

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)

БІААРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ
BIOORGANIC CHEMISTRY

УДК 615.332;547-3;632.938.2

Поступила в редакцию 03.02.2017
Received 03.02.2017

А. С. Круглик¹, С. Т. Акалович², О. Л. Шарко¹, В. В. Шманай¹

¹*Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь*

²*Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь*

**ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВЫХ КОНЬЮГАТОВ И МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ
ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ТЕТРАЦИКЛИНА**

Аннотация. Разработаны методы контролируемой химической модификации бычьего сывороточного альбумина и пероксидазы хрена, позволяющие вводить в белок как минимальное число модификаций для сохранения биологической активности в иммуноанализе, так и максимальное – для получения иммуногенов, а также варьировать линкер и сайт связывания антигена с белком для повышения специфичности иммунного ответа. Получены и охарактеризованы белковые конъюгаты тетрациклина. Проведена иммунизация мышей, выделены моноклональные антитела к тетрациклину, которые испытаны в иммуноферментном анализе тетрациклина. Чувствительность определения составила $IC_{50}=5$ мкг/мл.

Ключевые слова: тетрациклин, иммуноферментный анализ, моноклональные антитела, пероксидаза из корня хрена
Для цитирования. Получение белковых конъюгатов и моноклональных антител для иммуноферментного анализа тетрациклина / А. С. Круглик [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2018. – Т. 54, № 1. – С. 72–79.

A. S. Kruhlik¹, S. T. Akalovich², O. L. Sharko¹, V. V. Shmanai¹

¹*Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,*

²*The Republic Research & Production Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk, Belarus*

**PREPARATION OF PROTEIN CONJUGATES AND MONOCLONAL ANTIBODIES
FOR IMMUNOASSAY OF TETRACYCLINE**

Abstract. We report herein on the methods to introduce a desirable number of modifications into bovine serum albumin and horseradish peroxidase in a controlled manner. The low modification to protein ratio is required when the biological activity of the enzyme has to be preserved, and the high modification to protein ratio is needed when producing immunogens. By varying the linker and the site of antigen binding with the carrier protein, we were able to produce the antibodies of high specificity. Protein conjugates of tetracycline were synthesized and characterized. Immunization of mice was carried out and monoclonal antibodies for immunoassay of tetracycline were obtained and tested in ELISA, $IC_{50}=5$ ug/ml.

Keywords: tetracycline, immunosorbent assay, monoclonal antibodies, horseradish peroxidase

For citation. Kruhlic A. S., Akalovich S. T., Sharko O. L., Shmanai V. V. Preparation of protein conjugates and monoclonal antibodies for immunoassay of tetracycline. *Vestsi Natsyianal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk=Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2018, vol. 54, no. 1, pp. 72–79 (In Russian).

Тетрациклины относятся к группе антибиотиков широкого спектра действия и эффективны в борьбе с различными грамотрицательными и грамположительными микроорганизмами. Однако бесконтрольное применение тетрациклинов в ветеринарии вызывает опасения, так как наличие их остатков в продуктах питания приводит к повышению устойчивости микроорганизмов к антибиотикам [1].

Традиционно для определения содержания антибиотиков, в частности тетрациклина, применяют хроматографические методы [2–4], проточно-инъекционные методы [5], капиллярный электрофорез [6]. Данные методы хороши для точной идентификации искомого соединения или определения одновременно нескольких веществ. Однако они имеют множество недостатков:

требуются дорогостоящее оборудование, высококвалифицированный персонал, длительная подготовка. Поэтому на смену им приходят экспрессные иммунохимические методы анализа [7–10]. Опубликован ряд работ, посвященных синтезу иммуногенных конъюгатов тетрациклина, однако, в большинстве своем они представляют собой использование карбоксильных производных тетрациклина [1, 11] или кросс-связывающих реагентов (фомальдегид, глутаровый альдегид, бензидин) [1, 11, 12].

Цель данной работы – разработка альтернативных методов синтеза гаптенных (функционализованных молекул тетрациклина) и получения их конъюгатов с бычьим сывороточным альбумином (БСА), применяемым в качестве высокомолекулярного белка-носителя для последующей иммунизации и получения антител к антибиотикам тетрациклинового ряда, и пероксидазой хрена, используемой в качестве метки в различных видах иммуноферментного анализа (рис. 1).

Материалы и оборудование. В работе использовали гидрохлорид тетрациклина, гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC·HCl), N-гидроксисукцинимид, ди-трет-бутилдикарбонат (Fluka); 3-(проп-2-ин-1-илокси)пропан-1-амин, гидразид азидомасляной кислоты, гидразид оксимасляной кислоты (Aurora Fine Chemicals); 4-аминобензойную кислоту, 3-аминобензойную кислоту, 3-амино-5-нитробензойную кислоту, аскорбат натрия, азид натрия, диизопропилэтиламин (DIPEA), тетраметилбензидин (ТМБ), *трис*(3-гидроксипропилтриазолилметил)амин (ТНРТА), полный адьювант Фрейнда (ПАФ), неполный адьювант Фрейнда (НАФ), этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевую соль (Aldrich); натрий-фосфатный буфер (НФБ), твин-20 (Roth); БСА (J.T.Baker); антитела, специфичные к тетрациклину (Ridascreen); гидроксид натрия (ч.д.а.), хлорид натрия (х.ч.), периодат натрия (ч.д.а.), сульфат натрия (х.ч.), карбонат натрия (х.ч.), гидрокарбонат натрия (х.ч.), нитрит натрия (х.ч.), перекись водорода (30 %) ГОСТ 177-88, аммиака 25 %-ный водный раствор (ч.д.а.), сульфат меди (х.ч.).

Метанол, этанол, уксусную кислоту, этилацетат, диоксан, диэтиловый эфир, ацетон, хлористый метилен, пиридин, триэтиламин, ДМСО очищали перегонкой и при необходимости абсолютизировали по описанным методикам [13].

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре «СОЛАР РВ2201». Для колоночной гелефильтрации использовали Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals); для иммуноферментного анализа – 96-луночные полистирольные планшеты «Costar». Оптическую плотность в лунках планшета регистрировали на фотометре «БИОТЕК EL×800».

Синтез гаптенных.

Гаптен тетрациклина 2a. 20 мг (146 мкмоль) 4-аминобензойной кислоты растворили в 1 мл 0,2 N HCl, охладили до 0 °С, добавили раствор 12 мг (174 мкмоль) NaNO₂ и перемешивали при 0 °С 1 ч. Затем добавили 300 мкл 3 M раствора мочевины, перемешивали 15 мин. 72 мг (146 мкмоль) гидрохлорида тетрациклина растворили в 0,5 M боратном буфере с pH 8,5, охладили до 0 °С и добавили к этой смеси раствор соли диазония. Реакционную смесь подщелачивали до pH 9,5 и перемешивали 2 ч при 0 °С в темноте в атмосфере аргона. Затем добавили 30 мг (160 мкмоль) 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида, перемешивали 15 мин, добавили 20 мг (180 мкмоль) N-гидроксисукцинимид и перемешивали 30 мин. Полученный активированный эфир диазопроизводного **2a** в конъюгацию с БСА вводили без выделения.

Гаптен тетрациклина 2b. 20 мг (146 мкмоль) 3-аминобензойной кислоты растворили в 1 мл 0,2 N HCl, охладили до 0 °С, добавили раствор 12 мг (174 мкмоль) NaNO₂ и перемешивали при 0 °С 1 ч. Затем добавили 300 мкл 3 M раствора мочевины и перемешивали 15 мин. 72 мг (146 мкмоль) гидрохлорида тетрациклина растворили в 0,5 M боратном буфере с pH 8,5, охладили до 0 °С и добавили раствор соли диазония. Реакционную смесь подщелачивали до pH 9,5 и перемешивали 2 ч при 0 °С в темноте в атмосфере аргона. Затем добавили 30 мг (160 мкмоль) 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида, перемешивали 15 мин, добавили 20 мг (180 мкмоль) N-гидроксисукцинимид и перемешивали 30 мин. Активированный эфир диазопроизводного **2b** в конъюгацию с БСА вводили без выделения.

Гаптен тетрациклина 2c. 24 мг (134 мкмоль) 3-нитро-5-аминобензойной кислоты растворили в 1 мл 0,2 N HCl, охладили до 0 °С, добавили раствор 12 мг (174 мкмоль) NaNO₂ и перемешивали при 0 °С 1 ч. Затем добавили 30 мкл 3 M раствора мочевины, перемешивали 15 мин. 77 мг (160 мкмоль) гидрохлорида тетрациклина растворили в 0,5 M боратном буфере с pH 8,5,

охладили до 0 °С и добавили к этому раствору раствор соли диазония. Реакционную смесь подщелачивали до pH 9,5 и перемешивали 2 ч при 0 °С в темноте в атмосфере аргона. Затем добавили 34 мг (180 мкмоль) 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида, перемешивали 15 мин, добавили 23 мг (200 мкмоль) N-гидроксисукцинимид и перемешивали 30 мин. Активированный эфир диазопроизводного **2c** в конъюгацию с БСА вводили без выделения.

4-амино-N-(3-(проп-2-ин-1-илокси)пропил)бензамид 3a. 75 мг (0,55 ммоль) 4-аминобензойной кислоты растворили в 10 мл пиридина, добавили 140 мг (1,22 ммоль) N-гидроксисукцинимид, 110 мг (0,53 ммоль) дициклогексилкарбодиимида и 140 мг (1,22 ммоль) 3-(проп-2-ин-1-илокси)пропан-1-амина. Перемешивали 24 ч, растворитель удалили при пониженном давлении и выделили при помощи колоночной хроматографии 85 мг продукта в виде коричневого порошка (67 %).

3-нитро-5-амино-N-(3-(проп-2-ин-1-илокси)пропил)бензамид 3c. 100 мг (0,55 ммоль) 3-нитро-5-аминобензойной кислоты растворили в 10 мл пиридина, добавили 140 мг (1,22 ммоль) N-гидроксисукцинимид, 110 мг (0,53 ммоль) дициклогексилкарбодиимида и 140 мг (1,22 ммоль) 3-(проп-2-ин-1-илокси)пропан-1-амина. Перемешивали 24 ч, растворитель удалили при пониженном давлении и выделили при помощи колоночной хроматографии 100 мг продукта в виде оранжевого порошка (60 %).

Гаптен тетрациклина 4a. 59 мг (0,25 ммоль) 4-амино-N-(3-(проп-2-ин-1-илокси)пропил)бензамида **3a** растворили в 2 мл 0,2 N HCl, охладил до 0 °С, добавили раствор 52 мг (0,75 ммоль) NaNO₂ и перемешивали при 0 °С 1 ч. Затем добавили 200 мкл 3 M раствора мочевины, перемешивали 15 мин. 144 мг (0,30 ммоль) гидрохлорида тетрациклина растворили в 0,5 M боратном буфере с pH 8,5, охладил до 0 °С и добавили к этому раствору раствор соли диазония. Реакционную смесь подщелачивали до pH 9,5, перемешивали 2 ч при 0 °С в темноте в атмосфере аргона и без выделения вводили в конъюгацию с БСА.

Гаптен тетрациклина 4c. 0,59 мг (2,33 мкмоль) 3-нитро-5-амино-N-(3-(проп-2-ин-1-илокси)пропил)бензамида **3c** растворили в 100 мкл 0,2 N HCl, охладил до 0 °С, добавили раствор 0,56 мг (8,12 мкмоль) NaNO₂ и перемешивали при 0 °С 1 ч. Затем добавили 20 мкл 3 M раствора мочевины, перемешивали 15 мин. 1,44 мг (3,00 мкмоль) гидрохлорида тетрациклина растворили в 0,5 M боратном буфере с pH 8,5, охладил до 0 °С и добавили к этому раствору раствор соли диазония. Реакционную смесь подщелачивали до pH 9,5, перемешивали 2 ч при 0 °С в темноте в атмосфере аргона и без выделения вводили в конъюгацию с БСА.

Синтез конъюгатов.

Белковый конъюгат 5. 30 мг (0,45 мкмоль) БСА растворили в 0,2 N NaHCO₃, охладил до 0 °С, добавили раствор 11,0 мг (16 мкмоль) N-гидроксисукцинимидного эфира тетрациклина **2a** и перемешивали 2 ч при 0 °С в темноте в атмосфере аргона. После этого выделяли полученный конъюгат эксклюзионной гель-хроматографией, элюируя 10 mM TEAA, pH 7,2.

Белковый конъюгат 6. 30 мг (0,45 мкмоль) БСА растворили в 0,2 N NaHCO₃, охладил до 0 °С, добавили раствор 5,1 мг (22,5 мкмоль) N-гидроксисукцинимидного эфира азидомасляной кислоты в ДМСО и перемешивали 2 ч при 0 °С, после чего выделяли модифицированный БСА эксклюзионной гель-хроматографией, элюируя 10 mM триэтиламоний ацетатным буфером (TEAA) pH 7,2. Затем добавляли 15,4 мг (22,5 мкмоль) тетрациклин-алкина **3a**, 150 мкл 100 mM TEAA, pH 7,2, 100 мкл 100 mM CuSO₄, 110 мкл 10 mM ТНРТА, 300 мкл 10 mM аскорбата натрия и перемешивали 48 ч в темноте в атмосфере аргона. Выделяли полученный конъюгат эксклюзионной гель-хроматографией 10 mM TEAA, pH 7,2.

Белковый конъюгат 7. 30 мг (0,45 мкмоль) БСА растворили в 0,2 N NaHCO₃, охладил до 0 °С, добавили раствор 11,0 мг (16 мкмоль) N-гидроксисукцинимидного эфира тетрациклина **2b** и перемешивали 2 ч при 0 °С в темноте в атмосфере аргона. После этого выделяли полученный конъюгат эксклюзионной гель-хроматографией, элюируя 10 mM TEAA, pH 7,2.

Белковый конъюгат 8. 30 мг (0,45 мкмоль) БСА растворили в 0,2 N NaHCO₃, охладил до 0 °С и добавили раствор 11,6 мг (16 мкмоль) N-гидроксисукцинимидного эфира тетрациклина **2c** и перемешивали 2 ч при 0 °С в темноте в атмосфере аргона. Полученный конъюгат выделяли эксклюзионной гель-хроматографией, элюируя 10 mM TEAA, pH 7,2.

Пероксидазный конъюгат 9. 0,5 мг (11,3 нмоль) пероксидазы из корня хрена растворили в 0,2 N NaHCO₃, охладили до 0 °С, добавили раствор 0,083 мг (113 нмоль) N-гидроксисукцинимидного эфира тетрациклина **2с** и перемешивали 2 ч при 0 °С в темноте в атмосфере аргона. Полученный конъюгат выделяли эксклюзионной гель-хроматографией, элюируя 10 mM TEAA, pH 7,2.

Пероксидазный конъюгат 10. 0,5 мг (11,3 нмоль) пероксидазы из корня хрена растворили в 450 мкл воды, добавили 50 мкл 0,1 M раствора NaIO₄ и перемешивали 30 мин. Окисленную пероксидазу из корня хрена выделяли эксклюзионной гель-хроматографией, элюируя 1 mM TEAA, pH 5,0. Затем добавляли 0,002 мг (16 нмоль) гидразида азидомасляной кислоты, 10 мкл 1 M TEAA, pH 9,2 и перемешивали 12 ч, после чего добавляли избыток гидразида оксимасляной кислоты, перемешивали еще 2 ч и выделяли высокомолекулярную фракцию эксклюзионной гель-хроматографией, элюируя 10 mM TEAA, pH 7,2. Добавляли 0,083 мг (113 нмоль) тетрациклин-алкина **3с**, 15 мкл 10 mM TEAA, pH 7,2, 10 мкл 10 mM CuSO₄, 11 мкл 10 mM THPTA, 30 мкл 10 mM аскорбата натрия и перемешивали 48 ч в темноте в атмосфере аргона. Полученный конъюгат выделяли эксклюзионной гель-хроматографией 10 mM TEAA, pH 7,2.

Получение антител. Самок мышей Balb/C в возрасте 10–12 недель иммунизировали внутрибрюшинно по схеме, представленной в таблице. Титр специфических антител в плазме крови мышей определяли на 10-е сутки после второй и последующих иммунизаций методом непрямого ИФА, сорбируя на твердой фазе конъюгат **7**. Мышиные МКА получали с помощью гибридомной технологии слиянием иммунных спленоцитов мыши, у которой выявлялся наибольший титр специфических антител, с миеломными клетками P3X63/Ag8.653 [14, 15].

Схема иммунизации мышей
Mice immunization scheme

Номер иммунизации	Интервал, сут	Количество иммуногена, мкг	Адьювант	Иммуноген
1		50	ПАФ	6
2	28	25	НАФ	6
3	20	25	НАФ	5
4	21	25	НАФ	5

Непрямой иммуноферментный анализ. В лунки полистирольного планшета вносили конъюгаты **7, 8** по 100 мкл с концентрацией 1 мкг/мл в 0,1 M карбонатном буфере, pH 9,6. Сорбировали 2 ч при 37 °С, отмывали планшет 3 раза раствором НФБ, содержащим 0,1 % твин-20 (НФБ-твин-20). Добавляли по 100 мкл раствора плазмы в блокирующем буфере (НФБ, содержащий 0,1 % твин-20 и 1 % БСА) и инкубировали 50 мин при 37 °С при перемешивании, отмывали планшет 3 раза раствором НФБ-твин-20. Добавляли по 100 мкл раствора кроличьих

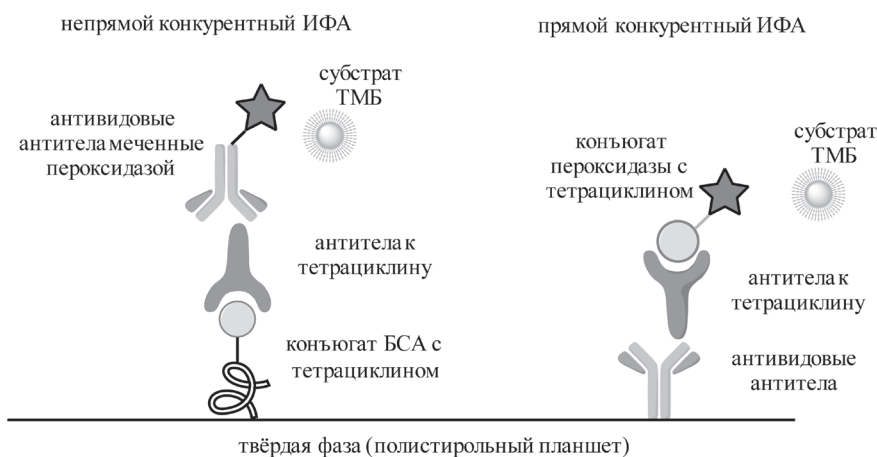


Рис. 1. Схема прямого и непрямого конкурентного ИФА

Fig. 1. Direct and indirect ELISA schemes

антивидовых антител, меченных пероксидазой из корня хрена, инкубировали 30 мин при 37 °С и перемешивании, отмывали планшет 4 раза раствором НФБ-твин-20. Затем добавляли по 100 мкл субстрата ТМБ, инкубировали 10 мин при 37 °С. Останавливали реакцию 100 мкл 5 % H_2SO_4 и измеряли оптическую плотность раствора в лунках при 450 нм.

Прямой иммуноферментный анализ. В лунки полистирольного планшета вносили по 100 мкл кроличьих антивидовых антител в 0,1 М карбонатном буфере, pH 9,6, сорбировали 2 ч при 37 °С, отмывали планшет 3 раза раствором НФБ-твин-20. Затем вносили по 100 мкл раствора положительных клонов в блокирующем буфере в разведении 1:100, инкубировали 1 ч при 37 °С, отмывали планшет 3 раза раствором НФБ-твин-20. Добавляли по 50 мкл раствора конъюгатов **9**, **10** и 50 мкл стандартного раствора тетрациклина в НФБ, инкубировали 1 ч при 37 °С, отмывали планшет 4 раза раствором НФБ-твин-20. Добавляли по 100 мкл субстрата ТМБ, инкубировали 10 мин при 37 °С. Останавливали реакцию 100 мкл 5 % H_2SO_4 и измеряли оптическую плотность раствора в лунках при 450 нм (рис. 1).

Результаты и их обсуждение. Так как молекула тетрациклина довольно мала (444,5 г/моль) для самостоятельной генерации иммунного ответа, для получения специфических антител необходимо синтезировать конъюгаты гаптена с белком-носителем. Структура таких конъюгатов, выступающих в роли иммуногенов, играет важную роль в формировании иммунного ответа. На первом этапе были синтезированы гаптены, позволяющие осуществить различные подходы к синтезу конъюгатов, тем самым исключив влияние пространственной вставки на получаемые антитела. Одним из таких подходов является получение карбоксильных производных по описанной ранее реакции азосочетания тетрациклина с аминобензойной кислотой [11]. За основу конструкции линкеров мы взяли пара-аминобензойную кислоту **1a**, а также ее производные с измененным положением аминогруппы **1b** и дополнительно содержащее нитрогруппу **1c**, с последующим получением их активированных эфиров **2a–c** (рис. 2).

Современным эффективным подходом к синтезу конъюгатов гаптенных с белками является применение биортогональных реакций, в частности клик-химии – медь-катализируемого дипольного циклоприсоединения азидов к алкинам. Для этого по реакции азосочетания были получены гаптены **4a**, **4c** (рис. 3), содержащие терминальную ацетиленовую группу (**3a**, **3c**). Мы установили, что в условиях получения амида не требуется постановка защитной группы на аминогруппу аминобензойной кислоты, поскольку реакция идет избирательно по алифатической аминогруппе пропинилоксипропиламина. Двухстадийный формат реакции без выделения промежуточного продукта и без постановки защиты на аминогруппу позволил сократить количество стадий и повысить общий выход продукта.

Синтез конъюгатов тетрациклина с БСА проводили с использованием обоих подходов: реакции аминогрупп белка с активированными производными тетрациклина и клик-химии с пред-

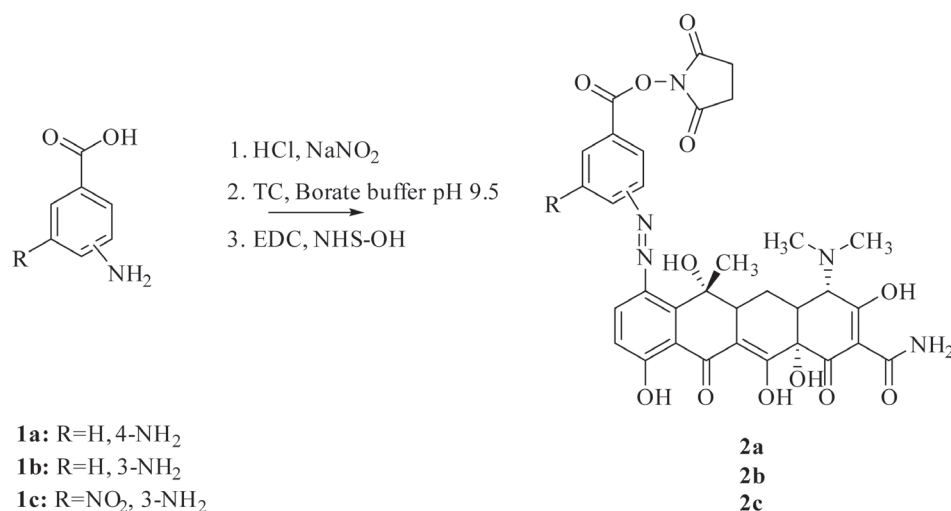


Рис. 2. Схема синтеза активированных эфиров тетрациклина

Fig. 2. Synthesis of activated tetracycline esters

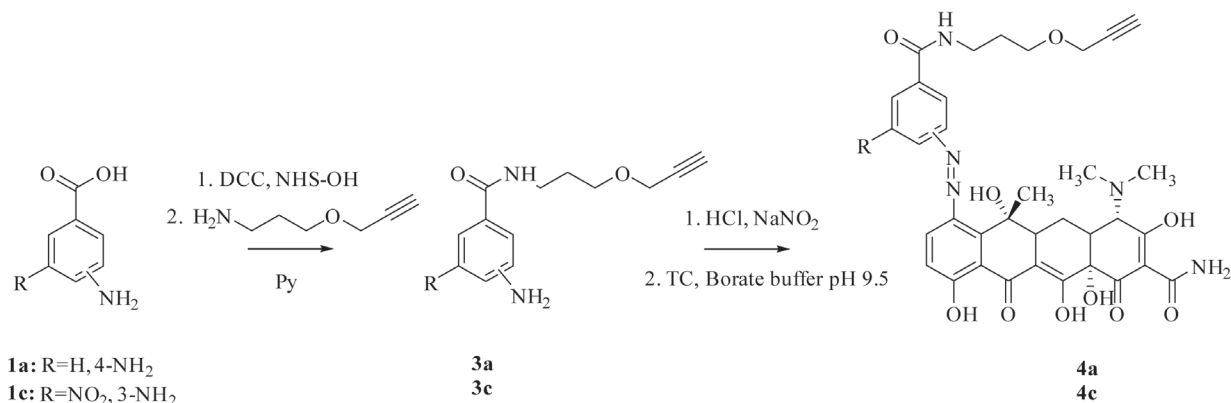


Рис. 3. Схема синтеза алкин-производных тетрациклина
Fig. 3. Synthesis of alkyne-derivatives of tetracycline

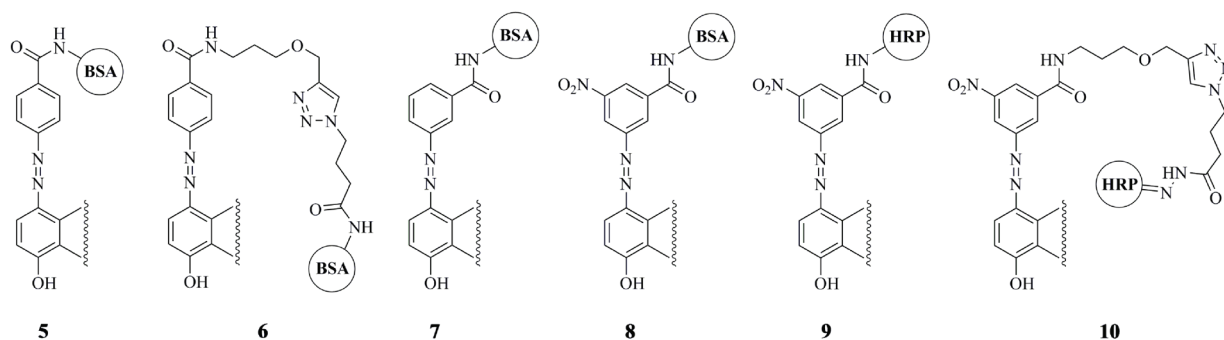


Рис. 4. Структуры линкеров в конъюгатах тетрациклина с БСА и пероксидазой
Fig. 4. Structures of linkers in tetracycline conjugates with BSA and peroxidase

варительной модификацией БСА азидными группами (рис. 4). Состав конъюгатов оценивали по УФ и МАЛДИ-МС спектрам. Степень модификации составила 15–20 молекул тетрациклина на молекулу белка.

Для иммунизации мышей были выбраны конъюгаты **5** и **6**. Выделенные индивидуальные клоны тестировали в непрямом ИФА. По результатам проверки были выбраны клоны, которые обладали антигенсвязывающими свойствами по отношению к тетрациклину, не проявляли перекрестной активности на линкер и белок-носитель и обладали максимальным титром. Этого удалось достичь, используя для сорбции на твердой фазе конъюгаты **7** и **8** с изменениями в структуре линкера по сравнению с конъюгатами, которыми проводилась иммунизация.

Для прямого варианта ИФА с использованием аналогичных подходов были синтезированы конъюгаты тетрациклина с пероксидазой из корня хрена (рис. 5). Состав полученных конъюгатов оценивали по УФ и МАЛДИ-МС спектрам. Степень модификации составила 1–2 молекулы тетрациклина на молекулу фермента. Кривую конкурентного титрования моноклональных антител, представленную на рис. 5, получали в 5 повторах с использованием пероксидазного конъюгата **10**. Чувствительность определения составила $\text{IC}_{50}=5$ мкг/мл.

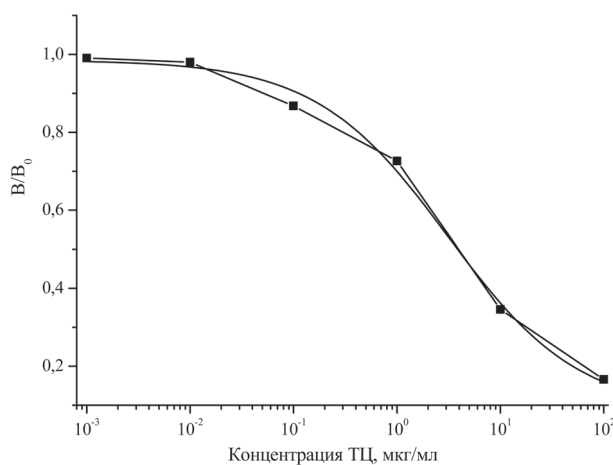


Рис. 5. Калибровочный график прямого ИФА тетрациклина с моноклональными антителами
Fig. 5. Calibration curve of direct tetracycline ELISA with monoclonal antibodies

Заклучение. Синтезирован ряд производных тетрациклина, модифицированных карбоксильными и ацетиленовыми группами, которые позволили реализовать сайт-специфическую конъюгацию тетрациклина с белком-носителем и ферментом. Изменение положения аминокислотной вставки на формирование иммунного ответа. Иммунизация синтезированными конъюгатами мышей линии Balb/C позволила получить моноклональные антитела, обладающие специфичностью к молекулам тетрациклина в прямом иммуноферментном анализе. Установлено положительное влияние удлиненного линкера в пероксидазном конъюгате на результаты прямого иммуноферментного анализа. Разработанные методы синтеза конъюгатов с использованием клик-химии могут быть использованы для получения новых высокоэффективных иммуногенов.

Благодарности. Выражаем благодарность доктору Кристоферу Вайзе (Свободный Университет, Берлин) за помощь в снятии и интерпретации масс-спектров.

Acknowledgements. We thank Dr. Christoph Weise (Freie Universität Berlin) for assistance in obtaining and interpreting the mass-spectra.

Список использованных источников

1. Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues: Application to honey samples / N. Pastor-Navarro [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2007. – Vol. 594. – P. 211–218.
2. Ahmed, F. E. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks / F. E. Ahmed // *Trends Anal. Chem.* – 2001. – Vol. 20, N 11. – P. 649–661.
3. Santos, F. J. The application of gas chromatography to environmental analysis / F. J. Santos, M. T. Galceran // *Trends Anal. Chem.* – 2002. – Vol. 21, N 9–10. – P. 672–685.
4. Sherma, J. Recent advances in the thin-layer chromatography of pesticides: a review / J. Sherma // *J. AOAC Int.* – 2003. – Vol. 86, N 3. – P. 602–611.
5. Flow Injection Methods of Analysis for Waters. II. Organic Pollutants / A. F. Dunec [et al.] // *Crit. Rev. Anal. Chem.* – 2003. – Vol. 33, N 1. – P. 57–68.
6. Pico, Y. Capillary electrophoresis for the determination of pesticide residues / Y. Pico, R. Rodriguez, J. Manes // *Trends Anal. Chem.* – 2003. – Vol. 22, N 3. – P. 133–151.
7. Meulenberg, E. P. Investigation of indicative methods: Validation of several commercial ELISAs for pesticides / E. P. Meulenberg, L. G. de Vree, J. Dogterom // *Anal. Chim. Acta*. – 1999. – Vol. 399, N 1–2. – P. 143–149.
8. Koester, C. J. Environmental analysis / C. J. Koester, S. L. Simonich, B. K. Esser // *Anal. Chem.* – 2003. – Vol. 75, N 12. – P. 2813–2829.
9. Richardson, S. D. Water analysis: emerging contaminants and current issues / S. D. Richardson // *Anal. Chem.* – 2003. – Vol. 75, N 12. – P. 2831–2857.
10. Nistor, C. Bioanalytical tools for monitoring polar pollutants / C. Nistor, J. Emnéus // *Waste Management*. – 1999. – Vol. 19. – P. 147–170.
11. Preparation of Anti-Tetracycline Antibodies and Development of an Indirect Heterologous Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect Residues of Tetracycline in Milk / Yu. Zhang [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. – Vol. 55, N 2. – P. 211–218.
12. Burkin, M. A. Improved group determination of tetracycline antibiotics in competitive enzyme-linked immunosorbent assay / M. A. Burkin, I. A. Galvidis // *Food and Agricultural Immunology*. – 2009. – Vol. 20, N 3. – P. 245–252.
13. Органические растворители. Физические свойства и методы очистки / А. Вайсбергер [и др.]. – М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1958. – 520 с.
14. Антитела. Методы: в 2 т / Д. Кэтти [и др.]. – М.: Мир, 1991. – Т. 1. – 287 с.
15. Howard, G. C. Basic methods in antibody production and characterization / G. C. Howard, D. R. Bethell. – Boca Raton : CRC Press, 2000. – 271 p.

References

1. Pastor-Navarro N., Morais S., Maquieira A., Puchades R. Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues: Application to honey samples. *Analytica Chimica Acta*, 2007, vol. 594, pp. 211–218. Doi: 10.1016/j.aca.2007.05.045
2. Ahmed F. E. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. *Trends in Analytical Chemistry*, 2001, vol. 20, no. 11, pp. 649–661. Doi: 10.1016/S0165-9936(01)00121-2
3. Santos F. J., Galceran M. T. The application of gas chromatography to environmental analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 2002, vol. 21, no. 9–10, pp. 672–685. Doi: 10.1016/S0165-9936(02)00813-0
4. Sherma J. Recent advances in the thin-layer chromatography of pesticides: a review. *Journal of AOAC International*, 2003, vol. 86, no. 3, pp. 602–611.
5. Dunec A. F., Cheregi M., Calatayud J. M., Garcia Mateo J. V., Aboul Enein H. Y. Flow Injection Methods of Analysis for Waters. II. Organic Pollutants. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2003, vol. 33, no.1, pp. 57–68. Doi: 10.1080/713609154

6. Pico Y., Rodriguez R., Manes J. Capillary electrophoresis for the determination of pesticide residues. *Trends in Analytical Chemistry*, 2003, vol. 22, no. 3, pp. 133–151. Doi: 10.1016/S0165-9936(03)00302-9
7. Meulenberg E. P., de Vree L. G., Dogterom J. Investigation of indicative methods: Validation of several commercial ELISAs for pesticides. *Analytica Chimica Acta*, 1999, vol. 399, no. 1–2, pp. 143–149. Doi: 10.1016/S0003-2670(99)00585-1
8. Koester C. J., Simonich S. L., Esser B. K. Environmental analysis. *Analytical Chemistry*, 2003, vol. 75, no. 12, pp. 2813–2829. Doi: 10.1021/ac030131t.
9. Richardson S. D. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, 2003, vol. 75, no. 12, pp. 2831–2857. Doi : 10.1021/acs.analchem.7b04577
10. Nistor C., Emnéus J. Bioanalytical tools for monitoring polar pollutants. *Waste Management*, 1999, vol. 19, pp. 147–170. Doi: 10.1016/S0956-053X(99)00006-9
11. Zhang Y., Lu S., Liu W., Zhao C., Xi R. Preparation of Anti-Tetracycline Antibodies and Development of an Indirect Heterologous Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect Residues of Tetracycline in Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, Vol. 55, no. 2, pp. 211–218. Doi: 10.1021/jf062627s
12. Burkin M. A., Galvidis I. A. Improved group determination of tetracycline antibiotics in competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Food and Agricultural Immunology*, 2009, vol. 20, no. 3, pp. 245–252. Doi: 10.1080/09540100903078604
13. Weissberger A., Proskauer E., Riddick J. A., Toops E. E. *Organic solvents: Physical properties and methods of purification*. Interscience Publishers, 1935. 212 p.
14. Catty D., Raykundaliya Ch., Braun J., Ling N. R., Gordon D., Arvieux J., Williams A. F. *Antibodies. Vol. 1. A practical approach*. Oxford and Washington, IRL Press Limited, 1988. 204 p.
15. Howard G. C., Bethell D. R. *Basic methods in antibody production and characterization*. Boca Raton : CRC Press, 2000. 271 p. Doi: 10.1201/9781420036534

Информация об авторах

Крулик Александр Сергеевич – науч. сотрудник, Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: a.kruhlik@gmail.com

Акалович Светлана Тадеушевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Долгиновский тракт, 160, 220053, Минск, Республика Беларусь). E-mail: svkoleda@mail.ru

Шарко Ольга Леонидовна – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник, Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sharko@ifoch.bas-net.by

Шманай Вадим Владимирович – канд. хим. наук, зав. лаб. химии биоконъюгатов, Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: shmanai@ifoch.bas-net.by

Information about the authors

Aliaksandr S. Kruhlik – Researcher, Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (13, Sarganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: a.kruhlik@gmail.com

Svetlana T. Akalovich – Ph. D. (Biology), Senior researcher, Research and Production Center for Hematology and Medical Biotechnology (160, Dolginovski tract, 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: svkoleda@mail.ru

Olga L. Sharko – Ph. D. (Chemistry), Senior researcher, Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (13, Sarganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sharko@ifoch.bas-net.by

Vadim V. Shmanai – Ph. D. (Chemistry), Head of the Laboratory of Bioconjugate Chemistry, Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (13, Sarganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shmanai@ifoch.bas-net.by