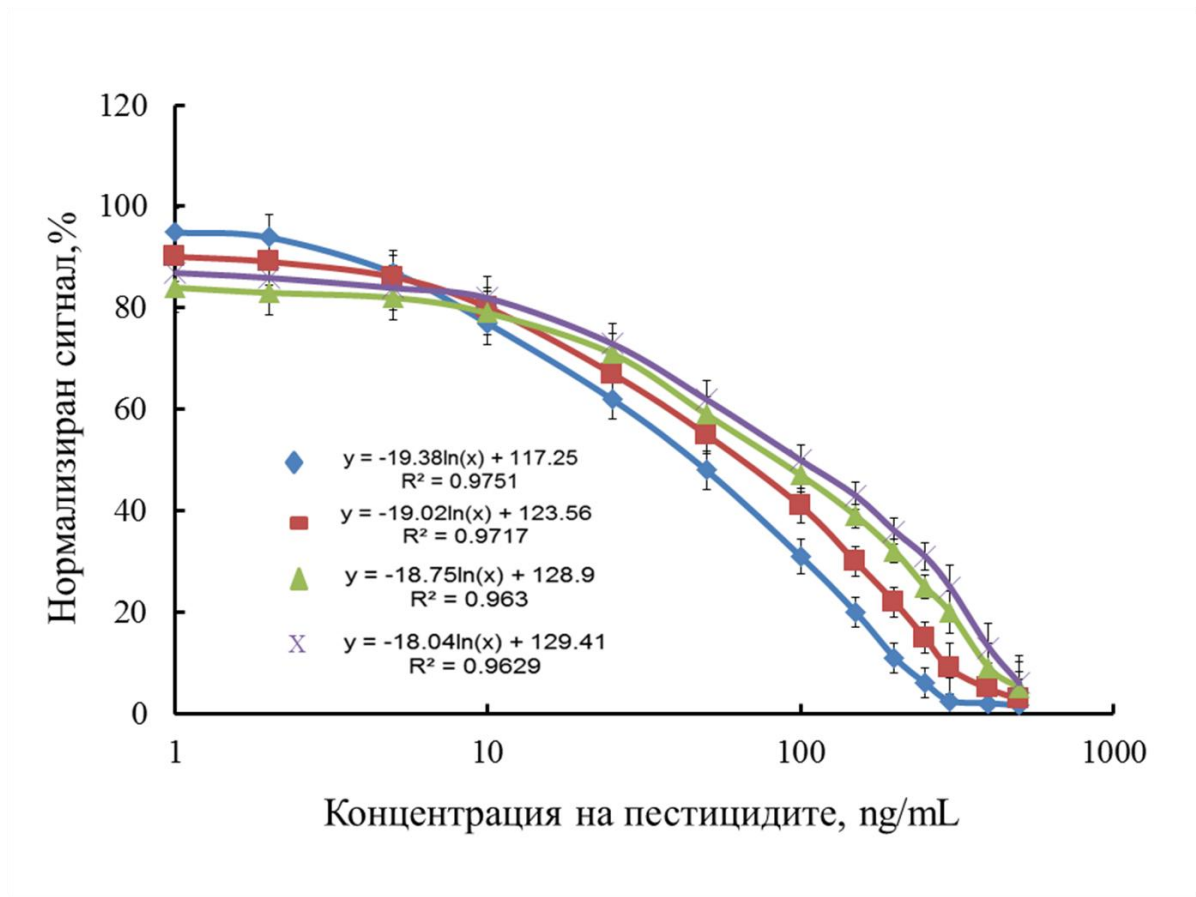
Таблица 5. Сравнение на аналитичните характеристики на имунофлуоресцентния анализ на дихлорвос и параоксон с данни публикувани от други автори. (Отговаря на таблица 8 в дисертацията).

Пестициди	Линейна област, ng/mL	Граница на откриване, ng/mL	Други автори
DDVP	100-10,000	48.0	Tang et al., 2008
DDVP	0.1-1,000	1.0	Feng et al., 2010
DDVP	5-300 (самостоятелен анализ в краве мляко)	4.75	Yaneva et al., 2017
	10-400 (едновременно изследване краве мляко)	8.0	Наша публикация
параоксон	2-300 (самостоятелен анализ в краве мляко)	1.9	Yaneva et al., 2017
	10-400 (едновременно изследване краве мляко)	7.5	Наша публикация
параоксон	100-20,000	10.0	Limei et al., 2008
параоксон	12-1,158	5.0	Li et al., 2009

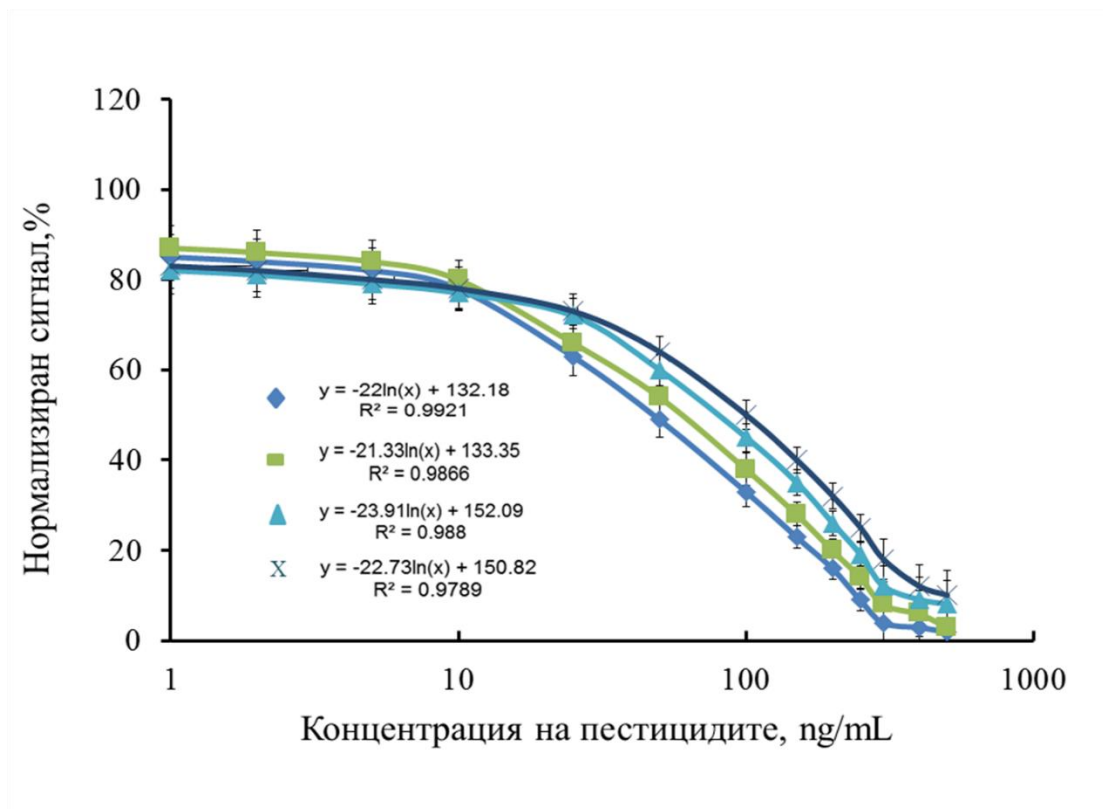
3.6. Влияние на различни типове мляко върху имунофлуоресцентния индивидуален и едновременен анализ на дихлорвос и параоксон

Отчетено е влиянието на различни видове мляко (краве, козе, овче) върху разработения анализ. Изследвани са кривите на калибриране на индивидуалния имуноанализ на параоксон, индивидуалния анализ на DDVP и едновременното определяне на параоксон и DDVP в сурово козе мляко. Стойностите на IC50 за четирите имуноанализа са съответно 50, 75, 90 и 110 ng/mL и те са много близки до резултатите в краве мляко (Таблица 6). Линейните концентрационни интервали на калибрационните

криви на индивидуалните и едновременни имуноанализи на двата пестицида в козе мляко са подобни на линейните интервали на кривите в краве мляко. Чувствителността на анализа на пестицидите в козе мляко е близка до чувствителността на имуноанализите на кравето мляко.



Фигура 17. Калибрационни криви на параоксон (Ab1, ◆); DDVP (Ab2, ■); параоксон (Ab1 + Ab2, ▲), DDVP (Ab1 + Ab2, x) в козе мляко чрез конкурентен имунофлуоресцентен анализ. Всяка точка представлява средната стойност от пет експеримента, CV = 4-7%. (Отговаря на фигура 33 от дисертацията).



Фигура 18. . Калибрационни криви на параоксон (Ab1, \blacklozenge); DDVP (Ab2, \blacksquare); параоксон (Ab1 + Ab2, \blacktriangle), DDVP (Ab1 + Ab2, \times) в овче мляко чрез конкурентен имунофлуоресцентен анализ. Всяка точка представлява средната стойност от пет експеримента, CV = 4-7%. (Отговаря на фигура 34 в дисертацията)

Таблица 6. Основни аналитични характеристики на имунофлуоресцентния анализ на базата на MNPs на параоксон (Ab1), DDVP (Ab2), параоксон (Ab1 + Ab2), DDVP (Ab1 + Ab2) в краве, кози и овче мляко. (Отговаря на таблица 9 от дисертацията)

Пестициди/ антитела	IC50, ng/mL			Линейна област, ng/mL			Граница на откриване, ng/mL		
	Краве мляко	Козе мляко	Овче мляко	Краве мляко	Козе мляко	Овче мляко	Краве мляко	Козе мляко	Овче мляко
Параоксон /Ab1	60	50	65	2-300	2-300	10-300	1.9	1.95	5.5
DDVP /Ab2	70	75	80	5-300	5-300	10-300	4.75	4.75	8.5
Параоксон/Ab1 +Ab2	100	90	110	10-400	10-400	25-400	7.5	9.0	13.5
DDVP/Ab1+Ab2	120	110	140	10-400	10-400	25-400	8.0	9.5	15.5

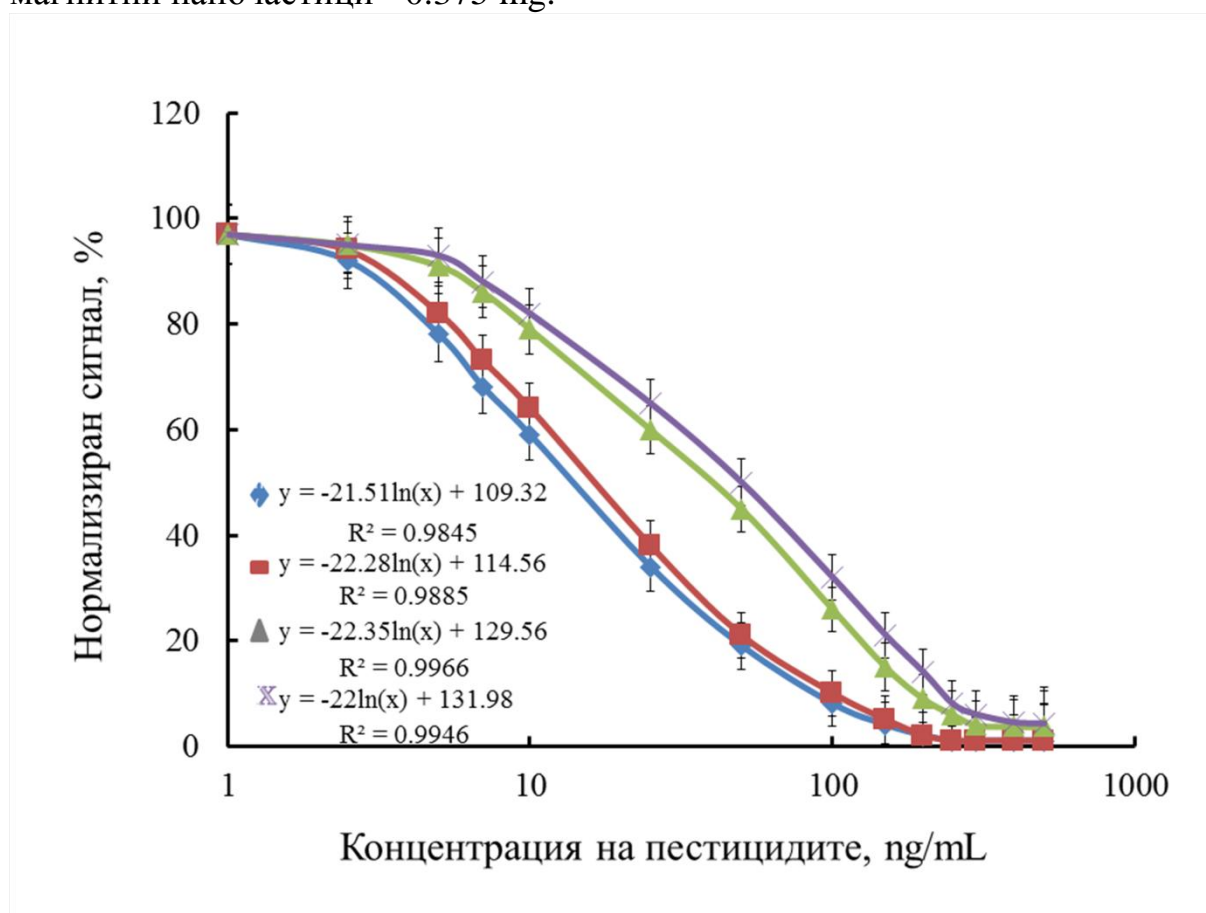
От таблица 6 се вижда, че линейните интервали на четирите криви в овче мляко са различни от резултатите в другите два типа мляко. Стойностите IC50 на четирите имуноанализа в овче мляко са по-високи - 65 ng/mL (индивидуален анализ за параоксон), 80 ng/mL (индивидуален анализ за DDVP), 110 ng/mL (едновременен анализ, параоксон) и 140 ng/mL (едновременен анализ, DDVP) (Таблица 6). Линейните работни интервали на индивидуалните имуноанализи на дихлорвос и параоксон са по-кратки от 10 до 300 ng / mL, а при едновременните анализи от 25 до 400 ng/mL. Основната причина за получаването на тези резултати е по-високата концентрация на мазнини (7.8%) в овчето мляко в сравнение с масленото съдържание на краве мляко (3.8%) и козе мляко (3.5%). Границите на откриване на пестициди в пробите от овче мляко са по-високи от границите на откриване в краве мляко. Високото съдържание на мазнини в овчето мляко (7.8%) потиска чувствителността на пестицидния имуноанализ. Установени са високи корелационни коефициенти на кривите при провеждане на анализа в проби от козе и овче мляко (0.96-0.99).

Следователно, получения имунофлуоресцентен анализ на базата на MNPs за индивидуално и едновременно определяне на пестициди са лесни и удобни за използване, което позволява директна употреба на неразредена проба; в същото време този анализ поддържа висока чувствителност и има голям линеен концентрационен интервал. Очевидно е, че едновременният имуноанализ е по-ефективен от индивидуалния, тъй като е възможно да се измерват два вида пестициди в една и съща проба по едно и също време. Именно за това са проведени експерименти с мулти-поликлонално антитяло за създаване на имунофлуоресцентен анализ за едновременно определяне на двата изследвани пестицида.

3.7 Имунофлуоресцентен анализ за едновременно определяне на дихлорвос и параоксон чрез мултиполиклонално антитяло. Калибрационни криви.

Обикновено мулти-имуноанализите се разработват чрез използването на комбинация от няколко антитета и няколко конкурентни конюгати с различни флуоресцентни багрила. Подбират се подходящи флуоресцентни багрила без риск от припокриване на дължините на вълната. Съвременните тенденции са да се използва техника за идентифициране на повече от един пестицид едновременно (Spinks, 2000). За да се постигне това, е възможно да се повиши броя на антитета, които разпознават индивидуалните пестициди, които са включени в един тест. По-икономична алтернатива обаче е да се създаде единично мултиантитяло, което има широка специфичност и което е в състояние да определи няколко анализа в един тест. Именно за тази цел е получено мулти-поликлонално антитяло чрез инжектиране на смес от имуногени DDVP-cBSA и параоксон-BSA в съотношение 1:1 (в точка 1.3). Полученото мулти-поликлонално антитяло

е приложено за разработване на едновременен анализ на дихлорвос и параоксон в една и съща проба. Използвани са два конюгата DDVP-сBSA-FITC и параоксон-BSA-АТТО, маркирани с две различни флуоресцентни багрила. Изследвани са калибрационните криви на едновременния имуноанализ на двата пестицида в сурово краве мляко и буферен разтвор с използването на мулти-поликлонално антитяло, фигура 19. Предварително са определени оптимални концентрации на конюгатите DDVP-сBSA-FITC и параоксон-BSA-АТТО и изследваното мултиантитяло, съответно DDVP-сBSA-FITC е 18 $\mu\text{g/mL}$, параоксон-BSA-АТТО 620 – 22 $\mu\text{g/mL}$ и антитяло-магнитни наночастици - 0.375 mg.



Фигура 19. Калибрационни криви на имунофлуоресцентен анализ с мулти-поликлонално антитяло за параоксон (◆); дихлорвос (■) в 10 mM PBS буфер с pH 7.4 и параоксон (▲), DDVP (x) в краве мляко. Всяка точка представлява средната стойност от пет експеримента, CV = 4-7%. (Отговаря на фигура 35 в дисертацията)

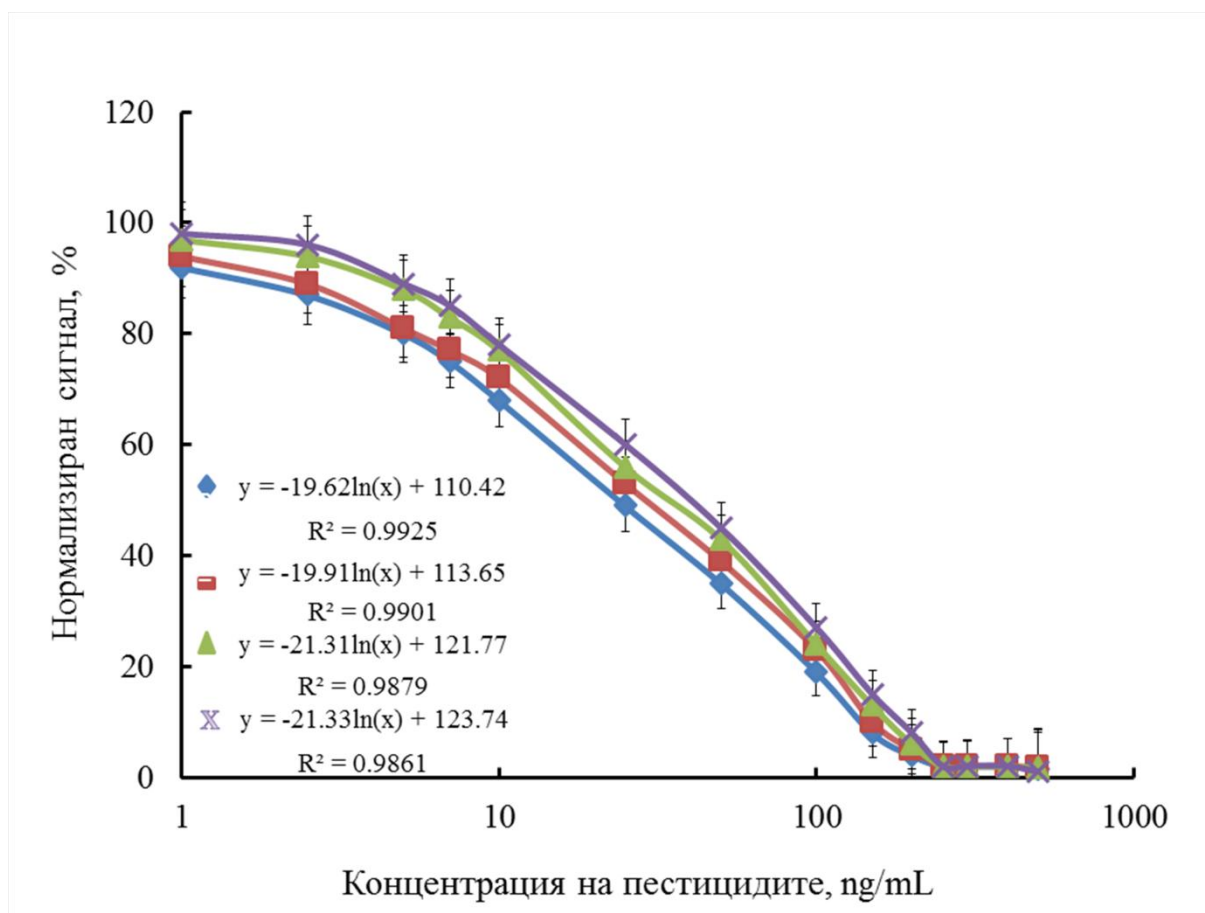
Фигура 19 показва, че в суровото краве мляко стойността на IC₅₀ на мулти-поликлоналното антитяло от параоксон и DDVP е съответно 43 и 45 ng/mL, а границата на откриване на имуноанализа е съответно 3.5 и 4 ng/mL (5% инхибиране). Линеиният работен обхват на анализа е между 5 и 300 ng/mL. Характеристиките на същият анализ в буфер са изместени към по-ниски стойности на IC₅₀ – за параоксон и DDVP съответно са 28 и 30 ng/mL. Границите за откриване на параоксон и дихлорвос са 4 пъти по-

ниски в сравнение с тези в краве мляко, съответно 0.95 и 1.0 ng/mL. Линеиният работен обхват и за двата пестицида е изместен към по-ниски концентрации - от 2 до 300 ng/mL.

Таблица 7. Основни аналитични характеристики на имунофлуоресцентен анализ на базата на MNPs с мулти-поликлонално антитяло за параоксон и DDVP в буфер, краве, УНТ и пастьоризирано мляко. (Отговаря на таблица 10 в дисертацията).

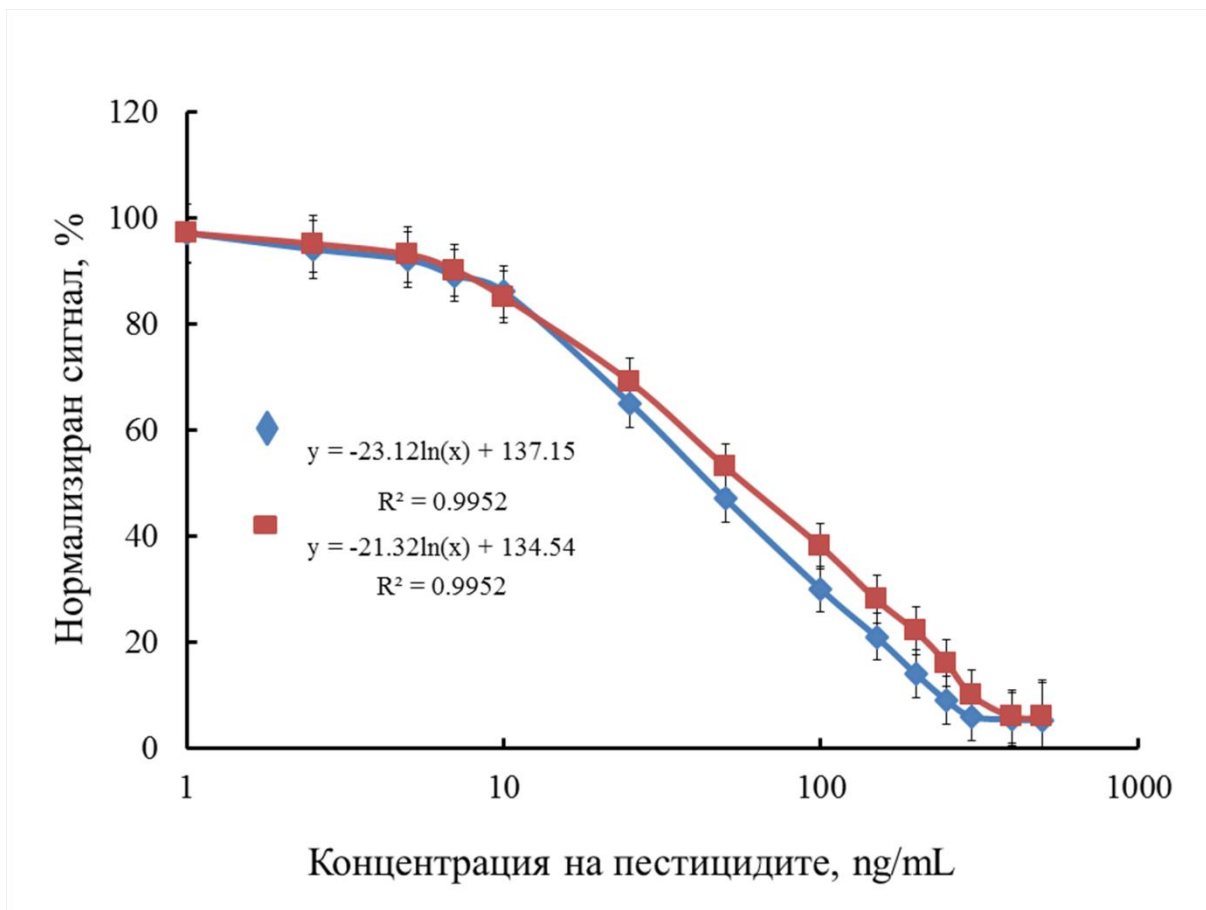
Пестициди / антителя	IC50, ng/mL				Линейна област, ng/mL				Граница на откриване, ng/mL			
	Краве мляко	Буфер	Паст. мляко	УНТ мляко	Краве мляко	Буфер	Паст. мляко	УНТ мляко	Краве мляко	Буфер	Паст. мляко	УНТ мляко
Параоксон /мулти-антитяло	43	28	35	33	5-300	2-200	3-300	2.5-250	3.5	0.95	1.50	1.30
DDVP /мулти-антитяло	45	30	38	35	5-300	2-200	3-300	2.5-250	4.0	1.00	1.70	1.50

Проведени са имунофлуоресцентни анализи с мулти-поликлонално антитяло за едновременно определяне на параоксон и дихлорвос в пастьоризираното мляко и в УНТ мляко. От фигура 20 и таблица 7 се вижда, че аналитичните характеристики на имуноанализите за параоксон и дихлорвос в посочените две млека имат междинни стойности между тези в буфер и краве мляко. Причината за това е, че матричното влияние на тези млека е по-слабо, тъй като те са термично обработени и са с по-ниска масленост (1.5%) спрямо маслеността на прясно краве мляко (3.8 %). Резултатите получени от имуноанализите за двата пестицида в пастьоризираното мляко и в УНТ мляко са много близки, таблица 7.



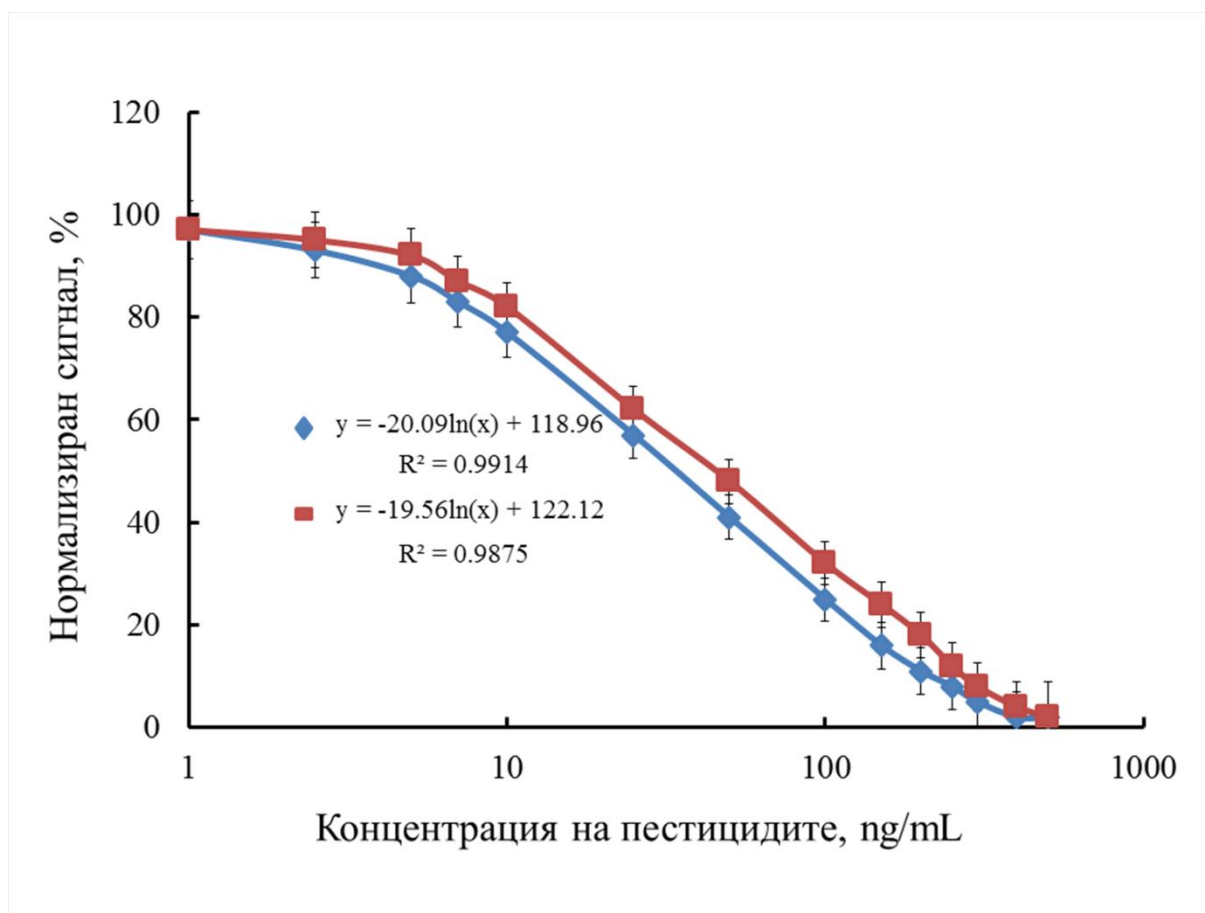
Фигура 20. Калибрационни криви на имунофлуоресцентен анализ с мулти-поликлонално антитяло : параоксон (◆); дихлорвос (■) в пастьоризирано мляко и параоксон (▲), DDVP (x) в УНТ мляко. Всяка точка представлява средната стойност от пет експеримента, CV = 4-7%. (Отговаря на фигура 36 в дисертацията).

Много по-различни са резултатите при анализиране на параоксон и дихлорвос в стандартни разтвори приготвени с овче мляко. Фигура 21 и таблица 8 показват, че в овче мляко, стойността на IC₅₀ за параоксон е 49 ng/mL и границата на откриване е 5.0 ng/mL, а за DDVP на IC₅₀ е 58 ng/mL и границата на откриване е 5.5 ng/mL. Линейният работен обхват за двата пестицида е между 7 и 300 ng/mL. Очевидно е, че има изместване на всички аналитични характеристики към по-високи стойности. Причината за това е високата масленост на овчето мляко (7.8 %) в сравнение с маслеността на краве мляко (3.8%).



Фигура 21. Калибрационни криви на имунофлуоресцентен анализ с мулти-поликлонално анти тяло за параоксон (◆); дихлорвос (■) в овче мляко. Всяка точка представлява средната стойност от пет експеримента, CV = 4-7%. (Отговаря на фигура 37 от дисертацията)

Аналитичните характеристики на имуноанализите за параоксон и дихлорвос в козе мляко имат междинни стойности между тези в овче и краве мляко. Фигура 22 и табл. 8 показват, че за параоксон IC50 е 39 ng/mL, границата на откриване е 2.5 ng/mL, а за DDVP IC50 е 41 ng/mL и границата на откриване е 2.7 ng/mL. Линейният работен интервал и за двата пестицида в козе мляко е между 3.5 и 300 ng/mL.



Фигура 22. Калибрационни криви на имунофлуоресцентен анализ с мулти-поликлонално антитяло: параоксон (◆); дихлорвос (■) в козе мляко. Всяка точка представлява средната стойност от пет експеримента, CV = 4-7%. (Отговаря на фигура 38 от дисертацията).

Таблица 8. Основни аналитични характеристики на имунофлуоресцентен анализ на базата на MNPs с мулти-поликлонално антитяло за параоксон и DDVP в краве, козе и овче мляко. (Отговаря на таблица 11 в дисертацията)

Пестициди/ антитела	IC50, ng/mL			Линейна област, ng/mL			Граница на откриване, ng/mL		
	Краве мляко	Козе мляко	Овче мляко	Краве мляко	Козе мляко	Овче мляко	Краве мляко	Козе мляко	Овче мляко
Параоксон /мулти-антитяло	43	39	49	5-300	3.5-300	7-300	3.5	2.5	5.0
DDVP /мулти-антитяло	45	41	58	5-300	3.5-300	7-300	4.0	2.7	5.5

Резултатите от валидирането на имунофлуоресцентните анализи проведени с мулти-поликлонално антитяло и с използването на два различно

маркирани конюгати убедено показват, че произведеното мулти-поликлонално антитяло и синтезираните конюгати са с висока активност и могат с успех да се използват за едновременен анализ на параоксон и дихлорвос в една и съща проба. Тези анализи са много переспективни, тъй като се печели време, по-малко реактиви се използват, редуцира се цената на анализа. Освен това установено е, че резултатите получени с имуноанализ проведен с мултиантитяло са по-добри в сравнение с резултатите получени при смесването на двете индивидуални имобилизирани антители в еквивалентни количества.

4. Сравнение на разработените имуофлуоресцентен и имуоензимен анализ за определяне на параоксон и дихлорвос в мляко

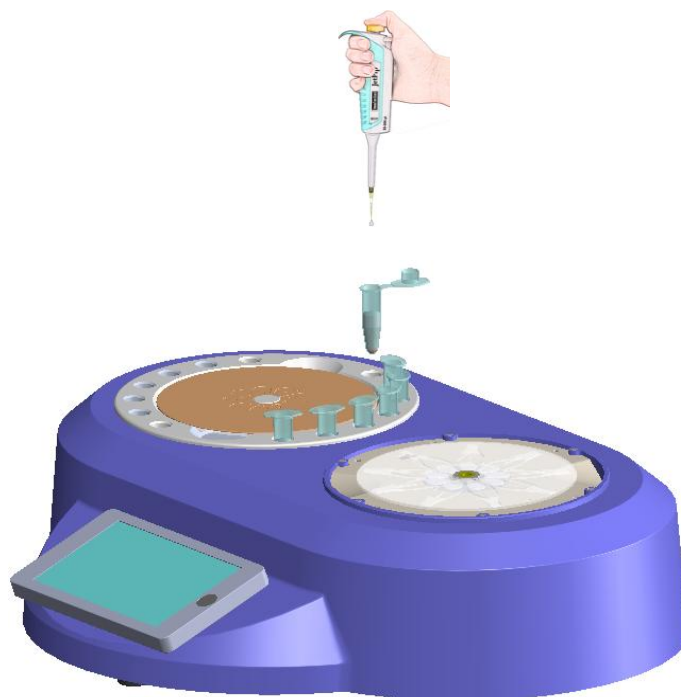
Интересно бе да се сравнят получените аналитични параметри на имуофлуоресцентния и имуоензимен анализа определяне на параоксон и дихлорвос в мляко.

Таблица 9. Сравнение на аналитични параметри на имуофлуоресцентния и имуоензимен анализ за определяне на параоксон и дихлорвос в мляко. (Отговаря на таблица 12 от дисертацията).

Пестициди/антит ела	IC50, ng/mL		Линейна област, ng/mL		Граница на откриване, ng/mL	
	ELISA	IFA	ELISA	IFA	ELISA	IFA
Параоксон /Ab1	0.7	60	0.01-5	2-300	0.008	1.9
DDVP /Ab2	0.5	70	0.01-5	5-300	0.006	4.75
Параоксон /мулти-антитяло	-	43	-	5-300	-	3.5
DDVP /мулти-антитяло	-	45	-	5-300	-	4

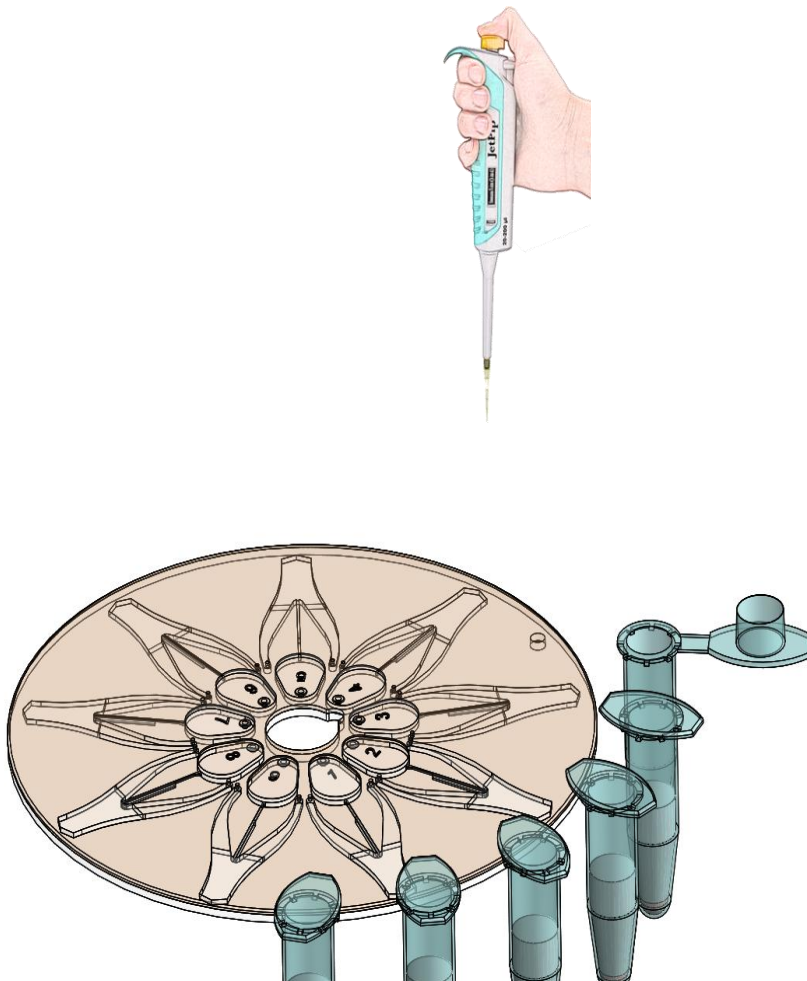
От таблицата се вижда, че линейния интервал при имуофлуоресцентния анализ е много по-широк в сравнение с ELISA метода. Това означава, че обхвата на аналитичните измервания е по-голям при имуофлуоресцентния метод. Границата на откриване за изследваните пестициди по ELISA метода е значително по-ниска в сравнение с имуофлуоресцентния метод. Известно е, че лимитните концентрации за дихлорвос и параоксон според Европейското законодателство са съответно 0.015 mg/kg, и 0,01 mg/kg, което показва че имуофлуоресцентният метод може директно да се използва за провеждане на анализи на пестициди, без предварително разреждане, без предварително третиране на пробите

мляко. Освен това имунофлуоресцентния метод е много по-бърз (30 min) в сравнение с имуносорбционния ензимен анализ (2h). Имуносорбционният ензимен анализ има много етапи и изисква многократно измиване на ямките на плаката. Друго предимство на имунофлуоресцентния метод е възможността да се осъществят мултианализи – едновременно измерване на няколко пестицида в една и съща проба. Това може да бъде осъществено благодарение на използването на различни флуоресцентни багрила за маркиране на конкурентните конюгати, което позволява да се детектират сигнали при две различни дължини на вълната. Съществено предимство на разработения имунофлуоресцентния метод е използването на магнитни наночастици за имобилизация на активния биоагент. Голямата специфична повърхност на магнитните наночастици позволява да се постигне по-голяма степен на имобилизация на поликлонално антитяло и оттам по-чувствителен анализ. Освен това наночастиците осигуряват много добър масообмен и това ускорява имунореакцията. Възможността да се интегрира имунофлуоресцентния конкурентен анализ със СД-базирано устройство LACTOSCAN, разработван от фирма Милкотроник ООД ще позволи да се осъществи бърз, автоматичен анализ за определяне на пестициди в мляко. Така определените оптимални количества имобилизирано антитяло и конюгати DDVP-cBSA-FITC и параоксон-BSA-АТТО се лиофилизират. Лيوфилизираното антитяло се поставя в микроцентрофужна епруветка, а лيوфилизираните конюгати се поставят в камерката на микрофлуиден диск.



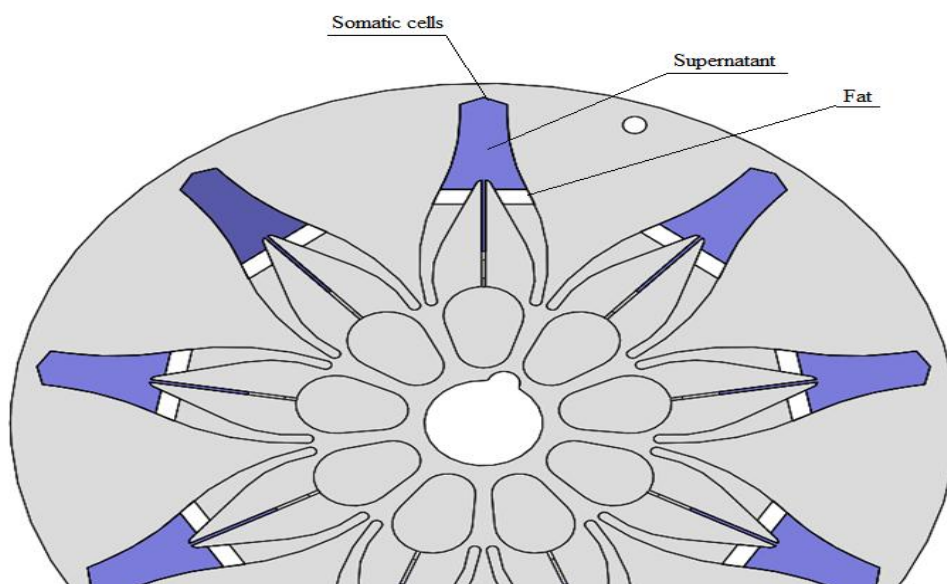
Фигура 23. СД-базирано устройство LACTOSCAN. (Отговаря на фигура 39 в дисертацията)

Флуоресцентният апарат се състои от две части – лява и дясна част. В лявата част на апарата в горната част се намира CD базиран микрофлуиден диск и около него микроцентрифужни епруветки. Пробите мляко се поставят в микроцентрифужните епруветки съдържащи лиофилизираното имобилизирано антитяло върху магнитни наночастици. При температура 37°C за 15 минути имобилизираното антитяло се свързва с антигена. Под CD базиран микрофлуиден диск има нагревател за поддържане на температурата. След това разтворът от микроцентрифужната епруветка се изтегля с микропипета и се поставя в една от камерките на CD базирания микрофлуиден диск намиращ се в лявата част на апарата. В камерките има лиофилизирани конюгати (DDVP-cBSA-FITC и параоксон-BSA-ATTO). Конюгатите се свързва със свободните сайтове на имобилизираното мулти-поликлонално антитяло за 15 минути. В зависимост от концентрацията на дихлорвоса и параоксона в пробата различно количество несвързани конюгати остават в разтвора. При висока концентрация на пестицидите в пробата, количеството на несвързаните конюгати е голямо и обратно.



Фигура 24. CD базиран микрофлуиден диск с камерки. (Отговаря на фигура 40 в дисертацията)

След това микрофлуидният диск се премества от лявата част на апарата в дясната част. Под диска е разположен магнит, който сепарира магнитните наночастици, а под магнита е разположена центрофуга и разтворът в камерките се центрофугира при 4000 RPM за 3min. Под действието на центробежните сили разтворът се разделя на 3 слоя – горен мазнини, среден супернатанта и долен соматични клетки. Под диска има два LED източници с определена дължина на вълната (494 nm и 620 nm). Този източници се пропускат през супернатантата и възбужда флуоресцентните багрила от конюгатите намиращи се в супернатантата.



Фигура 25. Центрофугиране и оформяне на три слоя в камерките - горен мазнини, среден супернатанта и долен соматични клетки. (Отговаря на фигура 41 в дисертацията)

Получава се два емисионни сигнала, които са пропорционални на концентрацията на двата пестицида в пробата. Чрез специален софтуер се разчита резултата и в цифров вид се изписва на таблото на апарата.

Този апарат е преносим и това ще осигури да се извършва непрекъснат контрол за пестициди в мляко на реално място, в млекосъбирателни пунктови и с това да се подобри здравославния начин на живот на населението.

ИЗВОДИ

1. Синтезирани са имуногените параоксон-BSA, дихлорвос-сBSA и са доказани чрез UV-Vis и FTIR анализи.
2. Получени са антитела с висок титър - анти-дихлорвос ($1:5.2 \times 10^5$), анти-параоксон ($1:4.5 \times 10^5$) и мулти-поликлонално ($1:4.5 \times 10^5$ спрямо конюгат DDVP-сBSA) и ($1:3.1 \times 10^3$ спрямо конюгат параоксон-BSA).
3. Разработен е индиректен конкурентен ELISA метод за индивидуално определяне концентрацията на параоксон и дихлорвос в краве мляко със следните аналитични характеристики: граница на откриване 0.008 ng/L параоксон; 0.006 ng/L DDVP; линеен интервал от 0.01 до 5 ng/L за двата пестицида.
4. Определени са оптималните условия за имобилизация на анти-дихлорвос, анти-параоксон и мулти-поликлонални антитела върху магнитните наночастици – концентрация на антителата 1 mg/mL и време за имобилизация 2 часа.
5. Установено е, че количеството на имобилизирано антитяло при определените оптимални условия за имобилизация е 22.6 μ g антитяло/ mg магнитни наночастици.
6. Получени са флуоресцентни конюгати дихлорвос-FITC; параоксон-FITC и параоксон-АТТО 620 и са доказани чрез UV-Vis и FTIR анализи.
7. Разработен е флуоресцентен имуноанализ на базата на функционализирани МНЧ за индивидуално определяне концентрацията на параоксон и дихлорвос в краве мляко със следните аналитични характеристики: граница на откриване 1.9 ng/L параоксон; 4.75 ng/L DDVP; линеен интервал 2-300 ng/L параоксон; 5-300 ng/L DDVP.
8. Определени са характеристиките на имуофлуоресцентен анализ за едновременно определяне на параоксон и дихлорвос в краве мляко с помощта на мултиполиклонално антитяло и конюгати маркирани с различни флуорофори, съответно: граница на откриване 3.5 ng/L параоксон; 4 ng/L DDVP; линеен интервал 5-300 ng/L и за двата пестицида.
9. Доказано е, че едновременният имуноанализ за параоксон и DDVP проведен с мулти-поликлоналното антитяло е с по-добра чувствителност в сравнение с резултатите получени при смесването на двете индивидуални имобилизирани антитела в еквивалентни количества, съответно:
 - при мулти-поликлоналното антитяло - граница на откриване 3.5 ng/L параоксон, 4 ng/L DDVP; линеен интервал 5-300 ng/L и за двата пестицида.

- при смесване на двете имобилизирани антитела - граница на откриване 7.5 ng/L параоксон, 8 ng/L DDVP и линеен интервал 10-400 ng/L за двата пестицида.
10. Установено е, че матричният ефект на млякото оказва съществено влияние върху характеристиките на получените имунофлуоресцентните анализи, например при овче мляко границата на откриване е 2 пъти по-висока, а линейният интервал се измества към по-високи концентрации.

Научно-приложни приноси

1. Синтезирани са нови имуногени и са произведени нови поликлонални антители срещу параоксон и дихлорвос.
2. Създаден е нов имунофлуоресцентен метод за индивидуално определяне на пестициди на базата на анти-дихлорвос и анти-параоксон антителя.
3. Разработен е нов мулти-имунофлуоресцентен метод за едновременно определяне на пестициди на базата на мулти-поликлонално антитяло и различно маркирани конкурентни конюгати.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯТ ТРУД

1. Yaneva M., Y. Ivanov, and T. Godjevargova (2017) Preparation of Polyclonal Antibodies with Application for an Organophosphorus Pesticide Immunoassay, *Analytical Letters*, 50, 1307-1324. Импакт фактор 1.150
2. Yaneva M., Y. Ivanov, N. Todorov, and T. Godjevargova (2017) Magnetic-nanoparticles-based fluorescent immunoassay for individual and simultaneous determination of dichlorvos and paraoxon in milk, *Food and Agricultural Immunology*, 1-16. Импакт фактор 1.392
3. Marina Yaneva, Yavor Ivanov, Tzonka Godjevargova (2017) Simultaneous immunofluorescence assay of paraoxon and dichlorvos based on magnetic nanoparticles, *RICCCE 2017 20th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering*, Poiana Brasov, Romania, изпратена.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ И НАУЧНИ СЕСИИ

1. Научна конференция с международно участие на Русенски университет “Ангел Кънчев“ – филиал Разград, 2015 г.
2. *RICCCE 2017 20th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering* - 6-9 September 2017, Poiana Brasov, Romania.