



РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный
Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»
ФГБУ «ВГНКИ»



**РАЗРАБОТКА СКРИНИНГОВЫХ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СОДЕРЖАНИЯ ГЛИФОСАТА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ В
КОРМАХ И КОРМОВОМ СЫРЬЕ С ПОМОЩЬЮ
ЭКСПРЕССНЫХ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ**

Бакай Кристина Александровна
аспирант ФГБУ «ВГНКИ»
н.с. отдела безопасности пищевой и кормовой
продукции.

Научный руководитель: к.х.н., Нестеренко И. С.

Рецензент: д.х.н., проф. Ерёмин С. А.

Рецензент: к.б.н., Козеичева Е. С.





- 1. Фамилия, имя, отчество:** Бакай Кристина Александровна
- 2. Направление подготовки:** 36.06.01 «Ветеринария и зоотехния»
- 3. Направленность программы (профиль):** 06.02.03 «Ветеринарная фармакология с токсикологией»
- 4. Форма обучения:** очная.
- 5. Квалификация:** Исследователь. Преподаватель-исследователь.
- 6. Дата зачисления:** «30» августа 2019 г. (приказ о зачислении № 313 от «30» августа 2019 г.).
- 7. Срок окончания аспирантуры:** «01» сентября 2022 г.
- 8. Тема научно-исследовательской работы:** «Разработка скрининговых методик определения содержания глифосата и его метаболитов в кормах и кормовом сырье с помощью экспрессных иммунохимических методов»
- 9. Научный руководитель:** Нестеренко Ирина Сергеевна, к. х. н., заместитель заведующего отделом безопасности пищевой и кормовой продукции ФГБУ «ВГНКИ»
- 10. Решение Ученого совета ФГБУ «ВГНКИ» о рассмотрении и рекомендации к утверждению темы, протокол № 4 от «28» ноября 2019 г.**

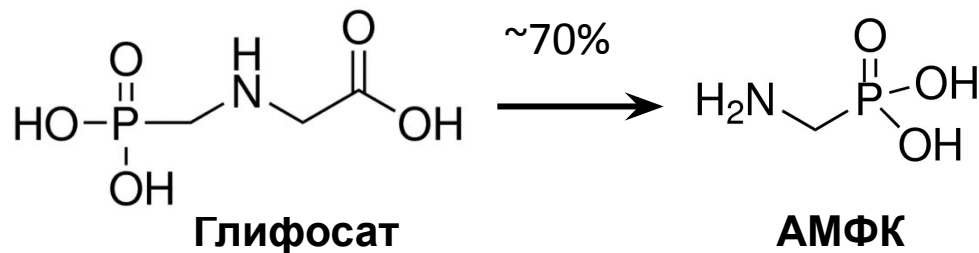


Введение

Глифосат – это широкодиапазонный неизбирательный гербицид, используемый для борьбы с однолетними и многолетними сорняками при выращивании сельскохозяйственных культур (в том числе ГМО, содержащими ген устойчивости к глифосату).

Считается, что, благодаря толерантности ГМО растений к глифосату, они обладают к нему большей ёмкостью, т.е. способны накапливать его в больших количествах, передавая концентрации вверх по пищевой цепочке к конечному потребителю.

Аминотилфосфоновая кислота (АМФК) – метаболит глифосата, обладает гербицидным действием, токсическое действие на человека в несколько раз сильнее, чем самого глифосата.





Актуальность темы исследования

В марте 2015 года IARC, основываясь на опубликованных данных экспериментальных и эпидемиологических исследований, пришло к выводу, что глифосат является «возможным канцерогеном для человека» (категория опасности «2А»).

Следовательно, необходимо контролировать корма на основе генно-модифицированных продуктов на предмет содержания данного гербицида и его метаболитов, чтобы в дальнейшем избежать его попадания в продукцию животноводства.

МДУ [ТР ТС 015/2011 «О безопасности зерна»]:
подсолнечник (семена), кукуруза (зерно) - 0,3 мг/кг;
зерно хлебных злаков - 3,0 мг/кг;
рис, соя (бобы) - 0,15 мг/кг.
ПДК [СанПиН 1.2.3685-21]:
питьевая вода – 0,02 мг/л.



Степень разработанности темы исследования

Методы контроля глифосата

Арбитражные методы

ВЭЖХ с
флуоресцентным
детектированием

ВЭЖХ с масс-
спектрометрическим
детектированием

Преимущества

- ✓ Высокая чувствительность;
- ✓ Высокая селективность.

Недостатки

- Дорогостоящее оборудование;
- Трудоемкая и длительная процедура подготовки проб.

МУ А-1/043 Методические указания по определению глифосата и продуктов его метаболизма в кормах и кормовом сырье

**Подходят для подтверждения наличия и определения количественного содержания
аналита в образце**



Методы контроля глифосата

Скрининговые методы

*Иммуноферментный анализ
(ИФА)
(коммерческая тест-система
иностранного производства)*

*Поляризационный
флуоресцентный иммуноанализ
(ПФИА)*

Ингибиторный анализ

Преимущества

- ✓ Не требуют дорогостоящего оборудования;
- ✓ Непродолжительное время анализа;
- ✓ Высокая специфичность и чувствительность

Недостатки

- Более низкая селективность

Подходят для выявления потенциально несоответствующих образцов



Цели и задачи работы

Цель - разработка экспрессных методик для скринингового определения содержания глифосата и его метаболитов в кормах, кормовом сырье и объектах окружающей среды на основе ингибиторного анализа, ИФА и ПФИА.

Задачи:

- синтезировать конъюгаты глифосата с белками-носителями;
- синтезировать производные глифосата и АМФК с флуоресцентными метками;
- иммунизировать кроликов конъюгатами глифосата с белками-носителями и получить специфические поликлональные сыворотки;
- охарактеризовать полученные антисыворотки на активность и специфичность в иммунохимических методах (ИФА и ПФИА);
- оптимизировать условия проведения иммунохимической реакции для ИФА и ПФИА;
- разработать способы подготовки образцов кормов, кормового сырья для определения содержания глифосата и АМФК методами ИФА и ПФИА;
- провести оптимизацию условий для проведения ингибиторного анализа.



Определение глифосата методом иммуноферментного анализа

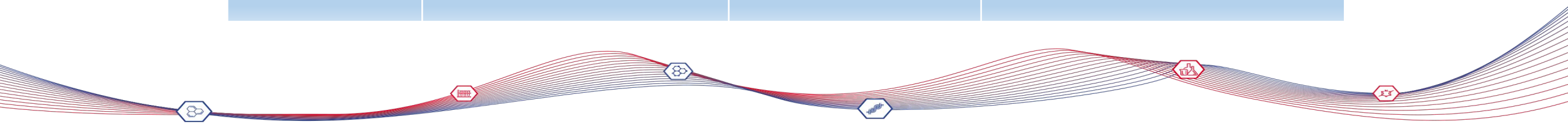
Проблемы, связанные с определением глифосата

- Маленькая молекулярная масса (169 г/моль) - нельзя использовать в качестве иммуногена
- Цвиттер-ионная структура
- Слабые гидрофобные свойства
- Быстрый процесс метаболизма до АМФК



Синтез конъюгатов глифосата с белками-носителями

Конъюгат	Метод синтеза	Соотношение гаптен-белок	Функция
ГЛИ-ГЛУ	Карбодиимидный	30000:1	Иммуноген/ Твердофазный антиген
ГЛИ-БСА	Карбодиимидный	100:1	Иммуноген/ Твердофазный антиген
ГЛИ-сБСА	Активированных эфиров	10:1	Твердофазный антиген
ГЛИ-гл-БСА	С глутаровым альдегидом	100:1	Иммуноген
ГЛИ- ОВА	Карбодиимидный	10:1	Твердофазный антиген





Получение поликлональных кроличьих сывороток

Первая схема

№ сыворотки	№ иммунизации	Иммуноген	Доза АГ, мкг/кролика	Адъювант	Взятие крови
127–129	1	глифосат– ГЛУ	100	ПАФ в ФР	-
	2		100	НАФ в ФР	1
	3		50		2
	4		50		3
	5		20		4



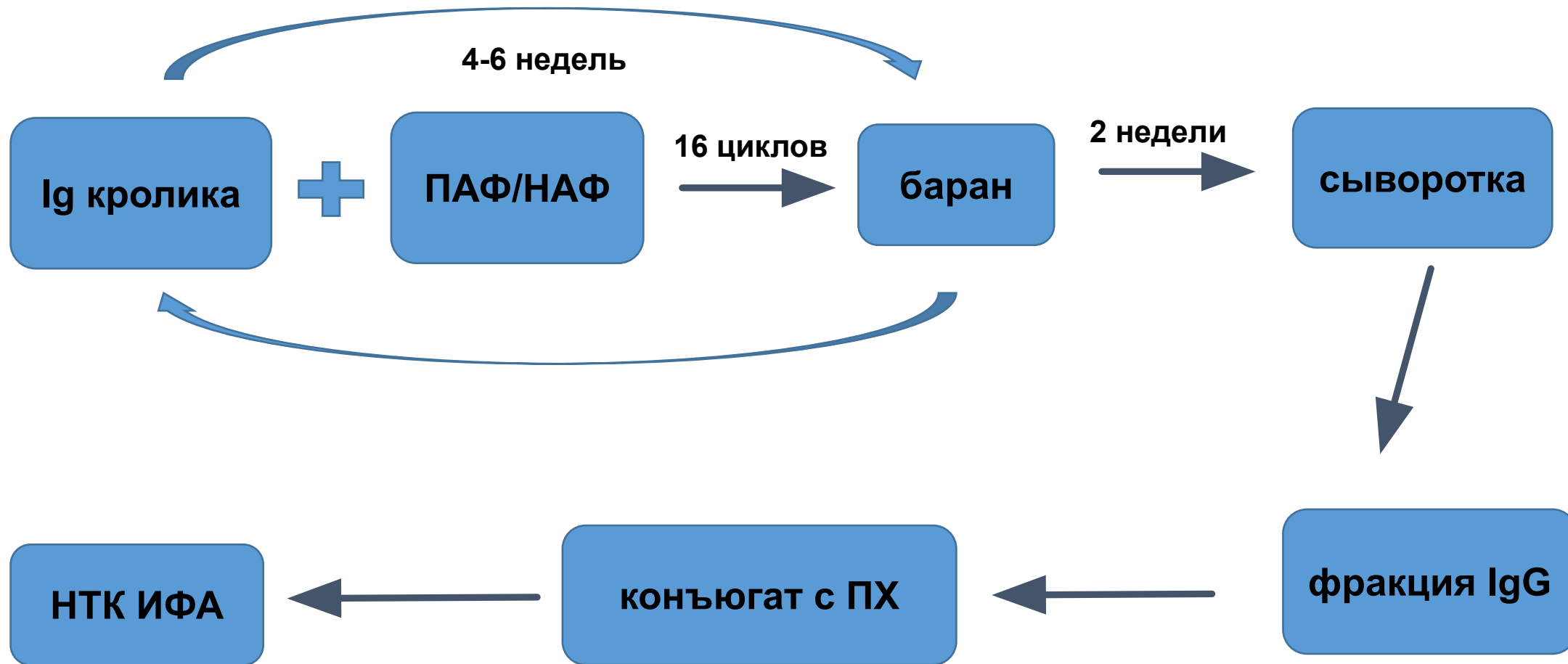
Получение поликлональных кроличьих сывороток

Вторая схема

№ сыворотки	№ иммунизации	Иммуноген	Доза АГ, мг/кролика	Метод введения	Адъювант	Взятие крови
1	1	глифосат-БСА	2	подкожно	ПАФ в ФР	-
	2		1	внутривенно	ФР	-
	3		1	внутривенно		-
	4		1	внутривенно		1
	5		1	внутривенно		-
	6		1	внутривенно		-
	7		1	внутривенно		2
	...		1	внутривенно		...
2	1	Глифосат-гл-БСА	2	подкожно	ПАФ в ФР	-
	2		1	внутривенно	ФР	-
	3		1	внутривенно		-
	4		1	внутривенно		1
	5		1	внутривенно		-
	6		1	внутривенно		-
	7		1	внутривенно		2
	...		1	внутривенно		...



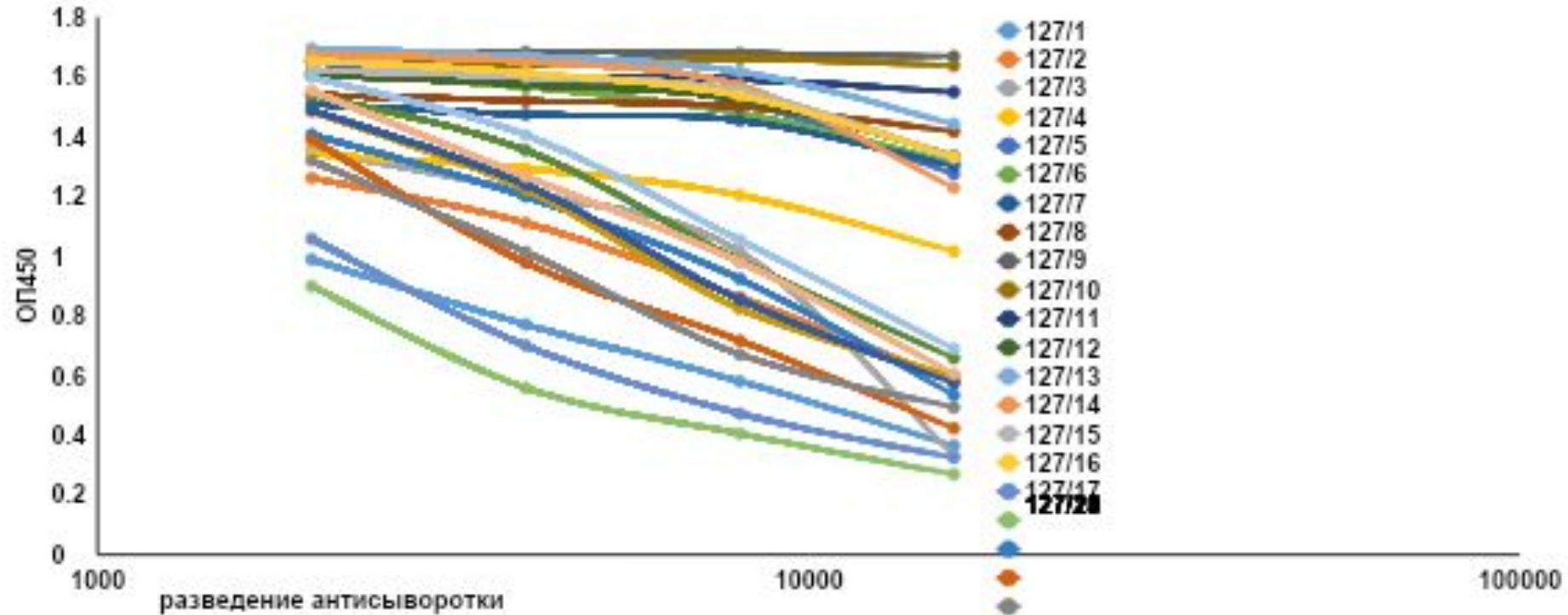
Получение диагностических антител, меченных пероксидазой хрена





Оптимизация условий постановки НТК ИФА

Характеристика антисывороток

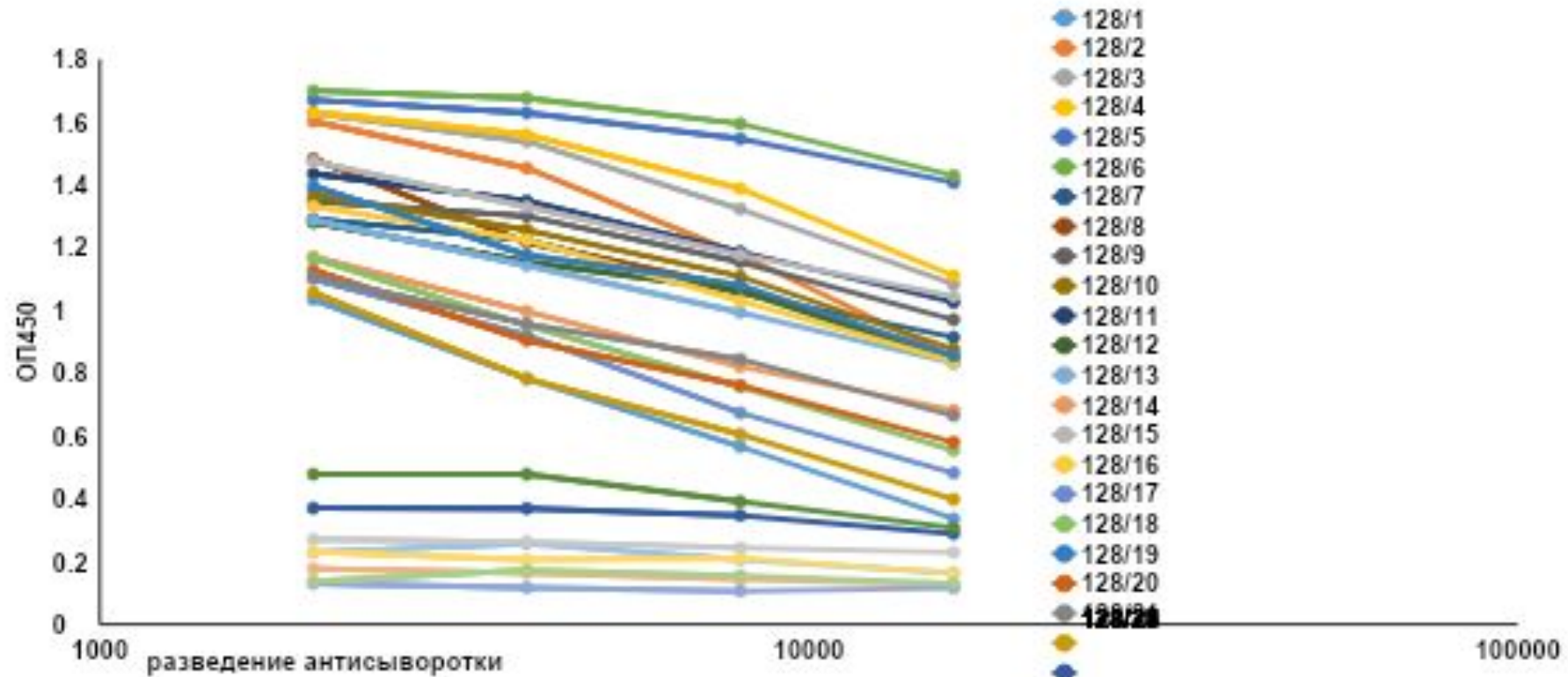


Кривые титрования антисывороток от кролика № 127
на антигене ГЛИ-БСА



Оптимизация условий постановки НТК ИФА

Характеристика антисывороток

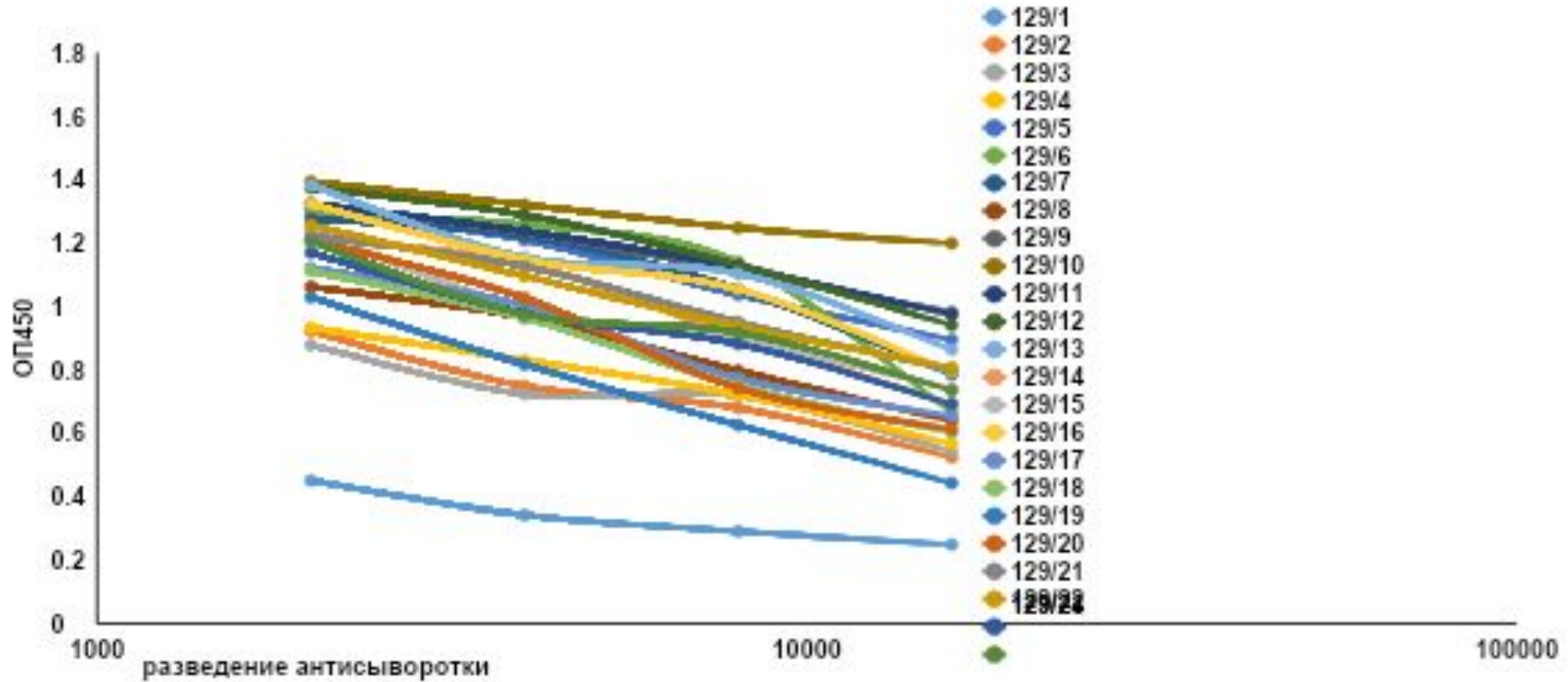


Кривые титрования антисывороток от кролика № 128
на антигене ГЛИ-БСА



Оптимизация условий постановки НТК ИФА

Характеристика антисывороток

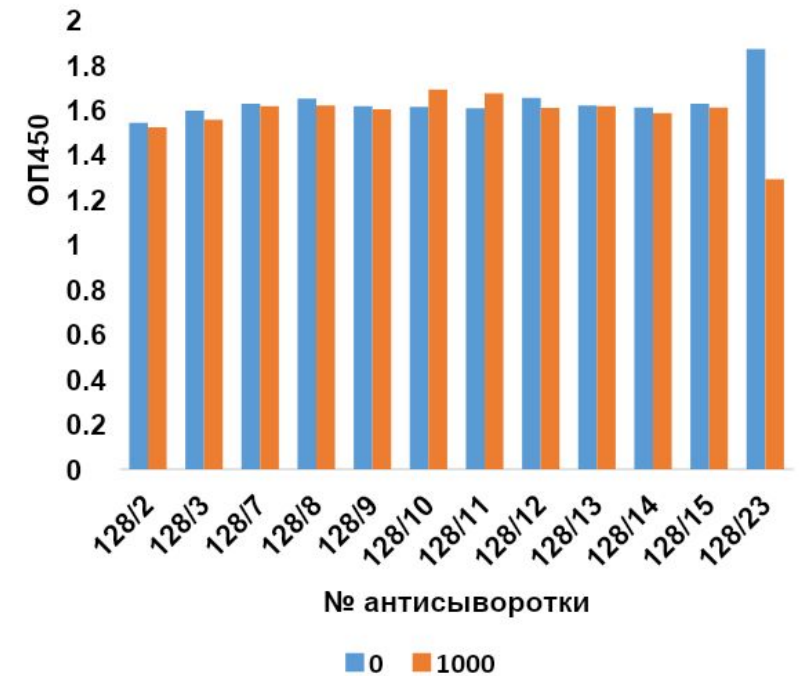
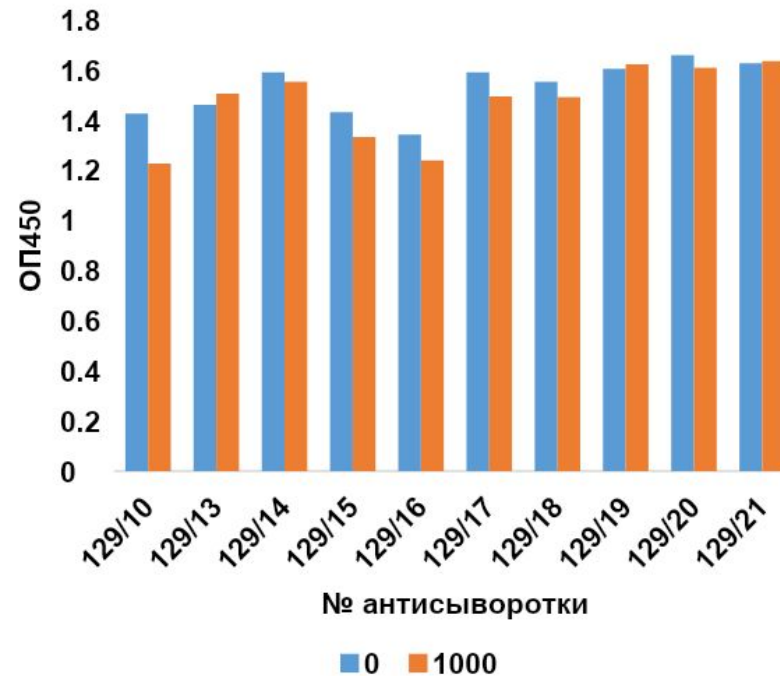
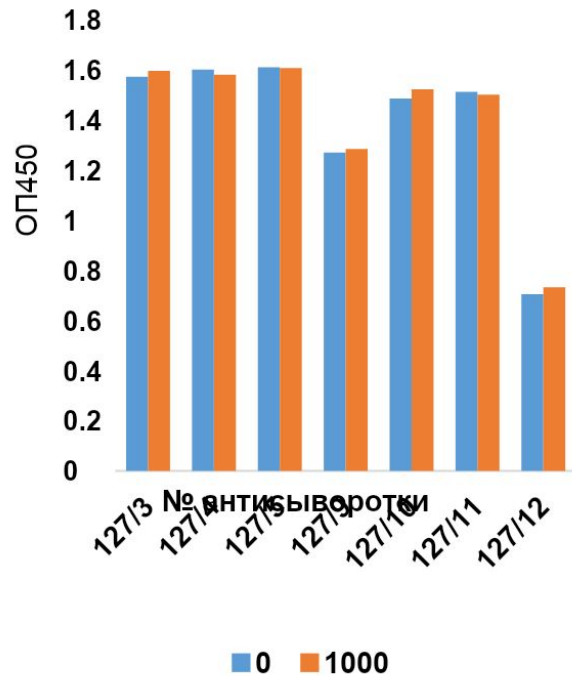


Кривые титрования антисывороток от кролика № 129
на антигене ГЛИ-БСА



Оптимизация условий постановки НТК ИФА

Характеристика антисывороток

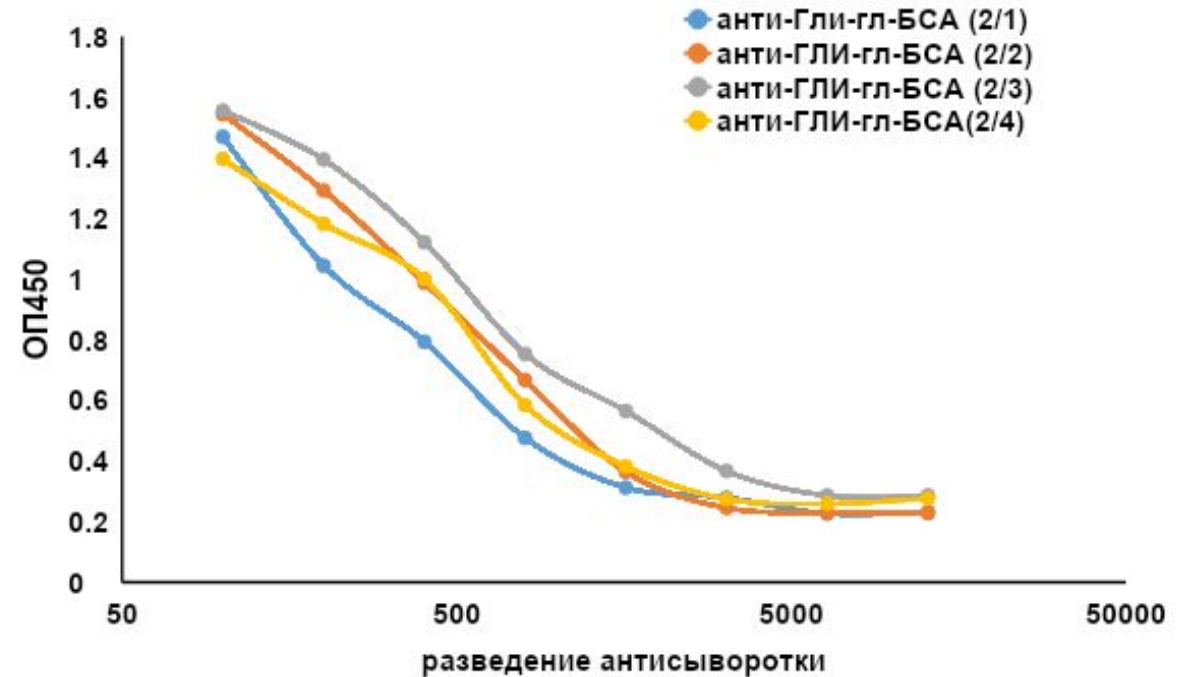
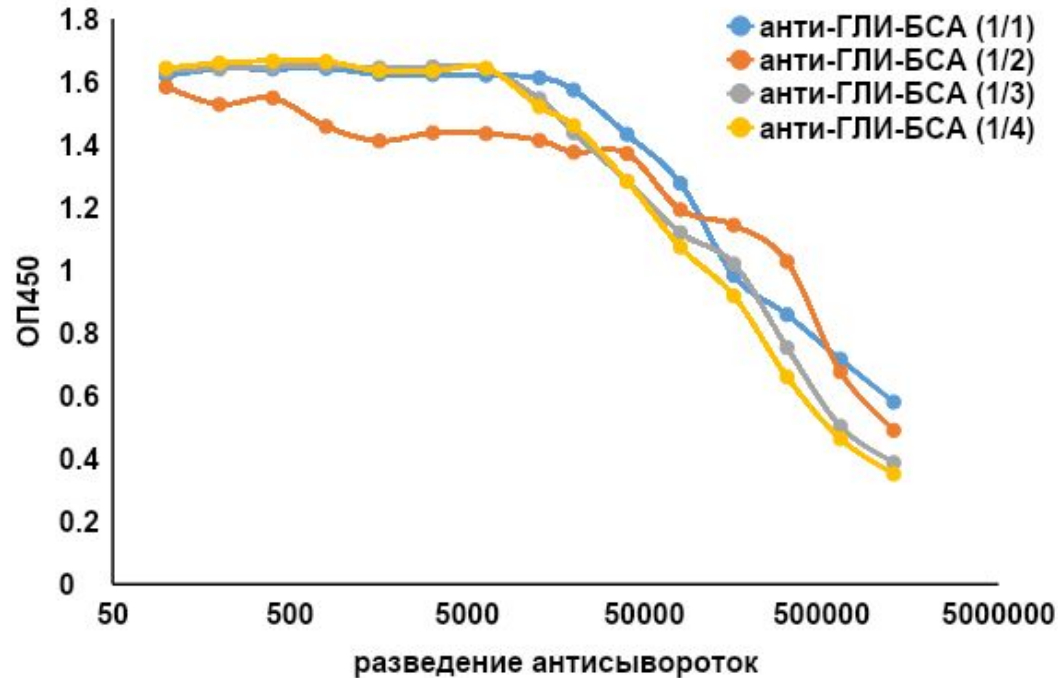


Характеризация антисывороток на предмет конкуренции с глифосатом.
Твердофазный антиген: ГЛИ-БСА



Оптимизация условий постановки НТК ИФА

Характеристика антисывороток



Кривые титрования антисывороток, полученных по второй схеме иммунизации.
Твердофазный антиген: ГЛИ-сБСА.

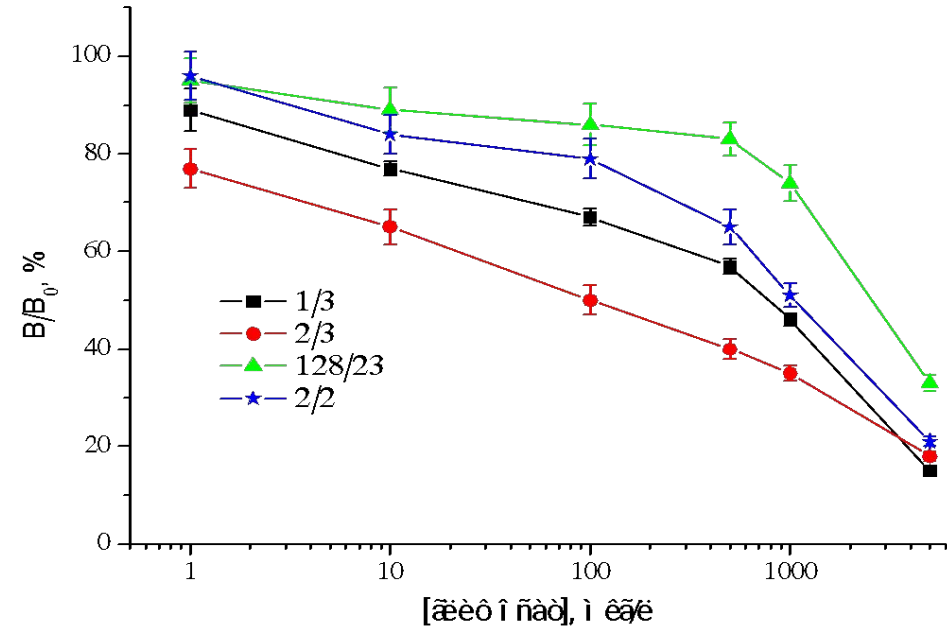


Оптимизация условий постановки ИФА

Характеристика антисывороток

№ антисыворотки	IC ₅₀ , мкг/л
2/3	99,7
1/3	772,8
2/2	1059,2
128/23	2588,1

Чувствительность антисывороток



Градуировочные графики, полученные для антисывороток 1/3, 2/3, 2/2 и 128/23

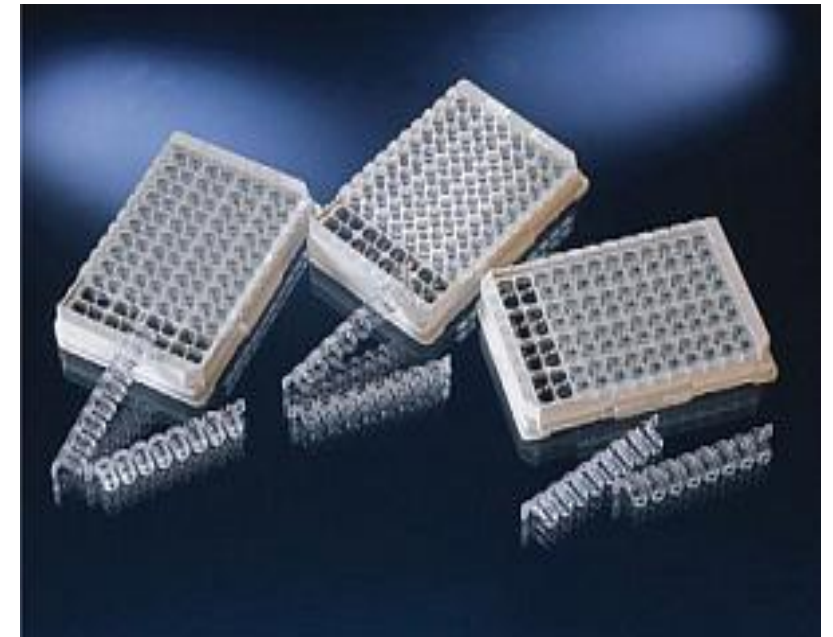
В ИФА использовали сыворотку № 2/3, отобранную после 3 циклов иммунизации в рабочем разведении 1/300.



Оптимизация условий построения градуировочного графика

Влияние марки планшетов на результаты ИФА

Марка планшеты	IC ₅₀ , мкг/л	КВ, %
Greiner	99,7	7,1
Costar	101,6	8,6
Nunc	105,4	7,9

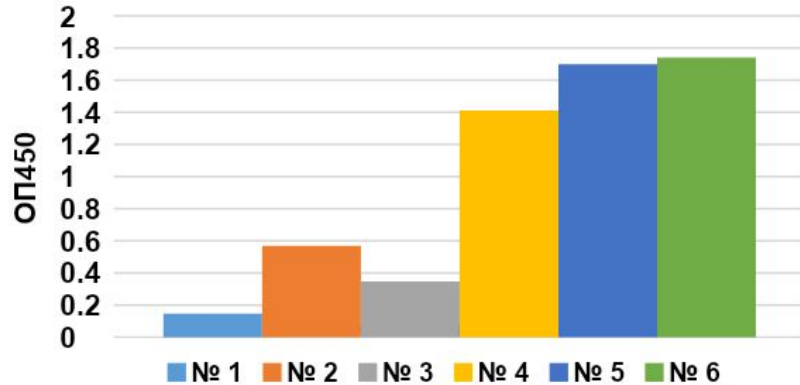


Для проведения определения глифосата методом ИФА
возможно использование планшет любой из
представленных выше марок.



Оптимизация условий сенсбилизации полистирольных планшет

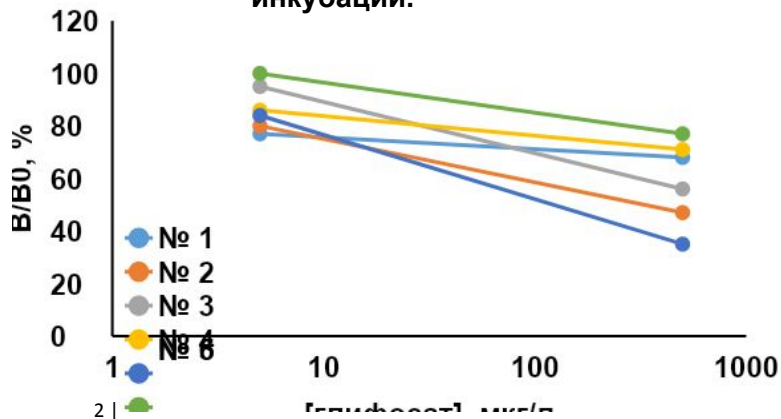
Влияние времени и температуры инкубации с поликлональными сыворотками и антивидовым ферментным конъюгатом



При оптимизации времени экспозиции твердофазного антигена с антисыворотками и ферментным конъюгатом тестировали шесть различных режимов:

- 1) 30 минут инкубации со смесью поликлональных антител и ФК;
- 2) 60 минут инкубации со смесью поликлональных антител и ФК;
- 3) 120 минут инкубации со смесью поликлональных антител и ФК;
- 4) 60 минут инкубации с поликлональными антителами и 30 минут с ФК;
- 5) 60 минут инкубации с поликлональными антителами и 60 минут с ФК;
- 6) 120 минут инкубации с поликлональными антителами и 60 минут с ФК.

Зависимость оптической плотности бланкового раствора от режима инкубации.



Определение чувствительности анализа при различных режимах инкубации



Оптимизация условий постановки НТК ИФА

Температура, °С	Время, ч	IC ₅₀ , мкг/л	s(x), мкг/л	КВ, %
4	16	99,5	16,5	16,6
37	2	110,5	32,9	29,8

Буфер	IC ₅₀ , нг/мл	s(x), нг/мл	КВ, %
ФСБТ-БСА	100,1	12,3	12,3
ТРИС-БСА	150,6	20,2	13,4

Зависимость чувствительности метода от температуры сенсibilизации планшет твердофазным конъюгатом.

Зависимость чувствительности метода от состава рабочего буфера.



Оптимизация условий постановки НТК ИФА

Влияние состава блокирующего раствора и условий экспозиции с ним на чувствительность метода.

Блокирующий буфер	Режим сорбции	КВ, %	IC ₅₀ , мкг/л N=3 P=0.95	ОП ₄₅₀ (бланкового раствора)
ГК в КББ	1,5 ч 25 °С	9	99,7	1,215
	1 ч 37 °С	7	101,1	1,548
ГК в ФСБ	1,5 ч 25 °С	13	110,5	1,348
	1 ч 37 °С	10	125,3	1,205
БСА в КББ	1,5 ч 25 °С	21	125,8	1,789
	1 ч 37 °С	17	114,2	2,022
БСА в ФСБ	1,5 ч 25 °С	24	150,5	1,605
	1 ч 37 °С	27	119,9	1.655

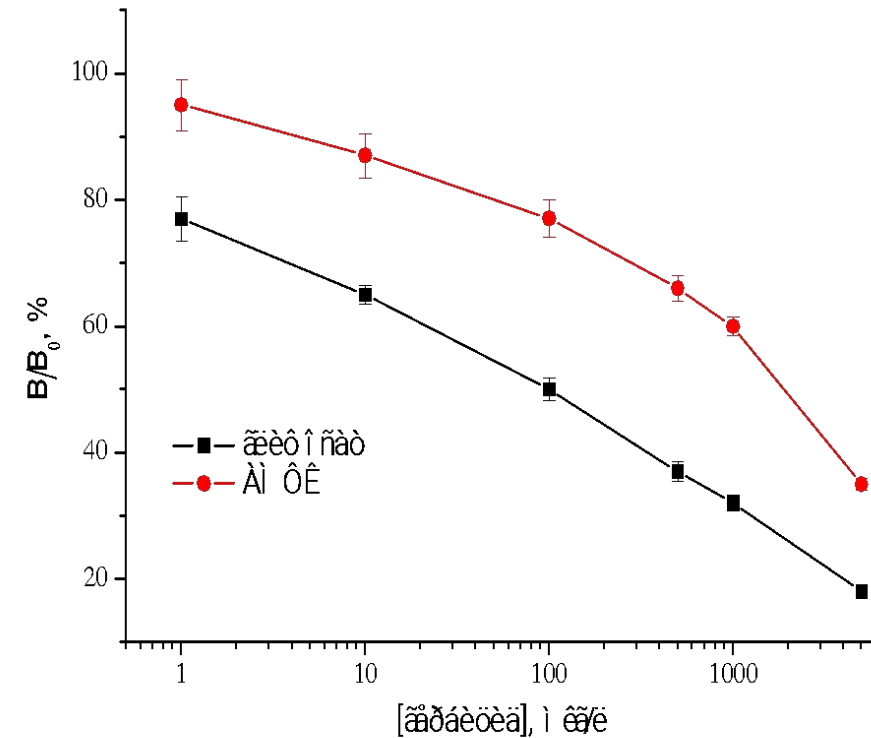


Определение специфичности НТК ИФА для определения глифосата

Специфичность метода

АГ	IC ₅₀ , нг/мл	Перекрёстное связывание, %
глифосат	99,9	100
АМФК	1905,1	5,2
глюфосинат	>100000	<0.1

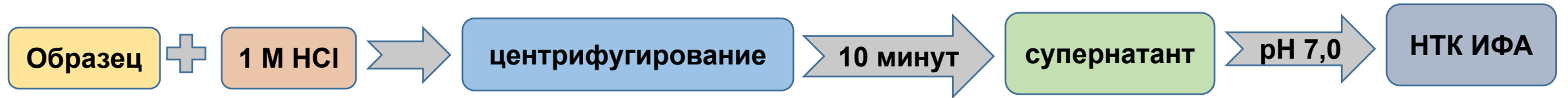
Предлагаемая методика НТК ИФА позволяет определять глифосат с высокой специфичностью.



Градуировочные графики для определения глифосата и АМФК



Анализ реальных объектов



Степень извлечения глифосата из сои

Введенная концентрация, мкг/кг	Найденная концентрация, мкг/кг n = 3 P = 0,95	Степень извлечения, %
0	не обнаружено	–
100	82 ± 15	82
500	390 ± 70	78
2000	1620 ± 292	81
5000	4250 ± 765	85



Определение глифосата методом иммуноферментного анализа

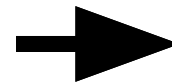
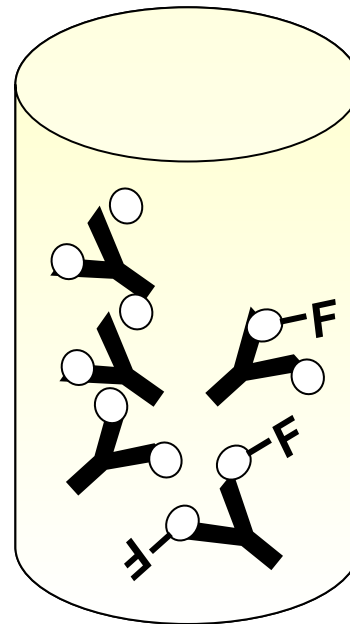
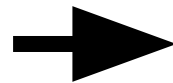
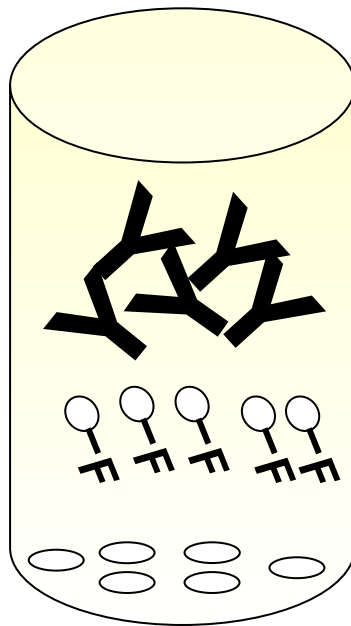
Таким образом, было установлено, что наиболее чувствительные градуировочные кривые для определения глифосата получены с применением следующих иммунореагентов:

- антисыворотки № 2/3 в разведении 1/300, полученной на введение ГЛИ–гл–БСА, с ФК на основе пероксидазы и Ig барана после 17 циклов иммунизации и твердофазным антигеном ГЛИ–сБСА;
- при подготовке проб необходимо применять для экстракции 1 М соляную кислоту с целью повышения степени извлечения глифосата из сои;
- предел количественного определения глифосата в сое составил 10 мкг/кг;
- диапазон определяемых концентраций 10–5000 мкг/кг.



Разработка методики поляризационного флуоресцентного иммуноанализа для определения глифосата

ПФИА относится к гомогенным методам анализа. Метод основан на конкуренции антигена в образце и антигена, меченного флуоресцентной меткой (трейсера), за ограниченное число центров связывания антител.



$$P = \frac{I_V - I_H}{I_V + I_H}$$

измерение

Y - антитела

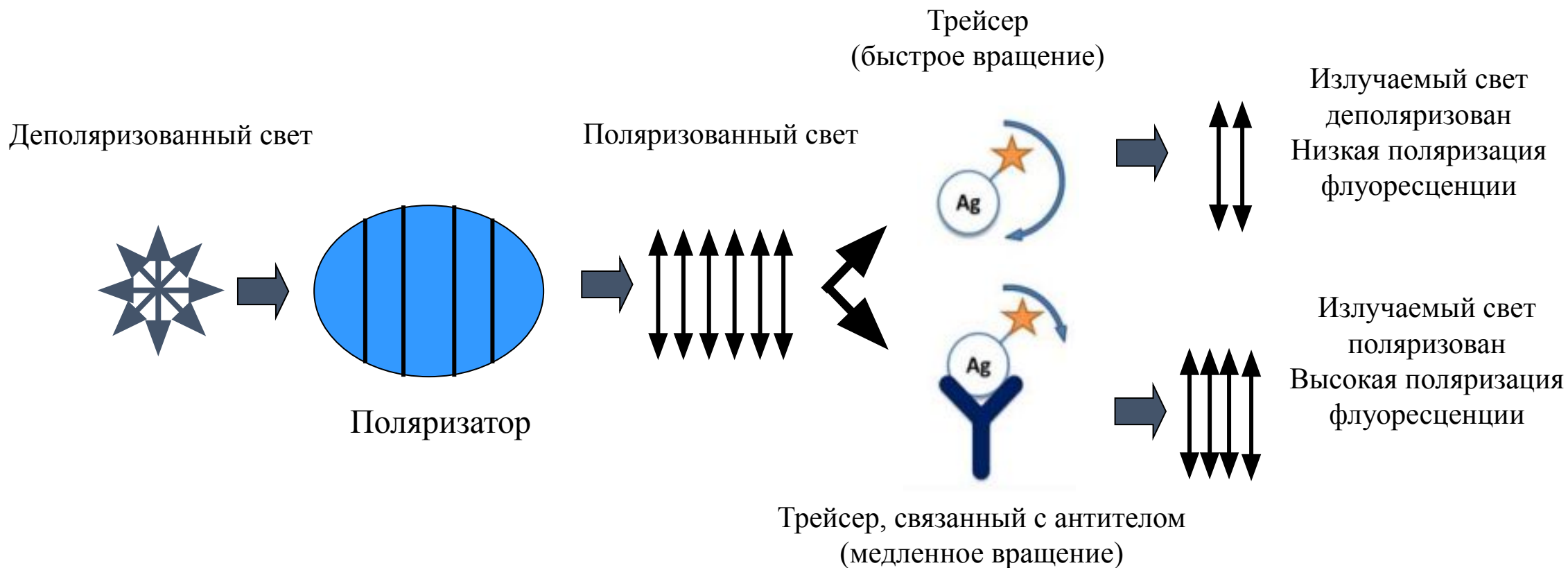
○-F - трейсер

○ - антиген



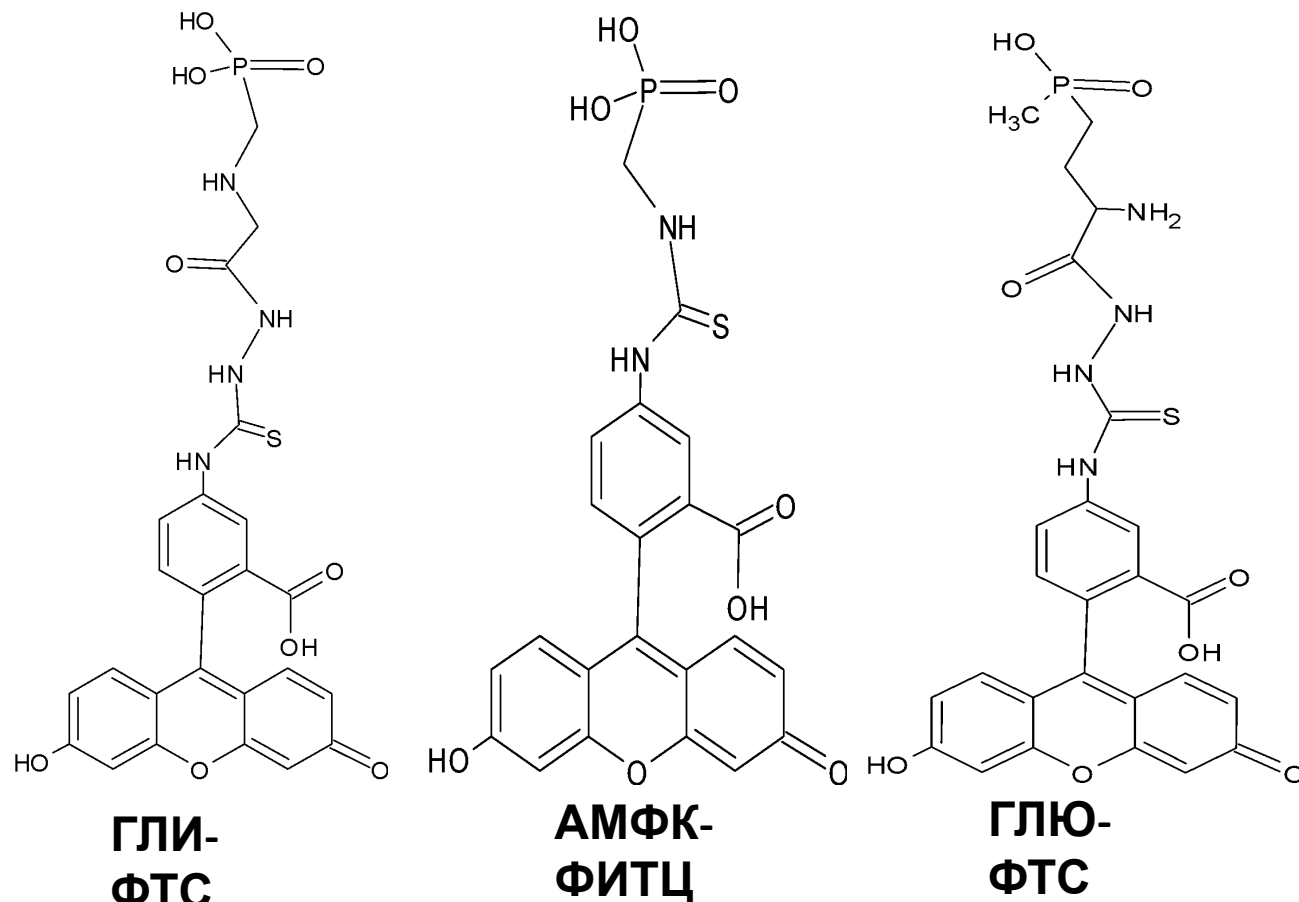
Принцип ПФИА

Образование иммунного комплекса детектируется путём измерения поляризации флуоресценции. Значение поляризации возрастает при связывании меченого антигена с антителами. Величина поляризации прямо пропорциональна количеству связанного трейсера, что позволяет разработать количественный анализ на исследуемый антиген.





Синтез и очистка трейсеров



Структурные формулы трейсеров

Результаты очистки трейсеров методом ТСХ

Трейсер	Полосы, полученные после разделения методом ТСХ
АМФК-ФИТЦ	Rf 0,1 Rf 0,9
ГЛИ-ФТС	Rf 0,1 Rf 0,5
ГЛЮ-ФТС	Rf 0,1 Rf 0,5

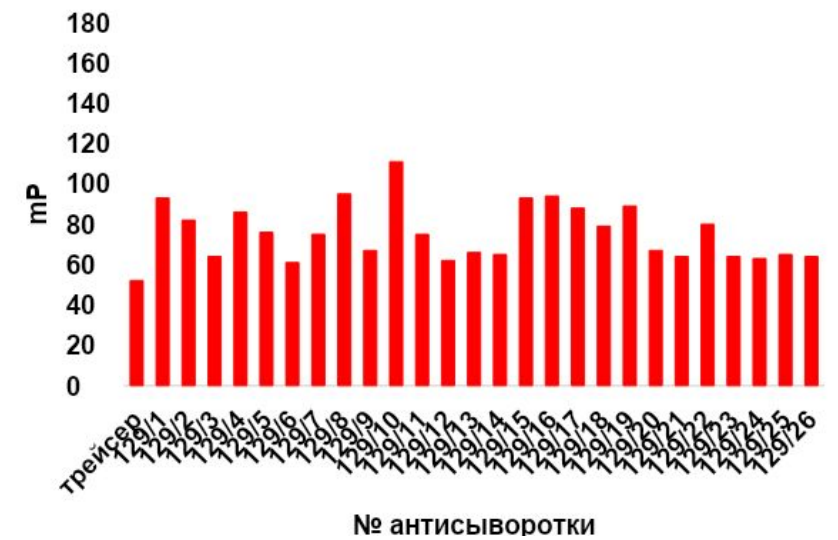
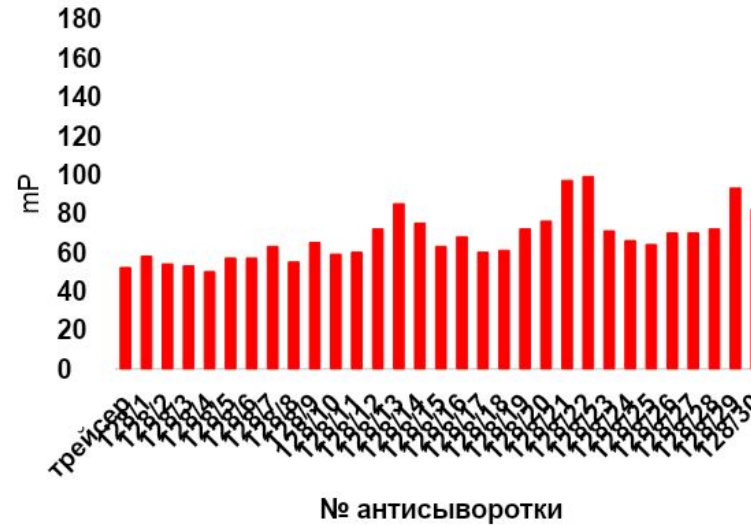
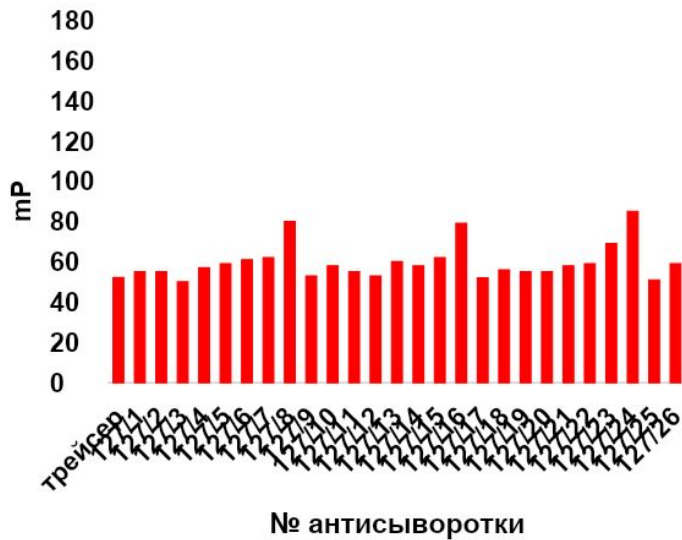
Разделенные вещества были смыты с носителя метанолом и проверены на активность с полученными антисыворотками.

Полосы, полученные из реакционных смесей трейсеров ГЛИ-ФТС Rf 0,5, ГЛЮ-ФТС Rf 0,1 и АМФК-ФИТЦ Rf 0,1, обладали очень низким значением интенсивности флуоресценции и в дальнейших экспериментах не использовались.

В качестве рабочих были выбраны концентрации трейсеров, соответствующие 10-кратному превышению сигнала фона: 1/5000 – для АМФК-ФИТЦ (Rf 0,9) и 1/500 – для ГЛИ-ФТС и ГЛЮ-ФТС.



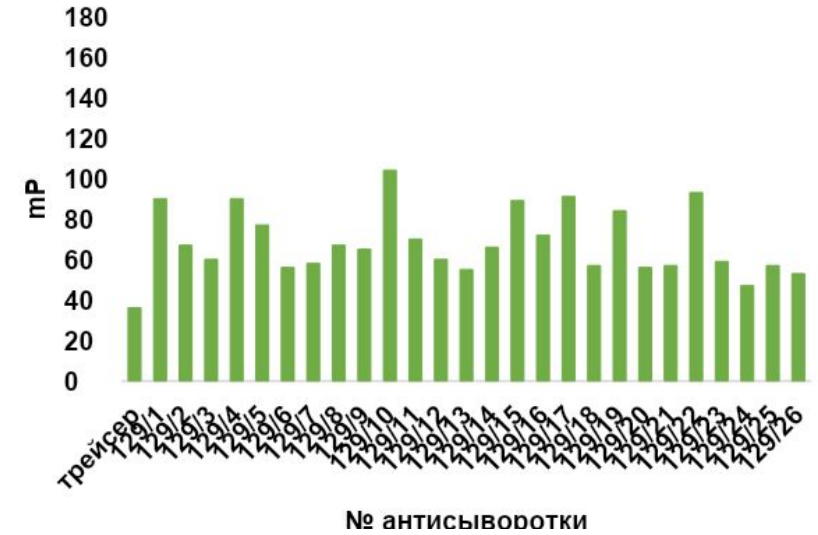
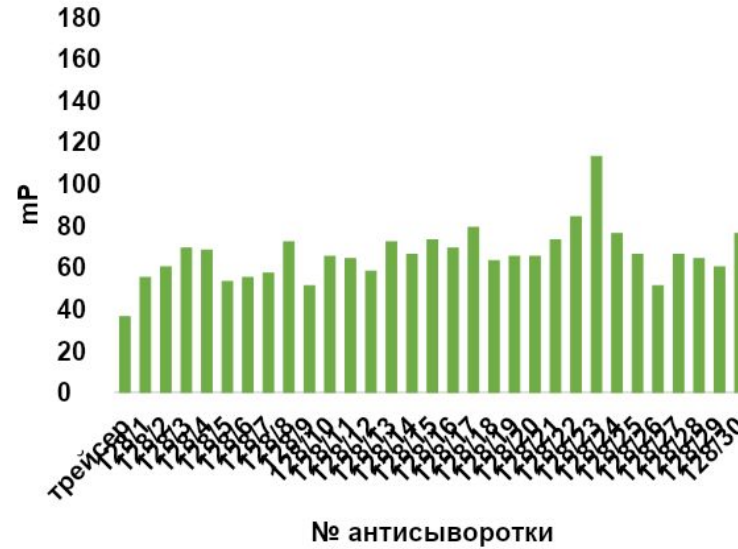
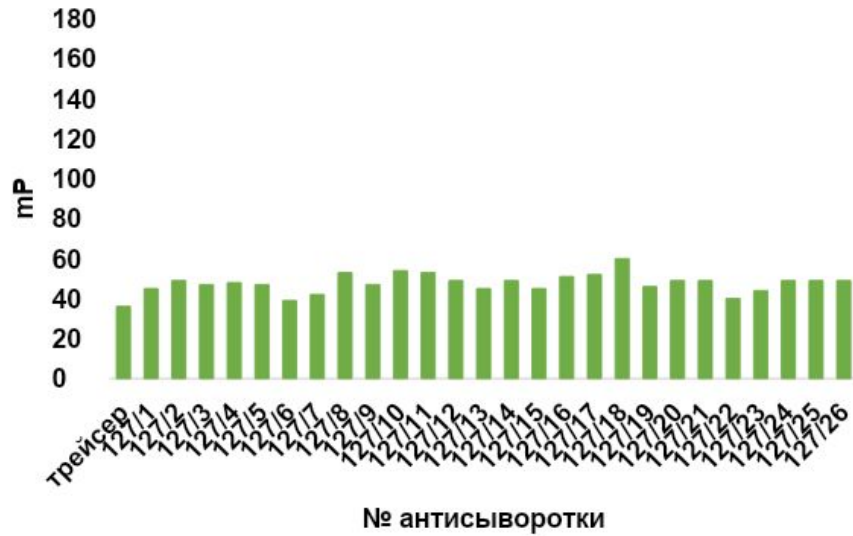
Тестирование антисывороток методом ПФИА и построение градуировочных зависимостей



Тестирование трейсера ГЛИ-ФТС (Rf 0.1) на предмет связывания с антисыворотками анти-ГЛИ-ГЛУ



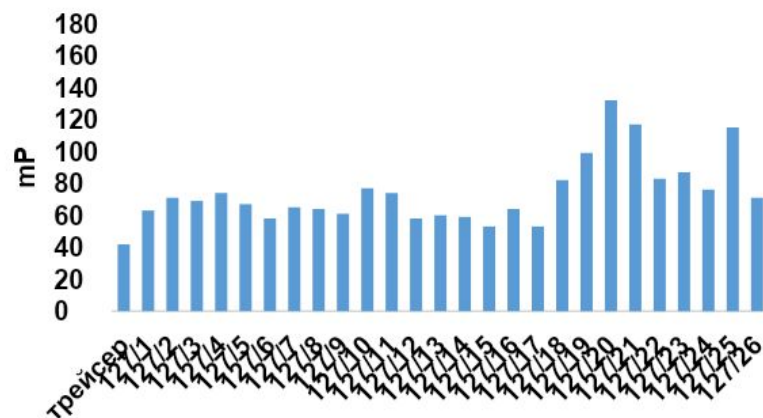
Тестирование антисывороток методом ПФИА и построение градуировочных зависимостей



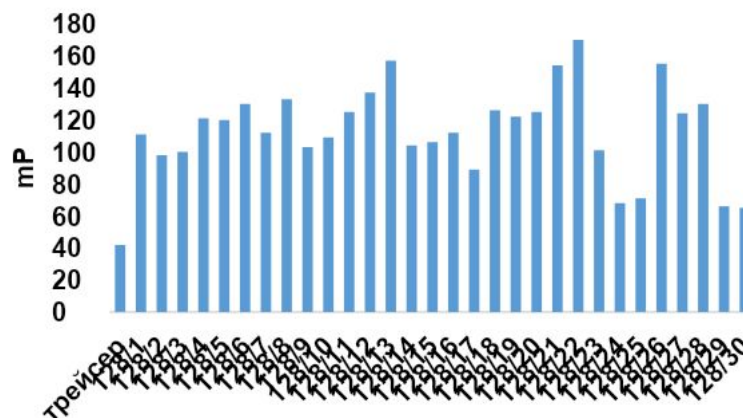
Тестирование трейсера ГЛЮ-ФТС (Rf 0.5) на предмет связывания с антисыворотками анти-ГЛИ-ГЛУ



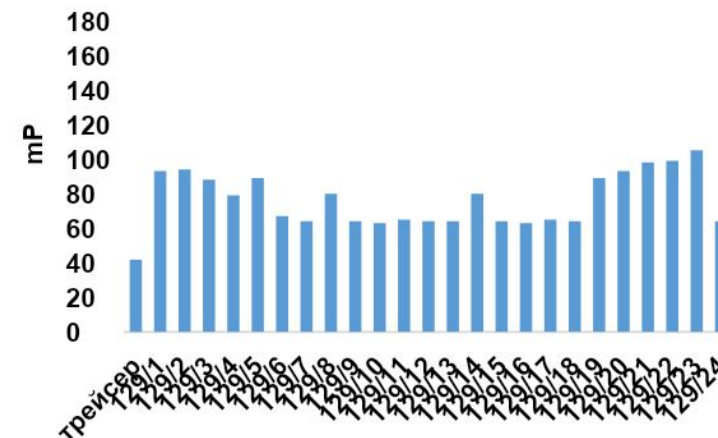
Тестирование антисывороток методом ПФИА и построение градуировочных зависимостей



№ антисыворотки



№ антисыворотки



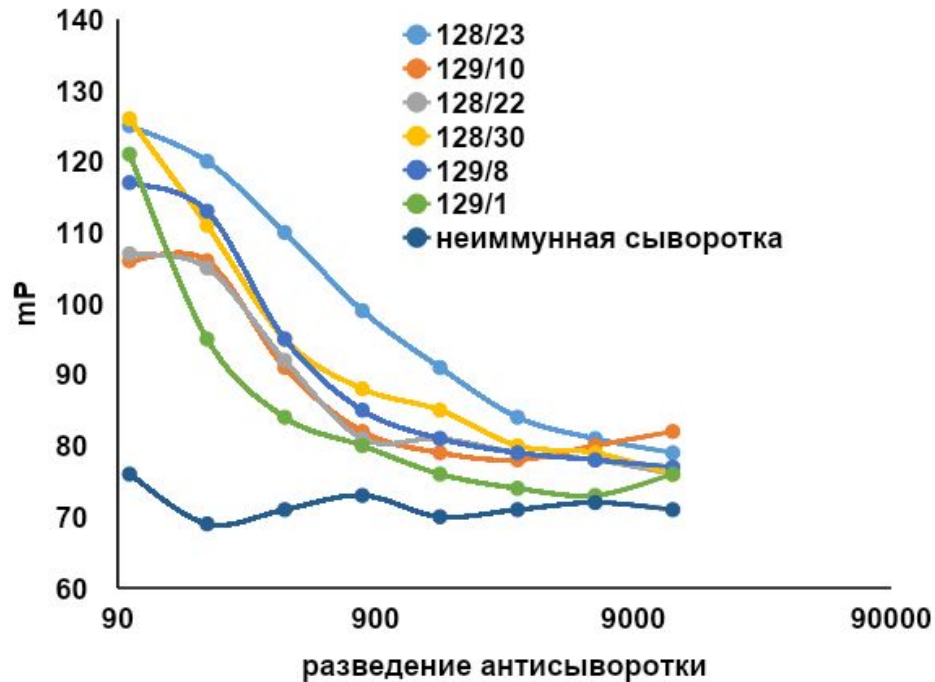
№ антисыворотки

Тестирование трейсера АМФК-ФИТЦ (Rf 0.9) на предмет связывания с антисыворотками анти-ГЛИ-ГЛУ

Добавление антисывороток серий 128/1-128/30 и 129/1-129/26 вызвало повышение значения поляризации флуоресценции по сравнению с раствором свободного трейсера только для **АМФК-ФИТЦ**, поэтому для дальнейших экспериментов был выбран этот трейсер.



Тестирование антисывороток методом ПФИА и построение градуировочных зависимостей



Значение титров антител

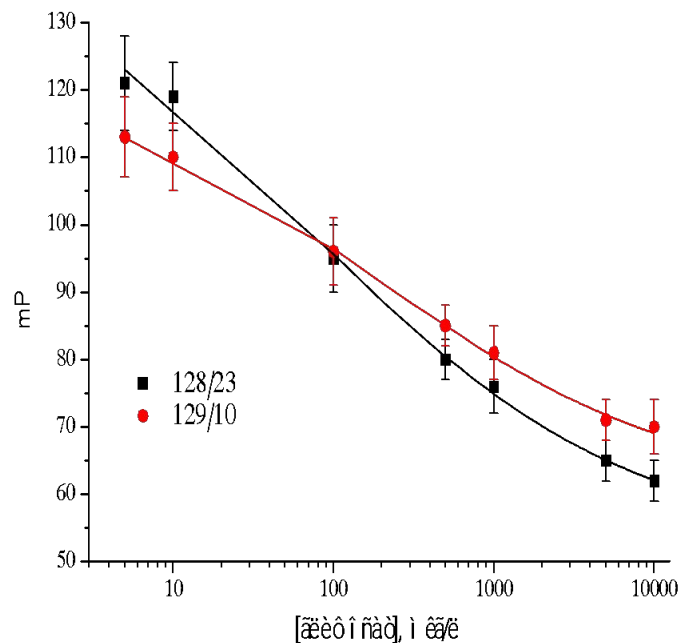
№ антисыворотки	Титр
128/23	1/2000
128/22	1/800
128/30	1/1000
129/1	1/500
129/8	1/1000
129/10	1/800

Кривые титрования антисывороток
трейсером АМФК-ФИТЦ (Rf 0,9)



Тестирование антисывороток методом ПФИА и построение градуировочных зависимостей

Аналитические параметры градуировочных графиков



№ антисыворотки	Предел количественного определения, мкг/л N=10 P=0.95	IC ₅₀ , мкг/л N=10 P=0.95	Линейный диапазон определяемых содержаний, мкг/кг
128/23	22,6 ± 3,4	515,1 ± 77,3	23–4000
129/10	32,1 ± 4,8	1100,3 ± 165,0	32–4000

Калибровочные кривые для выбранных сывороток

Для дальнейшей работы была выбрана антисыворотка 128/23 в разведении 1/500



Определение специфичности метода

Специфичность предлагаемого метода проверяли, используя в качестве аналита ближайшие аналоги глифосата: аминометилфосфоновую кислоту и глюфосинат. Для этого измеряли поляризацию флуоресценции для нескольких концентраций аналита, строили графики зависимости, по которым определяли концентрацию 50% связывания (IC_{50}), и рассчитывали показатель перекрестного связывания как отношение концентрации ГЛИ, обеспечивающей 50% связывание АТ, к концентрации других аналитов, выраженное в процентах.

Аналит	IC_{50} , нг/см ³	Перекрестное связывание, %
Глифосат	520,5	100
АМФК	> 10 000	< 0,1
Глюфосинат	> 10 000	< 0,1



Использование разработанной методики для определения содержания глифосата в кормовой продукции

Оптимизация условий пробоподготовки

Экстракционные буферы:

- фосфатный буфер;
- боратный буфер;
- 1 М соляная кислота.

Разведение образцов:

- в 5;
- в 10;
- в **20 раз.**

Условия подготовки:

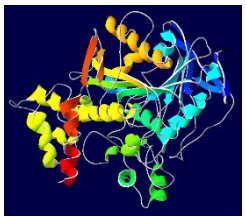
- перемешивание;
- центрифугирование,
- ультразвуковая баня

Разработанную методику применили для определения остаточного содержания глифосата в кормовой продукции на примере соевых бобов.

Введенная концентрация глифосата, мкг/кг	Значение поляризации флуоресценции	Найденная концентрация глифосата по градуировочному графику, мкг/л	Найденная концентрация глифосата с учетом коэффициента разведения, мкг/кг	Процент открытия, %
600	105	34 ± 6	680	113
2400	92	135 ± 24	2700	112
6000	83	377 ± 68	7540	126

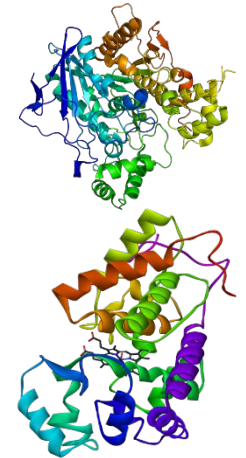


Разработка методики определения глифосата в питьевой воде методом ингибиторного анализа



Ферменты, используемые для обнаружения пестицидов:

- ацетилхолинэстераза,
- бутирилхолинэстераза,
- щелочная фосфатаза,
- фосфорорганическая гидролаза,
- тирозиназа,
- **пероксидаза хрена (ПХ).**



Косубстраты для ПХ:

- гидрохинон,
- о-фенилендиамин,
- **ТМБ.**

Субстрат:

перекись водорода

Преимущества метода,

основанного на ингибировании ферментов:

- требует минимального объема реагентов/образцов;
- быстрая скорость реакции;
- не требует сложного оборудования.



Разработка методики определения глифосата в питьевой воде методом ингибиторного анализа

Задача - изучить возможность применения анализа природных вод на содержание глифосата на основе ингибирования пероксидазы хрена.

Принцип методики: расчёт активности пероксидазы хрена в отсутствии и присутствии глифосата путем измерения оптической плотности.

В работе было протестировано **три формата измерения**:

1. Весь анализ проводился в 96-луночных планшетах
2. Реакция ингибирования проводилась в пробирках типа Эппендорф с последующим измерением активности в 96-луночных планшетах
3. Реакция ингибирования и реакция превращения субстрата проводились в 15 мл полипропиленовых пробирках с последующим измерением оптической плотности в кварцевых кюветах спектрофотометра.



Оптимизация условий проведения ингибиторного анализа

Оптимизация условий проведения ферментативной реакции (восстановления перекиси водорода)

Подбор оптимальной концентрации фермента

Форматы измерения:

- в кюветах;
- в 96-луночных планшетах.

Косубстрат:

ТМБ (0,5 мМ);

Субстрат:

H_2O_2 (0,25 мМ).

Ингибирующего вещества:

глифосат (5 мкг/л)

Реакционная среда:

цитратно-фосфатный буфер (рН 5,0)

Останавливающий реагент:

серная кислота (0,5 М).

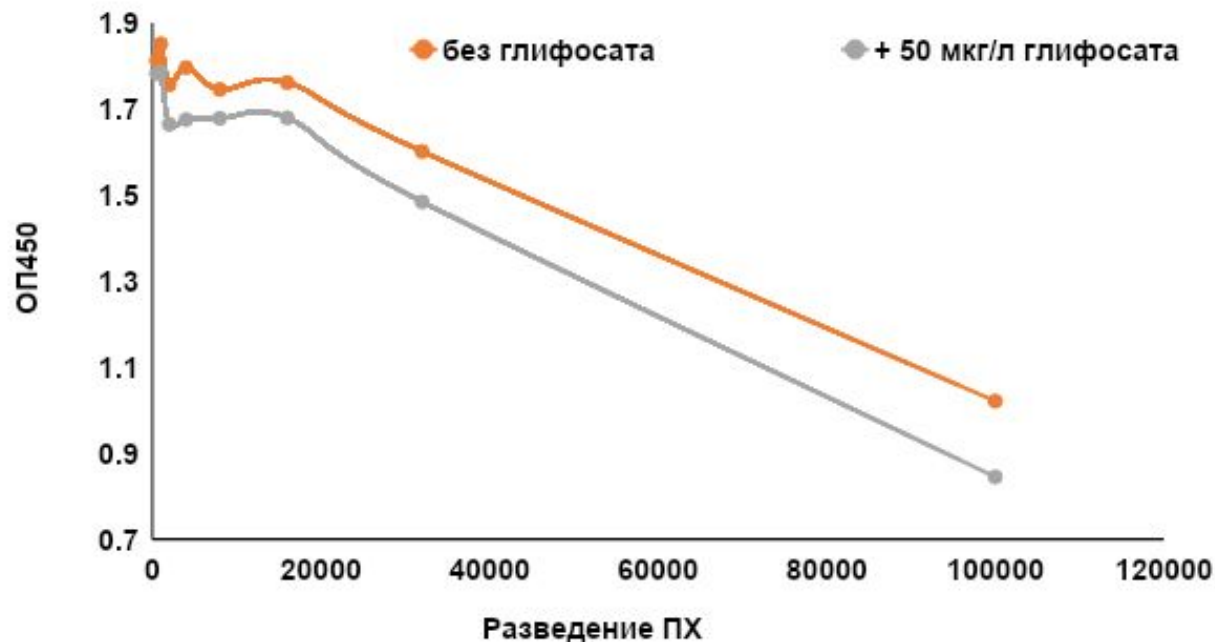
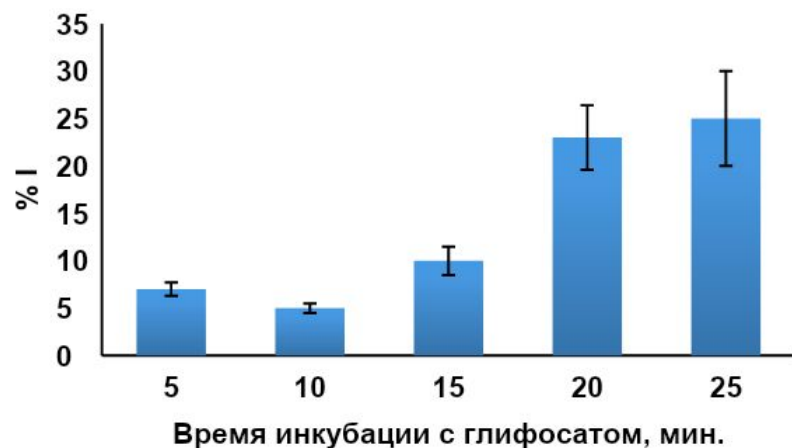


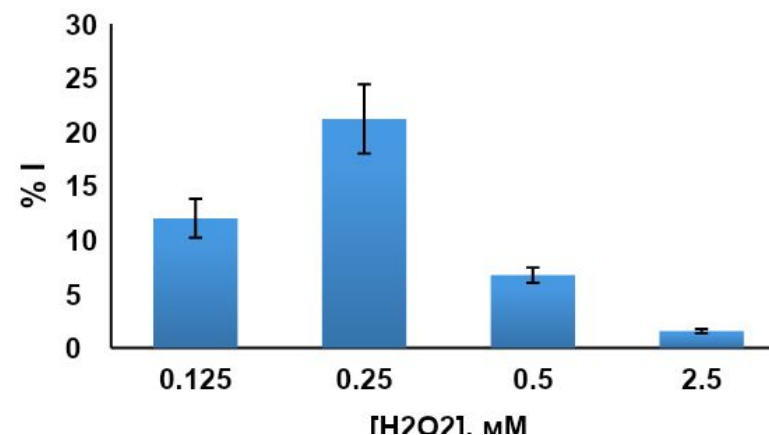
График зависимости ОП от разведения ПХ при проведении ферментативной реакции в присутствии и отсутствии глифосата.



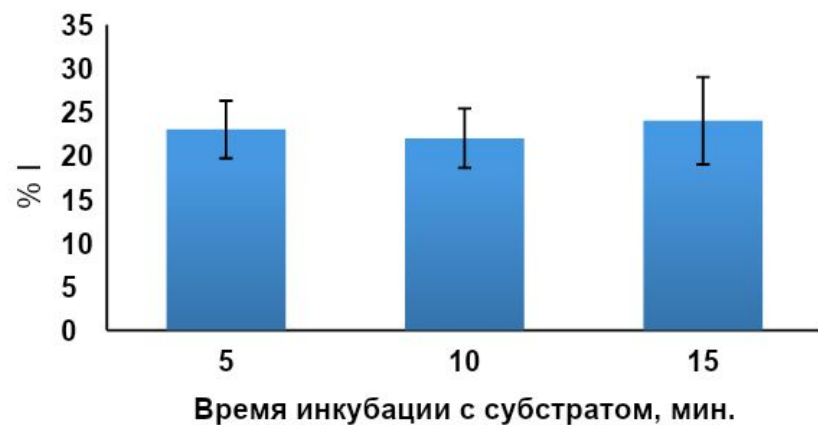
Оптимизация условий проведения ингибиторного анализа



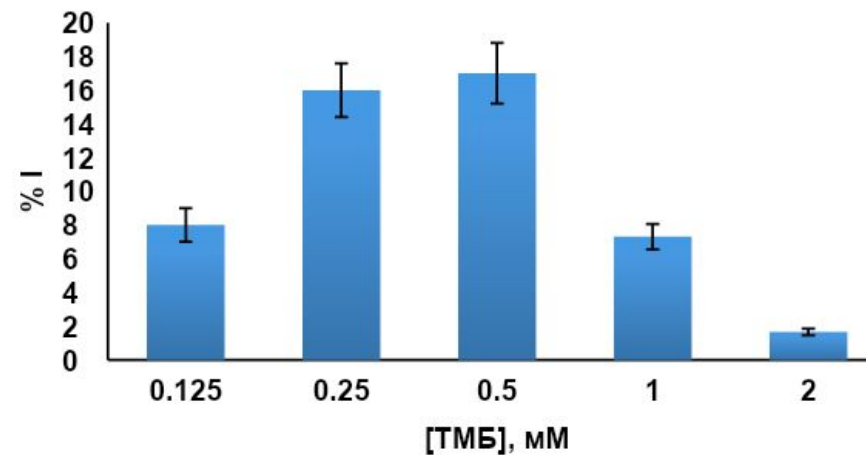
Выбор времени инкубации ПХ с глифосатом



Выбор оптимальных концентраций перекиси водорода



Подбор оптимального времени инкубации с субстратом



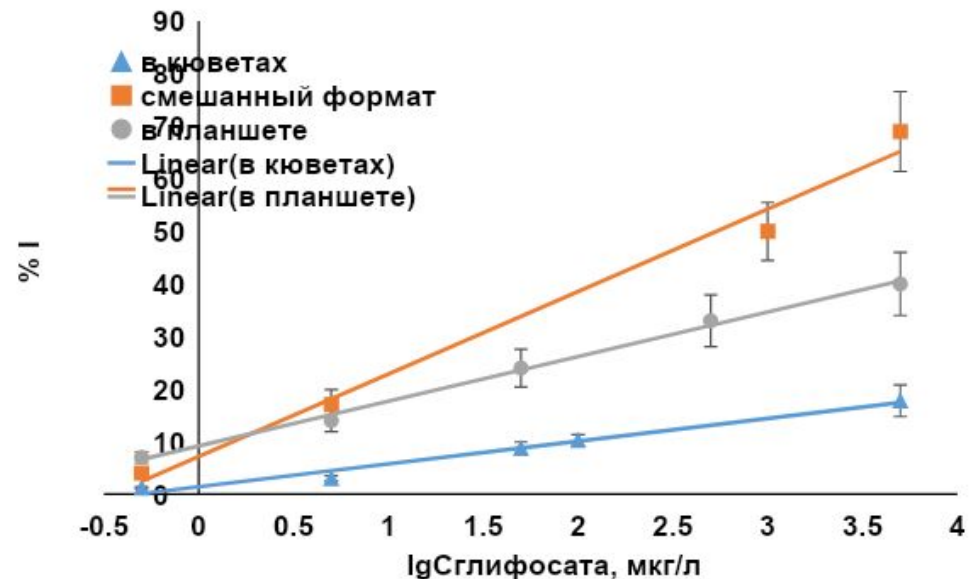
Выбор оптимальных концентраций ТМБ



Оптимизация условий проведения ингибиторного анализа

Были протестированы три формата измерения:

- 1) Реакции ингибирования и ферментативная реакция проводились в полипропиленовых пробирках на 15 мл. Измерение оптической плотности проводилось в кюветах;
- 2) Реакция ингибирования проводилась в полипропиленовых пробирках на 1,5 мл с последующим переносом реакционной смеси в лунки планшета, где проводилась ферментативная реакция и измерялась ОП (смешанный формат);
- 3) Все этапы анализа проводились в лунках планшета.



Параметры линейных зависимостей, рассчитанных по методу наименьших квадратов ($y=ax+b$) и пределы обнаружения и количественного определения

Формат анализа	R ²	a	b	Предел обнаружения,	Предел количественного
				мкг/л	определения, мкг/л
В кюветах	0,980	4,332	1,421	95,5	1362,4
Смешанный	0,986	15,700	7,145	1,5	3,2
В планшете	0,996	8,500	9,159	1,3	4,9



Анализ воды

В результате были выбраны следующие условия проведения анализа:

Реакция ингибирования проводится в течение 20 минут;

Концентрации ТМБ и перекиси водорода составили 0,5 мМ и 0,25 мМ соответственно;

Время инкубации с рабочим раствором субстрата – 5 минут.

Значение рН для исследуемых образцов воды

№ образца	рН
1	7,1
2	7,1
3	7,2
4	7,1
5	7,3
6	7,1
7	6,4
8	6,5
9	5,1
10	4,4

Контрольные образцы:

образец №9 - дистиллированная вода

образец №10 - деионизованная вода.

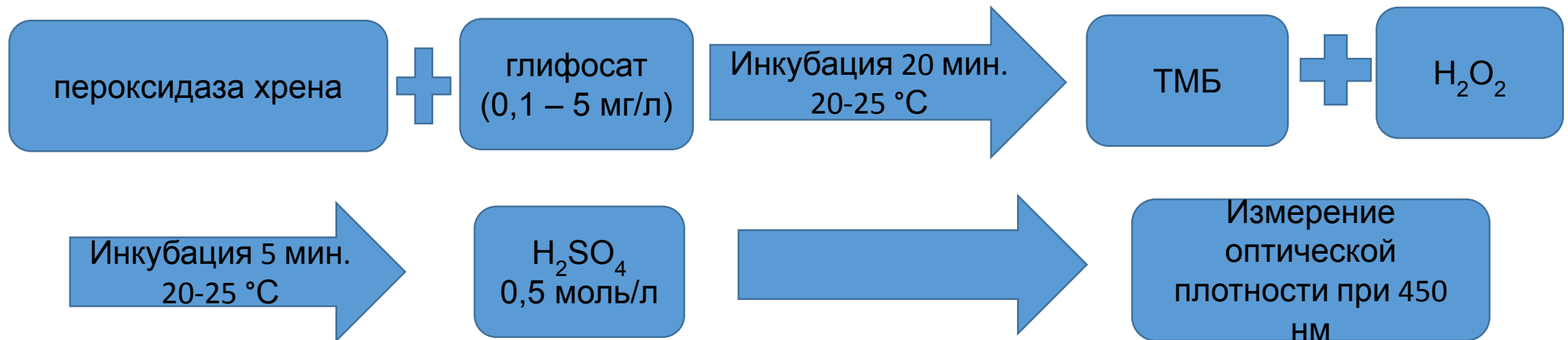
Уровни загрязнения глифосатом:

10 мкг/л, 100 мкг/л и 1000 мкг/л.



Методика эксперимента

Сначала пероксидазу хрена и глифосат (0,5 – 5000 мкг/л), растворенные в цитратно-фосфатном буфере с рН 5,0, инкубировали в течение 20 мин. Далее добавляли растворы 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и H_2O_2 и инкубировали в течение времени ферментативной реакции 5 мин. После этого добавляли стоп-раствор H_2SO_4 0,5 моль/л и получали поглощение при 450 нм за время считывания 2 мин.





Затем рассчитывали процент ингибирования в соответствии с уравнением :

$$\%I = \frac{(I_0 - I_1)}{I_0} \times 100\%,$$

где %I - процент ингибирования,

I_1 - значение оптической плотности в присутствии глифосата,

I_0 - значение оптической плотности в отсутствии глифосата

Процент ингибирования может принимать значения от 0%, когда ингибирование отсутствует, до значений 100%, когда фермент полностью ингибируется глифосатом.



Результаты теста на открытие в реальных образцах воды

Предел количественного определения - 3,2 мкг/л.

Продолжительность анализа - 35 минут.

№ образца	Введено, мкг/л	Найдено, мкг/л N=3 P=0.95	Процент открытия, % N=3 P=0.95
1	10	7,5 ± 1,1	75 ± 11
	100	83 ± 12	83 ± 12
	1000	1020 ± 159	102 ± 16
2	10	8,3 ± 1,2	83 ± 12
	100	95 ± 13	95 ± 13
	1000	780 ± 117	78 ± 12
3	10	8,2 ± 1,2	82 ± 12
	100	96 ± 14	96 ± 14
	1000	1100 ± 176	110 ± 18
4	10	7,6 ± 1,2	76 ± 12
	100	84 ± 12	84 ± 12
	1000	860 ± 129	86 ± 13
5	10	8,9 ± 1,3	89 ± 13
	100	85 ± 13	85 ± 13
	1000	840 ± 126	84 ± 13

№ образца	Введено, мкг/л	Найдено, мкг/л N=3 P=0.95	Процент открытия, % N=3 P=0.95
6	10	11,9 ± 1,8	119 ± 18
	100	103 ± 18	103 ± 18
	1000	1060 ± 180	106 ± 18
7	10	10,5 ± 1,6	105 ± 16
	100	103 ± 17	103 ± 17
	1000	1010 ± 145	101 ± 15
8	10	10,3 ± 1,5	103 ± 15
	100	104 ± 15	104 ± 15
	1000	1020 ± 147	102 ± 15
9	10	9,2 ± 1,4	92 ± 11
	100	91 ± 14	91 ± 14
	1000	960 ± 136	96 ± 14
10	10	9,7 ± 1,5	97,0 ± 15
	100	95 ± 16	95 ± 15
	1000	820 ± 131	82 ± 13



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Синтезировано 5 конъюгатов глифосата с белками-носителями: три конъюгата с бычьим сывороточным альбумином и по одному с гемоцианином из лимфы улитки и с овальбумином.
2. Проведена иммунизация кроликов конъюгатами ГЛИ-ГЛУ, ГЛИ–БСА и ГЛИ–гл–БСА по двум схемам иммунизации, получены специфические поликлональные сыворотки: 80 антисывороток по первой схеме и 8 – по второй.
3. Получены диагностические антитела барана против Ig кролика, меченые ПХ.
4. Охарактеризованы полученные антисыворотки на предмет связывания с глифосатом. Наибольшую чувствительность в ИФА И ПФИА показали антисыворотки 2/3 и 128/23.
5. Разработана методика определения глифосата методом иммуноферментного анализа в модельной системе: предел количественного определения составил 1 мкг/л. Установлено, что данные антитела специфичны к глифосату и АМФК, а также практически не чувствительны к глюфосинату.



6. Оптимизированы условия определения глифосата методом ИФА для анализа реальных объектов – бобов сои. Отработаны условия подготовки образцов. Предел количественного определения глифосата в сое составил 10 мкг/кг, диапазон определяемых концентраций 10–5000 мкг/кг. Среднее значение степени извлечения составило 82%.

7. Разработана методика поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА) для определения глифосата. Пределы количественного определения в модельной системе составил 22,6 мкг/л. Установлено, что гетерологичная комбинация трейсера и антител (АМФК-ФИТЦ и анти-ГЛИ-ГЛУ) позволяет получить более низкие пределы обнаружения.

8. Разработанную методику применили для определения остаточного содержания глифосата в зерновой продукции на примере соевых бобов. Оптимальными условиями были выбраны: экстракция боратным буфером с последующим центрифугированием. Разведение пробы составило 20 раз. Степень извлечения из сои лежит в диапазоне от 95,3 до 115,7%.

9. Показана возможность разработки ингибиторного анализа для определения глифосата в питьевой воде. Предел количественного определения составил 3,2 мкг/л. Анализ с учетом подготовки пробы занял 35 минут.



**Спасибо за
внимание!**





Оптимизация условий постановки НТК ИФА

№ антисыворотки	Иммуноген	Твердофазный антиген	Титр антисыворотки	V/V ₀ , % при концентрации глифосата 1000 мкг/л
127/1–127/24	Анти–ГЛИ–ГЛУ	ГЛИ–БСА ГЛИ–ОВА ГЛИ–сБСА	1/2500–1/250 000	Нет конкуренции
128/1–128/22	Анти–ГЛИ–ГЛУ	ГЛИ–БСА ГЛИ–ОВА ГЛИ–сБСА	1/5000–1/250 000	Нет конкуренции
<u>128/23</u>	Анти–ГЛИ–ГЛУ	ГЛИ–БСА ГЛИ–ОВА ГЛИ–сБСА	1/3000 1/2000 1/3000	69 89 74
128/24–128/30	Анти–ГЛИ–ГЛУ	ГЛИ–БСА ГЛИ–ОВА ГЛИ–сБСА	1/1000–1/2500	Нет конкуренции
129/1–129/26	Анти–ГЛИ–ГЛУ	ГЛИ–БСА ГЛИ–ОВА ГЛИ–сБСА	1/2500–1/250 000	Нет конкуренции



Оптимизация условий постановки ИТК ИФА

№ антисыворотки	Иммуноген	Твердофазный антиген	Титр антисыворотки	V/V ₀ , % при концентрации глифосата 1000 мкг/л
1/1	Анти-ГЛИ-БСА	ГЛИ-БСА	1/160 000	87
		ГЛИ-ОВА	1/50 000	Нет конкуренции
		ГЛИ-сБСА	1/160 000	76
1/2	Анти-ГЛИ-БСА	ГЛИ-БСА	1/320 000	84
		ГЛИ-ОВА	1/75 000	Нет конкуренции
		ГЛИ-сБСА	1/150 000	81
1/3	Анти-ГЛИ-БСА	ГЛИ-БСА	1/640 000	83
		ГЛИ-ОВА	1/100 000	Нет конкуренции
		ГЛИ-сБСА	1/505 000	50
1/4	Анти-ГЛИ-БСА	ГЛИ-БСА	1/160 000	86
		ГЛИ-ОВА	1/80 000	Нет конкуренции
		ГЛИ-сБСА	1/150000	76



Оптимизация условий постановки НТК ИФА

№ антисыворотки	Иммуноген	Твердофазный антиген	Титр антисыворотки	V/V ₀ , % при концентрации глифосата 1000 мкг/л
2/1	Анти-ГЛИ-гл-БСА	ГЛИ-БСА	1/1200	81
		ГЛИ-ОВА	1/600	Нет конкуренции
		ГЛИ-сБСА	1/600	87
2/2	Анти-ГЛИ-гл-БСА	ГЛИ-БСА	1/2500	83
		ГЛИ-ОВА	1/650	Нет конкуренции
		ГЛИ-сБСА	1/800	51
2/3	Анти-ГЛИ-гл-БСА	ГЛИ-БСА	1/5000	77
		ГЛИ-ОВА	1/800	Нет конкуренции
		ГЛИ-сБСА	1/1600	35
2/4	Анти-ГЛИ-гл-БСА	ГЛИ-БСА	1/4500	81
		ГЛИ-ОВА	1/800	Нет конкуренции
		ГЛИ-сБСА	1/950	85