



Информация за изпълнение на етап на проект

Наименование на конкурса:
КОНКУРС ЗА ФИНАНСИРАНЕ НА ФУНДАМЕНТАЛНИ НАУЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ – 2017г.
Основна научна област:
Технически науки
№ на договор:
ДН 17/3
Начална и крайна дата на проекта:
12.12.2017 г. – 12.12.2019 г. (24 месеца от датата на подписването на договора)
Заглавие на проекта:
„Нова генерация мултиимуноанализи за безопасността на храните на базата на магнитни наночастици: Разработване и валидация за токсични замърсители“
Базова организация:
Университет „Проф. д-р Асен Златаров“ - Бургас
Партньорски организации:
Институт по микробиология, БАН, Департамент Иммунология
Ръководител на научния колектив (академична длъжност, научна степен, име):
Проф. д-р Цонка Иванова Годжевъргова
Общ размер на отпуснатото финансиране за първи етап:
60 000 лв
Интернет страница на проекта (ако има такава):
Научни публикации по проекта:
1. Zlatina Becheva, Yavor Ivanov, Katya Gabrovska & Tzonka Godjevargova, Rapid immunofluorescence assay for staphylococcal enterotoxin A using magnetic nanoparticles, International Journal of Food Science and Technology 2019, 54 (3) 916-922. IF –2,383. doi:10.1111/ijfs.14018
2. Milka Atanasova, Yavor Ivanov, Luka Godjevargov, Tzonka Godjevargova, Preparation of functionalized magnetic nanoparticles, Annual of Assen Zlatarov University, Burgas, Bulgaria, 2018, v. XLVII.
3. Becheva Z., Ivanov Y., Godjevargova T., Comparison of Alexa 488, DR110 and FITC conjugated to antibody for microscopic assays, PROCEEDINGS, Biotechnologies and food technologies, 2018, 57, 10.2, 194-198, Reports Awarded with "Best Paper" Crystal Prize'18. http://conf.uni-ruse.bg/bg/docs/sns/2018/FR.pdf .
4. Godjevargova T., Ivanov Y., Atanasova M., Becheva Z., Zherdev A., Magnetic nanoparticles based fluorescence immunoassay for food contaminants, Food Science and



Applied Biotechnology, 2019, 2, (1), 38-45..
5. Zlatina Becheva, Yavor Ivanov, Tzonka Godjevargova, Fluorescence Immunoassays for Staphylococcal Enterotoxin A., Proceedings of 159th The IRES International Conference, 18-23, Barcelona, Spain, 11th-12th April, 2019.
6. Godjevargova T., Becheva Z., Ivanov Y., Thorbanov A.,_Preparation of monoclonal and polyclonal antibodies for staphylococcal enterotoxins A_immunofluorescent assay, Open Biotechnology Journal, 2019, под печат, SJR= 0,16. Prof. Godjevargova is guest editor of “The Open Biotechnology Journal”, Frontiers section “Agricultural Biotechnologies”, thematic issue “Current Trends in toxin analysis of agricultural products: improving the food safety with the help of Biotechnologies”.
7. Явор Иванов, Имунофлуоресцентен анализ на базата на магнитни наночастици и моноклонални и поликлонални антители за определяне на ентеротоксин А, Монография, 2019, издателство ФЛАТ, Бургас, ISBN: 978-619-7125-60-3.



Описание на очакваните резултати по проекта (до 1 стр. в рамките на полето по-долу):

Получаване на магнитни наночастици с различен среден размер. Определяне на оптималния размер на магнитните наночастици. Получаване на три вида функционализирани магнитни наночастици. Определяне на оптималния вид функционализирани магнитни наночастици, използвани като носители за имобилизация на биоагентите. Охарактеризиране на немодифицираните и модифицираните магнитни наночастици. Определяне на средния размер на немодифицираните и модифицирани наночастици, ТЕМ анализи, FTIR спектри, определяне на количеството активни групи.

Създаване на миша хибридома продуцираща миши моноклонални антитела срещу прицелните антигени. Продуциране, изолиране и пречистване на моноклонално антитяло срещу Ентеротоксин А. Получаване на пречистени фрагменти на моноклоналното антитяло срещу Ентеротоксин А чрез ензимна хидролиза и гелна хроматография. Определяне на активността на полученото моноклонално антитяло срещу Ентеротоксин А и фрагменти чрез ELISA метод.

Определяне на оптималните условия за имобилизация на моноклоналното антитяло срещу Ентеротоксин А и получените фрагменти на моноклоналното антитяло. Получаване на магнитни наночастици с имобилизирани моноклонални антитела и фрагменти. Установяване на зависимостта между размера и вида на модификация на наночастиците и активността на имобилизираните антитела и фрагменти. Получаване на пречистен конюгат антиген-флуоресцентно багрило за разработване на имуноанализ за ентеротоксин А. Получаване на конюгати на стафилококов ентеротоксин А (SEA) с три флуоресцентни багрила: ATTO620NHS естер, FITC и DR110. Доказване на конюгатите чрез използването на FTIR спектроскопия, UV-Vis спектрофотометрия.

Създаване на имунофлуоресцентни анализи за определяне на Ентеротоксин А. Оптимизиране на имунофлуоресцентните анализи за определяне на Ентеротоксин А. Определяне на оптималните условия за протичане на отделните имунофлуоресцентните анализи на базата на имобилизирани моноклонално антитяло, F(ab')₂ фрагменти - оптимална концентрация на имобилизирано антитяло и на конюгат. Доказване на свързването между магнитните наночастици с имобилизирано антитяло и конюгата антиген-флуоресцентно багрило. Определяне на основни аналитични характеристики на имунофлуоресцентни анализи за определяне на Ентеротоксин А – линеен интервал, откриваем минимум. Установяване на разликите в характеристиките на анализите с моноклоналните антитела и с техните фрагменти. Прилагане на разработеният анализ в реални проби от мляко.

Тъй като антителата и техните конюгати са нестабилни във времето, се наложи първо да приключим със всички експерименти с моноклоналното антитяло срещу ентеротоксин А и неговите фрагменти през първата година, а през втората година да проведем получаването на второто моноклонално антитяло срещу Охратоксин А и фрагментите му и всички експерименти проведени с тях.



Членове на научния колектив

Организации/участници¹	Бележка²
Базова организация:	
Университет „Проф. д-р Асен Златаров” - Бургас	
Ръководител на научния колектив	
Проф. д-тн Цонка Иванова Годжевъргова	
Участници:	
1. доц. д-р Катя Иванова Габровска 2. гл.ас. д-р Явор Луканов Иванов 3. гл.ас. д-р Руска Димова ненкова 4. д-р Милка Койчева Атанасова 5. д-р Златина Руменова Бечева	(МУ) (ПД) (ПД)
Партньорска организация:	
Институт по микробиология, БАН, Департамент Имунология	
Участници:	
1. доц. д-р Андрей Иванов Чорбанов 2. гл.ас. д-р Николина Михайлова Михайлова 3. докторант Илиан Константинов Манойлов 4. докторант Силвия Любенова Брадянова	(ДО) (ДО)
Партньорска организация:	
Участници:	
Партньорска организация:	
Участници:	

¹ Отбележете академичната длъжност, научната степен, име и фамилия на всеки участник като включите и участниците, които са работили по проекта не през целия период за изпълнение на проекта

² Отбележете дали участникът в колектива е млад учен (МУ), постдокторант (ПД), докторанти (ДО) или студенти (СТ), или учен от чужбина (УЧ).



Постигнати резултати от изпълнението на проекта и кратък анализ на тяхната приложимост (до 1 стр. в рамките на полето по-долу)

Синтезирани са магнитни наночастици (MNPs) с различен среден размер. Определен е оптималния среден размер на MNPs - 6.64 nm, получени при скорост на разбъркване 1500 rpm и pH 13.7. Получени са функционализирани MNPs с APTES, TEOS+APTES и хитозан с определено количество аминогрупи, съответно 0.028, 0.016 и 0.024 meqv/g и със среден размер съответно - 8.18 nm, 11.4 nm и 8.31 nm. Определено е, че MNPs модифицирани с APTES имат най-висока степен на имобилизация на протеин – 28.5% и са подходящи носители за имобилизация на анти-ентеротоксин А антицяло. Синтезирани са две флуоресцентни багрила DR110 и Alexa 488, изследвана е тяхната степен на свързване с имуноглобулин G и е сравнена със свързването на комерсиалното багрило FITC с имуноглобулин G. Получено е, пречистено и е доказано мише моноклонално антицяло срещу ентеротоксин А чрез Wester blot анализ и ELISA. Получени са F(ab')₂ фрагменти от моноклоналното антицяло чрез ензимна хидролиза, с последващо пречистване и доказване чрез имунофлуоресцентен анализ. Допълнително е синтезиран овче серум с висок титър (1:156 250), доказващ наличието на поликлонално антицяло срещу ентеротоксин А. Поликлоналното антицяло е пречистено чрез афинитетна и йонна хроматография. Определени са оптималните условия за имобилизация на получените моноклонално антицяло, F(ab')₂ фрагменти, поликлонално антицяло – концентрация на антицяло 1 mg/ml, време 2h, 22°C. Установено е, че имобилизираното моноклонално антицяло запазва активността на свободното антицяло – афинитетната константа на свободното антицяло K_a е $1.7 \times 10^9 M$, а на имобилизираното антицяло е $1.3 \times 10^8 M$. Получени са, пречистени и доказани флуоресцентните конкурентни конюгати SEA-ATTO620, SEA-FITC и SEA-DR110. Установено е, че двойката конюгати SEA-ATTO620, SEA-FITC са по-подходящи за съвместно определяне на два токсина в една проба, поради липса на припокриване на абсорбционните и емисионните им максимуми. Определени са оптималните условия за протичане на отделните имунофлуоресцентните анализи на базата на имобилизирани моноклонално антицяло, F(ab')₂ фрагменти, поликлонално антицяло – оптимална концентрация на имобилизирано антицяло и на конюгат. Определени са аналитичните характеристики на отделните имуноанализи за определяне на ентеротоксин А в буфер: с произведеното моноклонално антицяло – линеен интервал 0.001 – 20 ng/ml; LOD 0.9 pg/ml; с произведеното поликлонално антицяло 0.005 – 100 ng/ml; LOD 4.8 pg/ml; с получените фрагменти на моноклоналното антицяло 0,0005 – 0.3 ng/ml; LOD 0.49 pg/ml; със закупено моноклонално антицяло – 0.25 – 20ng/ml; LOD 230 pg/ml. Установено е, че линейният измервателен интервал и границата на откриване на ентеротоксин А в мляко са леко изместени към по-високи концентрации на ентеротоксин А, поради влияние на сложния състав на млякото. Проведена е валидация на разработените имунофлуоресцентни анализи чрез определяне на аналитичния добив, коефициентите на вариация и възпроизводимостта. Разработен е бърз и чувствителен имунофлуоресцентен метод на базата на моноклонално и поликлонално имобилизирано антицяло срещу ентеротоксин А върху магнитни наночастици за определяне на ниски концентрации на SEA в мляко. Имуноанализът на базата на магнитни наночастици има следните предимства: бърз анализ (30 минути), реакцията се извършва в псевдо-хомогенен разтвор, който осигурява интензивен контакт, ускорена имунореакция и висока чувствителност на анализа.



ФОНД
НАУЧНИ
ИЗСЛЕДВАНИЯ

Министерство на образованието и науката

