

ВИЗНАЧЕННЯ Т-2 ТОКСИНУ ЗА ДОПОМОГОЮ ІМУНОСЕНСОРА НА ОСНОВІ ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ

О. С. Гойстер¹ ¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ
Г. О. Хмельницький²
С. В. Дзядевич³ ²Національний університет біоресурсів та природокористування України,
Київ
В. І. Назаренко¹
О. Г. Мінченко¹ ³Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

E-mail: gojsterO@ukr.net

Досліджено можливість використання оптичного імунного біосенсора на основі ефекту поверхневого плазмонного резонансу для експресного визначення трихотеценового мікотоксину Т-2 в розчинах. Запропоновано два варіанти визначення Т-2 токсину за допомогою імуносенсора: «прямий» аналіз, що забезпечує граничну межу визначення сенсора на рівні 20 нг/мл, та «конкурентний» — 1 нг/мл. Проаналізовано ефективність використання органічних сполук — поліелектролітів та тіолів — для модифікації чутливої поверхні спектрометра поверхневого плазмонного резонансу у випадку «прямого» визначення Т-2 токсину в розчинах. Застосування модифікації поверхні додекантіолом дає змогу досягти межі визначення сенсора на рівні 5 нг/мл, поліелектролітом — 2 нг/мл у разі використання як полі-, так і моноклональних антитіл.

Ключові слова: іммобілізація, Т-2 токсин, поверхневий плазмонний резонанс, поліелектроліти, додекантіол.

Трихотеценові мікотоксини, серед яких найбільш небезпечним є Т-2 токсин, дуже отруйні. Навіть низькі концентрації призводять до порушення обміну речовин і зниження резистентності організму до інфекційних захворювань, а затяжний перебіг хвороби завершується летально.

Одним зі способів, що послаблюють вплив мікотоксинів на організм, є активація ензимних систем, які беруть участь в їх метаболізмі. Основною реакцією, яка забезпечує детоксикацію мікотоксинів в організмі, є окиснення їх цитохромом Р-450. Цей ефект зумовлений тим, що при окисненні мікотоксини стають водорозчинними, зазнають метаболічних перетворень і видаляються з організму [1]. Важливими заходами на шляху запобігання отруєнню мікотоксинами є застосування сорбентів [2] та пробіотичних мікроорганізмів [3], однак для їх використання потрібно провести експресдіагностику наявності мікотоксинів у кормах. Слід наголосити, що в останні роки проблема мікотоксинів стає дедалі гострішою. Це пов'язано з численними факторами: зміною кліматичних умов, розширенням торгівлі зерном та іншими компонентами кормів,

зниженням стійкості сільськогосподарських тварин до мікотоксинів. У цій ситуації актуальним є пошук експресних методів їх визначення в об'єктах довілля.

Свого часу дуже ефективним виявилось введення в практику аналізу мікотоксинів за допомогою радіоімунного аналізу (РІА) та імунохімічного аналізу (ІХА). Одержання специфічних антитіл до Т-2 токсину дозволило розробити чутливі методи визначення цього токсину [4, 5]. Варіант РІА для визначення Т-2 токсину в біологічних рідинах забезпечував чутливість на рівні 5 нг/мл [5]. Розвиток можливостей ІХА відбувався як через пошук шляхів отримання різних типів антитіл, так і створення різних методичних схем його виконання. Так, було розроблено метод визначення Т-2 токсину в екстракті із забрудненого мікотоксинами ячменю за допомогою двох видів моноклональних антитіл. Визначення здійснювали за типом конкурентного інгібування, чутливість методу становила 50 нг/мл [6]. У роботах деяких авторів застосування ELISA-методу уможливило визначення Т-2 токсину з межею виявлення 30 нг/мл з використанням як полі- [7], так і моноклональних

антитіл [8]. В іншому випадку моноклональні антитіла до Т-2 токсину були кон'юговані з пероксидазою хрому і використовували у варіанті «конкурентного» визначення мікотоксину, при цьому чутливість аналізу досягала 10 нг/мл [9]. Також застосовували й інші методи ідентифікації мікотоксинів. Зокрема, комбінація методів газорідної хроматографії з мас-спектрометрією (ГРХ–МС) стала стандартною для визначення мікотоксинів як у сільгосппродуктах, так і в біомедичних зразках, а її чутливість сягає 1 нг/мл [10].

Використання біодатчиків на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР) набуває дедалі більшої популярності у фундаментальних біологічних дослідженнях, клінічній діагностиці та екологічному контролі. Багато досліджень спрямовано на пошук нових підходів до оптимізації умов іммобілізації біологічного матеріалу для ППР-сенсорів. Найбільш поширеними є орієнтоване включення біологічних молекул у плівки Ленгмюр-Блоджет різного складу або ж попередня іммобілізація на поверхні протеїну А зі *Staphylococcus aureus*, що мають спорідненість до Fc-фрагмента IgG [11].

Раніше нами було розроблено один із варіантів оптичного імуноного біосенсора на основі еліпсометрії повного внутрішнього відбиття (ЕПВВ), що дозволяє визначити Т-2 токсин «прямим» методом аналізу із застосуванням модифікації поверхні поліелектролітами в діапазоні концентрацій 0,15–1000,0 нг/мл [12]. Слід зазначити, що застосування експериментальної установки ЕПВВ, побудованої на основі комерційного еліпсометра M 2000 V J. A. Woollam (Англія, Шеффілд), незважаючи на високу чутливість визначення, обмежено проходженням світлового променя крізь досліджуване середовище та великими розмірами комірки (1,5 мл).

Метою роботи було розроблення «прямого» та «конкурентного» методів імуносенсорного визначення Т-2 токсину в розчинах з використанням полі- та моноклональних антитіл на основі використання оптичного сенсора з ефектом ППР, розробленого в Україні.

Матеріали і методи

Т-2 токсин (C₂₄H₃₄O₉, M = 466,5), наданий нам Інститутом птахівництва УААН, є низькомолекулярною, безбарвною, кристалічною, хімічно стабільною та термостійкою сполукою, що погано розчиняється у воді та

помірно в полярних рідинах. Для виготовлення робочих розчинів використовували 50%-й маточний розчин Т-2 токсину в етанолі. Питання щодо впливу органічних розчинників на аналітичні можливості імуноензимних систем давно дискутують у літературі. У більшості робіт встановлено, що застосування будь-якого розчинника знижує чутливість визначення, однак опубліковано дані й про те, що проведення імуноензимного аналізу (ІЕА) є можливим у сумішах з 50%-м вмістом метанолу [13]. Для визначення Т-2 токсину використовували поліклональні антитіла кроля проти бичачого сироваткового альбуміну (БСА), отримані нами на базі віварію Національного аграрного університету, та моноклональні антитіла (monoclonal anti-T2 toxin, clone T2-50, product number T4786, lot number 041H4842, 0,5 ml) фірми Sigma (США).

Усі експерименти виконували в 0,01 М натрійфосфатному буфері, рН 7,4, що містив 0,14 М хлористого натрію (ФБР), нез'язані компоненти відмивали ФБР з 0,05% Твін-20.

У зв'язку з тим, що Т-2 токсин не має імуногенних властивостей, його слід було кон'югувати протеїновими носіями. Для цього синтезували гаптен Т-2 токсину шляхом взаємодії Т-2 з бурштиновим альдегідом з подальшим приєднанням до гаптену молекули протеїну за карбоксильною групою [14]. Отримані антитіла мали найвищу зв'язувальну здатність до Т-2 токсину, меншу — до НТ-2 токсину і найменшу — до Т-2 тріолу. Перехресна реакція антитіл з неосоланіолом, Т-2 тетраолом і 8-ацетилнеосоланіолом була дуже слабкою. Діацетоксикирпенол, триходермін та верукарин не мали перехресної реакції з антитілами сироватки [14]. Кон'югат Т-2-БСА використовували для імунізації тварин, а для проведення імунохімічних досліджень — Т-2-желатин (Т-2-ЖЛ) адсорбований на твердій поверхні.

Імунізацію кролів здійснювали відповідно до загальноприйнятої схеми з дворазовим внутрішньошкірним введенням 50%-ї водної емульсії кон'югату Т-2-БСА з повним ад'ювантом Фрейнда і чотириразовим введенням кон'югату у фізіологічному розчині [15]. Під час імунізації тварин використовували низькі навантаження імуногеном — до 200 мкг/тварину. Сироватку відбирали з крові вухної вени на 8-й день після реімунізації. Проведено три цикли імунізації кролів з інтервалом в один місяць. Отримані антисироватки розділяли на аліквоти і зберігали при –20 °С.

З метою вивчення зв'язувальної активності антисироваток проводили їх визначен-

ня на ППР-сенсорі. На поверхні перетворювача іммобілізували кон'югат Т-2-ЖЛ у концентрації 50 мкг/мл. Наступним кроком було нанесення на чутливу поверхню 1%-го овальбуміну (ОВ) з метою зменшення неспецифічного сигналу біосенсора. Останніми вносили розчини поліклональних антисироваток та моноклональних антитіл у діапазоні розведень від 1:100 до 1:50 000. Відгук біосенсора був пропорційним вмісту специфічних антитіл у пробі.

Оскільки для детектування фумонізину В1 було застосовано спосіб «прямого» визначення імуносенсором з ефектом ППР [16], ми вирішили застосувати цей метод для визначення Т-2 токсину. З цією метою на чутливій золотій поверхні ППР-приладу іммобілізували полі- чи моноклональні антитіла, розведені зі стандартних проб у 5 000 чи 10 000 разів відповідно та інкубували протягом 20 хв. Після відмивання буфером і заповнення «вільних» місць зв'язування на поверхні 1%-м овальбуміном у вимірювальну комірку вносили розчини Т-2 токсину в різних концентраціях і будували калібрувальну криву.

Для підвищення чутливості та стабільності відгуку біосенсора у разі «прямого» визначення Т-2 токсину поверхню перетворювача модифікували за допомогою додекантіолу. Спочатку його 98%-й розчин витримували на поверхні протягом 18 год. Потім поверхню перетворювача відмивали 50%-м етиловим етанолом. У вимірювальну комірку вносили розчин буфера для отримання базової лінії, після чого на золотій поверхні проводили іммобілізацію протеїну А. Далі здійснювали «пряме» визначення Т-2 токсину. При цьому спостерігався зсув резонансного кута, величина якого була пропорційною концентрації вільного Т-2 токсину в розчині.

Для досягнення мети роботи потрібно було також встановити вплив модифікації золотої поверхні перетворювача за допомогою поліелектролітів та орієнтації антитіл за допомогою протеїну А на чутливість визначення Т-2 токсину в розчинах. Для цього на поверхню перетворювача спочатку іммобілізували поліаліламіну гідрохлорид (Aldrich, Німеччина) з розчину, що мав концентрацію 1 мг/мл, а потім протеїн А зі *Staphylococcus aureus* (Sigma) в концентрації 1 мг/мл. Після цього здійснювали іммобілізацію антитіл з розчинів поліклональної антисироватки та моноклональних антитіл і вносили розчин Т-2 токсину в концентрації від 0,1 нг/мл до 100 мкг/мл.

У разі «конкурентного» визначення Т-2 мікотоксину резонансний кут реєстрували після введення у вимірювальну комірку буфера ФБР. Потім заповнювали її розчином кон'югату Т-2-ЖЛ, який інкубували протягом 20 хв при кімнатній температурі. Комірку промивали буфером для видалення не зв'язаного на поверхні сенсора надлишку кон'югату, після чого вимірювали зсув резонансного кута. Для запобігання подальшому неспецифічному зв'язуванню компонентів сироватки на поверхні перетворювача в комірку вносили 1%-й розчин ОВ. Після промивання комірку заповнювали розчином поліклональної антисироватки або моноклональних антитіл (у визначеному розведенні) та розчином чистого Т-2 токсину в діапазоні концентрацій від 0,01 нг/мл до 10 мкг/мл у співвідношенні 1:1. Час інкубації для кожної проби становив 10 хв.

Спектрометр поверхневого плазмонного резонансу Плазмон-SPR-4М і супутнє обладнання (сенсорні платівки, виготовлені з кварцевого скла з напиленими на них шарами хрому і полікристалічного золота, та проточну кювету об'ємом 0,1 мл) було розроблено та виготовлено в Інституті фізики напівпровідників НАН України.

Здійснюючи інтерпретацію даних, одержаних методом ППР, виходили з того, що зміна величини кута ППР (відгук ППР) прямо пропорційна поверхневій концентрації протеїну.

Результати та обговорення

Розробку імуного біосенсора, призначеного для «прямого» визначення Т-2 токсину, розпочинали зі встановлення оптимальної концентрації компонентів, які беруть участь у специфічній реакції. З метою виявлення оптимальної концентрації кон'югату на поверхню перетворювача спочатку наносили Т-2-ЖЛ для отримання базової лінії, а потім послідовно визначуваний нами кон'югат у різних концентраціях. Тривалість інкубації становила 20 хв. Далі поверхню промивали ФБР. У процесі спостереження за адсорбцією кон'югату, якщо концентрація Т-2-ЖЛ досягала 50 мкг/мл і вище, значних змін резонансного кута вже не спостерігали (рис. 1). Це означає, що кількість вільних місць зв'язування була мінімальною, а концентрація кон'югату — оптимальною для створення щільного моношару. Цю концентрацію Т-2-ЖЛ (50 мкг/мл) використовували в усіх подальших експериментах.

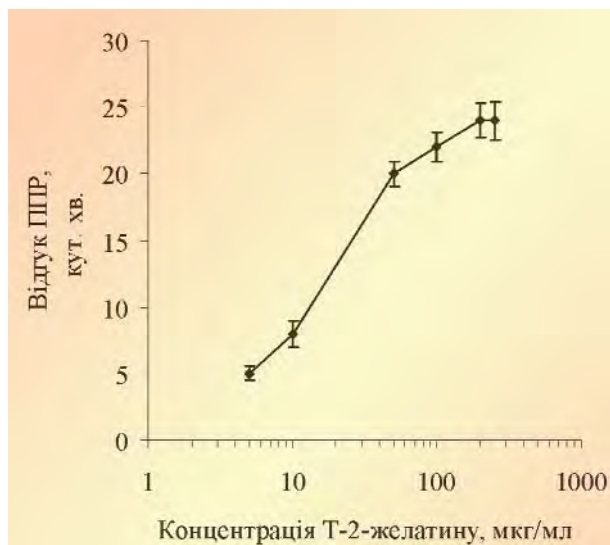


Рис. 1. Величина зсуву резонансного кута за різних концентрацій кон'югату Т-2 токсин — желатин. Вимірювання проводили в ФБР; концентрацію кон'югату змінювали, послідовно додаючи концентровані розчини Т-2-ЖЛ

Як видно з рис. 2 (крива 1), внесені в комірку поліклональні антисироватки, отримані проти Т-2-БСА, дозволяють реєструвати достовірні зміни відгуку біосенсора в розведенні 1:5 000 (не менше 2 кут. хв.). Оптимальний титр моноклональних антитіл для імуносенсорних досліджень становить 1:10 000 (рис. 2, крива 2). Використання більших розведень антисироваток зумовлює меншу наповненість золотої плівки адсорбованими антитілами, що, в кінцевому підсумку, зменшить чутливість визначення Т-2 токсину.

Відповідно до вищеописаної методики було показано принципову можливість «прямого» визначення Т-2 токсину з межею виявлення 20 нг/мл. Це та концентрація токсину, за якої величина відгуку в 3 рази перевищувала рівень шумів нашої системи. Вірогідний результат отримували тоді, коли величина відгуку була не меншою 2 кут.хв. Межа виявлення досліджуваного мікотоксину з використанням моноклональних антитіл така сама, як і в разі застосування поліклональних антисироваток (рис. 3 і 4, крива 1).

З метою цілеспрямованої орієнтації рецепторних центрів молекул антитіл від поверхні сенсора було застосовано додекантіол. Вкрита шаром додецильних угруповань поверхня сенсора здатна до гідрофобних взаємодій з молекулами протеїну А, що їх іммобілізували на поверхні з метою орієнтації антитіл. Протеїн А, зв'язуючи

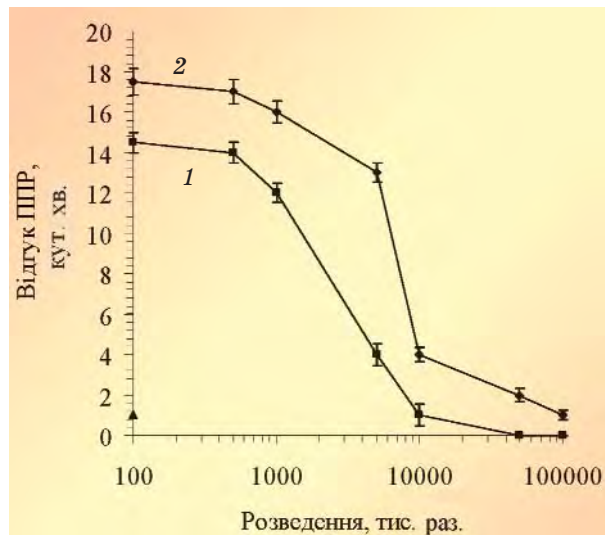


Рис. 2. Величини відхилення резонансного кута імуно-сенсора при встановленні титру поліклональних антисироваток (1) та моноклональних антитіл (2). Вимірювання проводили в ФБР; як контроль використовували сироватки не імунізованих кролів

сайт Ig в ділянці Fc-фрагмента, сприяє експонуванню його F(ab)₂-фрагментів у розчині. Таким чином, він не тільки дозволяє запобігти небажаним конформаційним змінам у структурі антитіл, що виникають унаслідок їх взаємодії з твердою поверхнею, але й забезпечує спрямоване експонування антигенз'язувальних центрів у розчині, а також дозволяє проводити іммобілізацію імуноглобуліну (Ig G) безпосередньо із сироватки крові [11].

Застосована нами модифікація забезпечує не тільки більшу стабільність іммобілізованих імуних компонентів і кращу відтворюваність результатів, але й підвищує межу виявлення мікотоксину «прямим» методом до 5 нг/мл (рис. 3 і 4, крива 2).

Також було показано, що використання поліелектролітів уможливує отримання більшого сигналу на основі ППР порівняно з тим, коли на її поверхні, вкритій шаром золота, іммобілізували імунні компоненти простою фізичною сорбцією або за допомогою додекантіолу. Модифікація поверхні ПАА дозволяє визначати Т-2 токсин «прямим» методом з використанням як поліклональних, так і моноклональних антитіл з межею виявлення 2 нг/мл. Насичення сайтів антитіл Т-2 токсинном відбувається при його концентраціях до 1 мкг/мл, і Т-2 токсин, нанесений на поверхню пертворювача в концентраціях від 1 до 100 мкг/мл, не викликає зміни відгуку резонансного кута ППР біосенсора (рис. 3 і 4, крива 3).

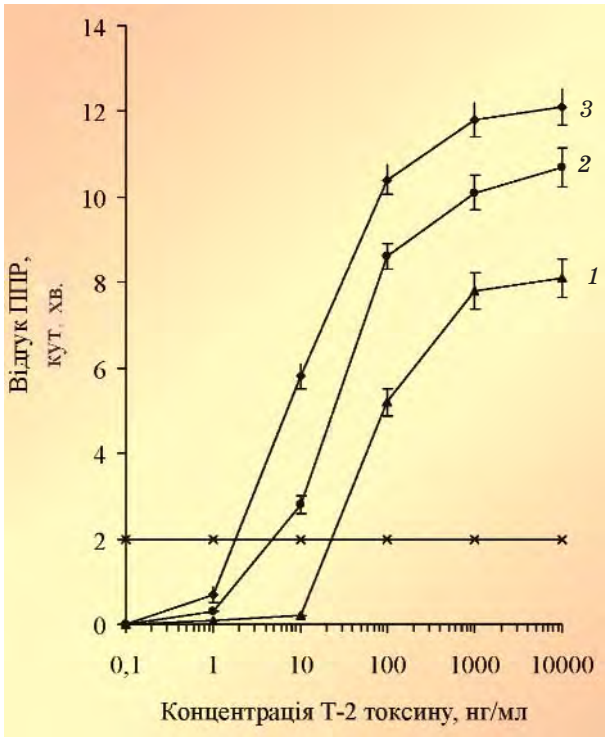


Рис. 3. Визначення концентрації Т-2 токсину «прямим» методом за допомогою імуносенсора на основі ППР з використанням поліклональних антитіл за умови модифікації поверхні перетворювача поліелектролітом (крива 3), додекантіолом (крива 2) та без модифікації поверхні (крива 1). Вимірювання проводили в ФБР; як контроль використовували поверхню без модифікації поліелектролітами чи додекантіолом

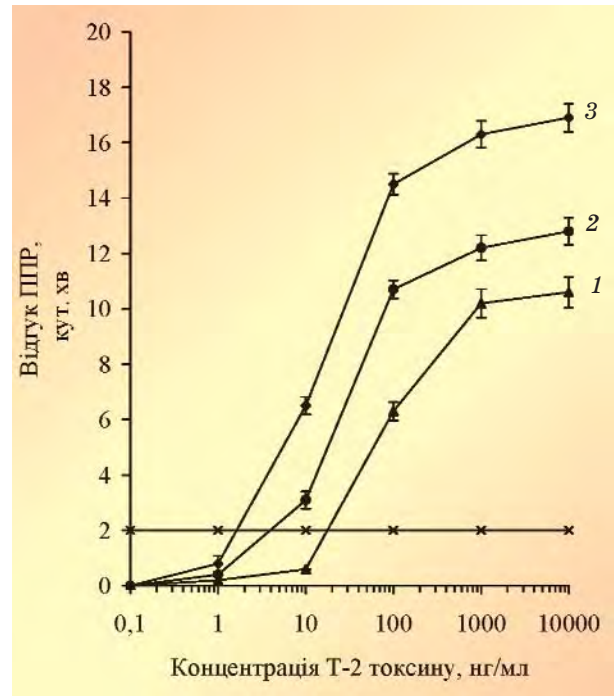


Рис. 4. Визначення концентрації Т-2 токсину «прямим» методом за допомогою імуносенсора на основі ППР з використанням моноклональних антитіл за умови модифікації поверхні перетворювача поліелектролітом (крива 3), додекантіолом (крива 2) та без модифікації поверхні (крива 1). Вимірювання проводили в ФБР; як контроль використовували поверхню без модифікації поліелектролітами чи додекантіолом

Методологія виконання «конкурентного» біосенсорного аналізу така сама як й імуноензимного «конкурентного» аналізу: вільний Т-2 токсин, що міститься в досліджуваних розчинах, конкурує з Т-2, іммобілізованим на поверхні перетворювача за специфічні сайти зв'язування на антитілах, унаслідок чого відбувається зменшення зсуву резонансного кута (рис. 5). Встановлено, що «конкурентний» імуносенсорний аналіз дозволяє визначити Т-2 токсин у розчинах з межею виявлення 1 нг/мл у діапазоні концентрацій від 1 нг/мл і майже до 1000 нг/мл.

Практично однакову ефективність застосування полі- і моноклональних антитіл в імунохімічних аналізах для визначення Т-2 токсину продемонстровано в роботах інших авторів [7, 8]. Можна припустити, що як полі-, так і моноклональні антитіла теоретично мають рівні можливості щодо забезпечення чутливості аналізу за рахунок достатньої оптимізації умов проведення імуносенсорного аналізу. Зокрема, це адек-



Рис. 5. Визначення Т-2 токсину «конкурентним» методом за допомогою оптичного біосенсора. Вимірювання проводили в ФБР; як контроль використовували сироватки не імунізованих кролів

ватний підбір імунореагентів та способів модифікації чутливої поверхні, що дозволяє підвищити чутливість аналізу завдяки досягненню високої щільності упізнавальних структур на поверхні та їх спрямованої експозиції у бік розчину.

Таким чином, використовуючи імунний біосенсор на основі поверхневого плазмонного резонансу, можна проводити визначення Т-2 токсину за «прямим» варіантом аналізу з межею виявлення 20 нг/мл і робочим діапазоном концентрацій у межах 20–1 000 нг/мл. Хоча цей метод є простішим у виконанні, однак не перевершує чутливості «конкурентного» варіанта, який демонструє мож-

ливість визначення концентрації мікотоксину Т-2 з межею виявлення 1 нг/мл.

Встановлено, що відгук ППР-сенсора при застосуванні «прямого» варіанта аналізу суттєво збільшується, якщо поверхню перетворювача попередньо модифікувати за допомогою додекантіолу (5 нг/мл). У разі модифікації поверхні поліелектролітами межа виявлення цього методу із застосуванням поліклональних антисироваток та моноклональних антитіл становить 2 нг/мл. Таким чином, «прямий» метод визначення Т-2 токсину із застосуванням модифікації є простим і водночас достатньо чутливим для проведення аналізу Т-2 токсину.

ЛІТЕРАТУРА

1. Головач Н. Структура та вплив мікотоксинів на живі організми // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. — 2007. — Вип. 43. — С. 33–47.
2. Бакутин Б. И. Трихотецены: как нейтрализовать эти опасные микотоксины // Журн. Комбик. — 2007. — №8. — С. 69–70.
3. Труфанов А. В. Профілактична дія *Vacillus subtilis* при Т-2 та НТ-2 токсикозах курчат // Совр. пробл. токсикол. — 2007. — №4. — С. 31–34.
4. Chu F. S., Grossman S., Mirocha C. J. Production of antibody against T-2 toxin // Appl. Environ. Microbiol. — 1979. — V. 73, N1. — P. 104–108.
5. Lee S., Chu F. S. Radioimmunoassay of T-2 toxin in corn and wheat // J. Ass. Anal. Chem. — 1981. — V. 64, N1. — P. 156–161.
6. Hunter K. W., Brinfield A. A., Miller M. et al. Preparation and characterization of monoclonal antibodies to the trichothecene mycotoxin T-2 // Appl. Environ. Microbiol. — 1985. — V. 49, N1. — P. 168–172.
7. Кононенко Г. П., Буркин А. А., Соболева Н. А. и др. Иммуноферментный метод определения Т-2 токсина в контаминированном зерне // Прикл. биохим. и микробиол. — 1999. — Т. 35, №4. — С. 457–462.
8. Yoshizawa T., Kohno K., Ikeda K. et al. A practical method for measuring deoxinivalenol, nivalenol and T-2 + НТ-2 toxin in foods by an enzyme — linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 2004. — V. 68, N10. — P. 2076–2085.
9. Ramakrishna N., Lacey J., Candlish A. A. et al. Monoclonal antibody-based enzyme linked immunosorbent assay of aflatoxin B1, T-2 toxin, and ochratoxin A in barley // J. Ass. Anal. Chem. — 1990. — V. 73, N1. — P. 71–76.
10. Niels K. F., Thran U. Fast methods for screening of trichothecenes in fungal cultures using gas chromatography-tandem mass spectrometry // J. Chromatogr. — 2001. — V. 929, N1–2. — P. 75–78.
11. Стародуб Н. Ф., Стародуб В. М. Ориентированная иммобилизация узнающих элементов биосенсорных датчиков // Укр. біохім. журн. — 2003. — Т. 75, №2. — С. 14–24.
12. Nabok A. V., Tsargorodskaya A., Holloway A. et al. Registration of T-2 mycotoxin with total internal reflection ellipsometry and QCM impedance methods // Biosens. Bioelectron. — 2007. — V. 22, N6. — P. 885–890.
13. Laamanen I., Veijalainen P. Factors affecting the results of T-2 mycotoxins ELISA assay // Food Addit. Contam. — 1992. — V. 9, N4. — P. 337–343.
14. Chu F. S., Grossman S., Mirocha C. J. Production of antibody against T-2 toxin // Appl. Environ. Microbiol. — 1979. — V. 73, N1. — P. 104–108.
15. Антитела. Методы / Под ред. Кэтти Д. М. — Мир, 1991. — Т. 1. — 287 с.
16. Mullet W., Lai E. P., Yeung J. M. Immunoassay of fumonisins by a surface plasmon resonance biosensor // Anal. Biochem. — 1998. — V. 258. — P. 161–167.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ Т-2 ТОКСИНА
МЕТОДОМ ПОВЕРХНОСТНОГО
ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА**

*О. С. Гойстер*¹
*Г. А. Хмельницький*²
*С. В. Дзядевич*³
*В. И. Назаренко*¹
*А. Г. Минченко*¹

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

²Национальный университет биоресурсов
и природопользования Украины, Киев

³Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев

E-mail: gojsterO@ukr.net

Исследована возможность использования оптического иммунного биосенсора с эффектом поверхностного плазмонного резонанса для экспрессного определения трихотеценового микотоксина Т-2 в растворах. Предложены два варианта определения Т-2 токсина с помощью иммуносенсора: «прямой» анализ, обеспечивающий границу определения сенсора на уровне 20 нг/мл, и «конкурентный» — 1 нг/мл. Проанализирована эффективность использования органических соединений — полиэлектролитов и тиолов — для модификации чувствительной поверхности спектрометра поверхностного плазмонного резонанса при «прямом» определении Т-2 токсина в растворах. Использование модификации поверхности додекантиолом дает возможность достичь границы определения сенсора на уровне 5 нг/мл, полиэлектролитом — 2 нг/мл в случае применения как поли-, так и моноклональных антител.

Ключевые слова: иммобилизация, Т-2 токсин, поверхностный плазмонный резонанс, полиэлектролит, додекантиол.

**T-2 TOXIN DETERMINATION
BY SURFACE PLASMON
RESONANCE**

*O. S. Gojster*¹
*G. O. Khmel'nitsky*²
*S. V. Dzyadevych*³
*W. I. Nasarenko*¹
*O. H. Minchenko*¹

¹Palladin Institute of Biochemistry,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

²National Agricultural University, Kyiv

³Institute of Molecular Biology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: gojsterO@ukr.net

A possibility of application of optimal immune biosensor based on surface plasmon resonance for express determination of trichotecen mycotoxin T-2 in solution has been investigated. Two variants of T-2 toxin determination by surface plasmon resonance immunosensor method have been proposed. It was shown opportunity of «direct» determination of T-2 with the detection limit of about 20 ng/ml and for «competitive» mode with the detection limit on the level of about 1 ng/ml. The effectiveness of application of such organic compounds as polyelectrolytes and thiols for sensible surface modification of SPR spectrometer for T-2 analysis in solutions was studied. Direct determination by using dodecanethiol and polyelectrolyte for surface modification allows to determine T-2 toxin at levels of 5 ng/ml and 2 ng/ml accordingly in case of using both poly- and monoclonal antibodies.

Key words: immobilization, T-2 toxin, surface plasmon resonance, polyelectrolyte, dodecanthiol.