

УДК 602.1:53.082.9:615.099

ВИЗНАЧЕННЯ Т-2 ТОКСИНУ ЗА ДОПОМОГОЮ ІМУНОЕНЗИМНОГО ТА ІМУНОСЕНСОРНОГО МЕТОДІВ

О. С. Гойстер¹В. Є. Кривенчук²Г. О. Хмельницький³О. Г. Мінченко¹¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ²Інститут фармакології і токсикології НАМН України, Київ³Національний університет біоресурсів та природокористування України, Київ

E-mail: gojsterO@ukr.net

Отримано 15.05.2013

Метою роботи було розроблення методів визначення Т-2 токсину за допомогою імуноензимного та імуносенсорного аналізів. Для досягнення цієї мети здійснено кон'югування Т-2 токсину з протеїнами для отримання антитіл, вивчено специфічність антитіл методами імунохімічного аналізу. Показано, що в реалізації імуногенних властивостей гаптену Т-2 важлива роль належить вибору протеїну-носія. Визначена імуноензимним та імуносенсорним методами зв'язувальна активність IgG-фракції суттєво не відрізняється від активності антисироваток. Тривалість тестування однієї антисироватки чи імуноглобулінів імуносенсорним методом становила 10–15 хв, при цьому в разі одночасного тестування великої кількості дослідного матеріалу доцільніше використовувати імуноензимний метод. Запропоновано два варіанти визначення Т-2 токсину в «конкурентному» режимі імунохімічного аналізу: метод твердофазного конкурентного імуноензимного аналізу, що забезпечує виявлення Т-2 токсину від 10 нг/мл, та імуносенсорний метод на основі ефекту поверхневого плазмонного резонансу — від 1 нг/мл. Розроблені методи можуть бути використані для визначення вмісту Т-2 токсину в продуктах харчування та кормах у концентраціях від 1 до 500 нг/мл.

Ключові слова: Т-2 токсин, кон'югати, антитіла, імуноензимний аналіз, імунний біосенсор.

Під час токсикологічного дослідження кормів доцільно визначати рівень вмісту тих мікотоксинів, які прийнято вважати найшкідливішими з погляду впливу на здоров'я та продуктивність тварин і птахів. Це, зокрема, стосується Т-2 токсину, який належить до групи найбільш токсичних трихотеценових мікотоксинів і є одним із головних чинників аліментарної токсичної алейкії (септичної ангіни) людей та фузаріотоксикозів тварин. Він належить до сильнодійних низькомолекулярних інгібіторів синтезу протеїну в еукаріотів — грибів, рослин і тварин. Багатьма дослідженнями встановлено, що наявність Т-2 токсину в кормах щоденного раціону свиней знижує опір організму проти вірусних та бактеріальних інфекцій, що пов'язано з його імунодепресивними та канцерогенними властивостями [1]. Продукти тваринного походження, зокрема м'ясо і молоко, отримані від хворих на мікотоксикози тварин, становлять реальну загрозу для здоров'я людини, що потребує посиленого контролю за якістю як харчових продуктів тваринного походження, так і рослинної сировини.

Сучасні методи аналізу, зокрема газорідинна хроматографія або газова хроматографія в комбінації із мас-спектроскопією [2], широко використовуються за моніторингу мікотоксинів, дають змогу проводити аналіз із високою чутливістю одночасно кількох токсичних речовин, але є складними у виконанні. Твердофазний конкурентний імуноензимний аналіз (ELISA) як система детектування за чутливістю визначення, специфічністю, точністю та відтворюваністю не поступається більш досконалому методу — газорідинній хроматографії високого тиску з флуоресцентною детекцією [3], однак, незважаючи на високу специфічність антитіл, є довготривалим і потребує детальної оптимізації протоколів аналізу та високої кваліфікації виконавців [4].

Скринінг, який ґрунтується на біосенсорних технологіях, є менш технологічно складним та швидким методом, що зумовлено можливістю використання короткотривалої екстракції токсинів та їхніх метаболітів із забруднених продуктів харчування чи кормів [5].

Нещодавно було показано можливість «прямого» визначення Т-2 токсину за допо-

могою спектрометра Плазмон-SPR-4М, розробленого й виготовленого в Інституті фізики напівпровідників НАН України, з використанням поліклональних та моноклональних антитіл у діапазоні концентрацій від 20 до 1 000 нг/мл. Однак «пряме» визначення мікотоксинів (афлатоксину В₁ та охратоксину А) є недостатньо чутливим для виявлення їх у реальних зразках зернових культур [6].

Можливості застосування конкурентного імуноензимного та біосенсорного аналізів для визначення низьких регламентованих рівнів вмісту Т-2 токсину в реальних зразках вивчено недостатньо, оскільки утворення токсину в об'єктах довкілля відбувається нерівномірно [7]. Саме тому розвиток нових і вдосконалення старих методів визначення вмісту Т-2 токсину триває й досі.

Метою роботи було синтезувати імуногенні кон'югати Т-2 токсину з протеїнаміноносителями, отримати поліклональні антисироватки, специфічні до цього токсину, і розробити прості й високочутливі аналітичні схеми «конкурентного» визначення Т-2 токсину імуноензимним та імуносенсорним методами, які б могли набути практичного застосування.

Матеріали і методи

Т-2 токсин (C₂₄H₃₄O₉, М.м. = 466 Да), наданий для виконання роботи д. вет. н. Котиком А. Н. з Інституту тваринництва НААНУ, було одержано методом адсорбційної колонкової хроматографії за раніше описаним методом з екстракту культури на зерні штаму *Fusarium sporotrichioides* 2m-15-206 [8]. Кон'югати Т-2 токсину синтезували з бичачим сироватковим альбуміном (БСА) та желатиною фірми Sigma (США).

Синтез антигенів Т-2 токсину

У зв'язку з тим, що Т-2 токсин не має імуногенних властивостей, для одержання антитіл необхідно було зробити його кон'югати з БСА та желатиною. Схему синтезу кон'югатів Т-2 токсину зображено на рис. 1.

Спочатку синтезували гаптен Т-2 токсину шляхом його взаємодії з бурштиновим (янтарним) альдегідом з наступним приєднанням до нього протеїнової молекули за карбоксильною групою.

За молярного співвідношення гаптену Т-2 токсину до БСА 10:1 було одержано їх кон'югат, однак більша його частина випадала в осад. Отримати добре розчинний кон'югат Т-2 токсину вдалося із застосуван-

ням желатини. Кон'югат Т-2 токсину з желатиною було використано для адсорбції на твердій фазі для проведення імунохімічних аналізів, а кон'югат Т-2 токсину з БСА — з метою імунізації тварин.

Антитіла, одержані за допомогою таких кон'югатів, мають високу зв'язувальну здатність до Т-2 токсину і меншу — до НТ-2 токсину та Т-2 тріолу за незначної перехресної реакції з неосоланіолом, Т-2 тетраолом і 8-ацетилнеосоланіолом [9].

Отримання антисироваток до Т-2 токсину

Імунізацію кролів здійснювали відповідно до загальноприйнятої схеми [10]. Вона включала дворазове внутрішньошкірне введення 50% -ї водяної емульсії кон'югату Т-2 токсину з БСА та повним ад'ювантом Фрейнда і чотириразове уведення кон'югату у фізіологічному розчині. Під час імунізації тварин використовували низькі навантаження імуногеном — до 200 мкг/тварину. Сироватку відбирали з крові вушної вени на 8-й день після реімунізації. Проведено три цикли імунізації кролів з інтервалом в один місяць. Одержані антисироватки розділяли на аліквоти і зберігали при -20 °С. IgG із сироваток виділяли осадженням 33% -м амонію сульфатом з наступною хроматографією на ДЕАЕ-целюлозі безколонковим спо-

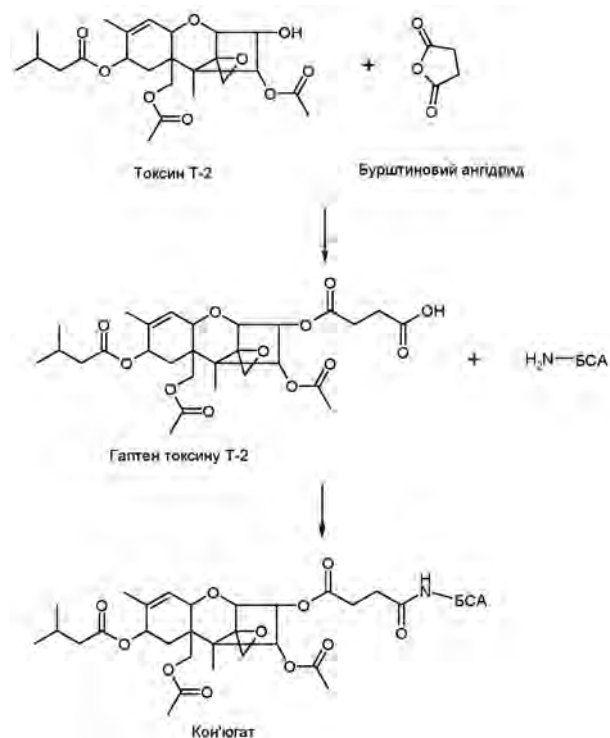


Рис. 1. Схеми синтезу кон'югату Т-2-БСА

собом. Діаліз здійснювали проти фосфатно-сольового буфера й визначали концентрацію протеїну за методом Лоурі.

Оцінка титру антисироваток у динаміці імунізації

Застосовували, передусім, імуноензимний аналіз. На полістирольних планшетах сорбували кон'югати Т-2 токсину з желатиною в концентрації 10 мкг/мл (визначено експериментально) протягом 24 год при 37 °С. Для блокування «вільних місць» на полістироловій поверхні з метою зменшення неспецифічного сигналу використовували 1% -й розчин овальбуміну, який інкубували впродовж 1 год. Далі в лунки вносили по 0,1 мл досліджуваних антисироваток (попередньо розведених у 100 разів) у послідовному дворазовому розведенні. Після кожного етапу лунки промивали фосфатно-сольовим буфером з 0,05% -м Твін-20. Далі аналіз проводили згідно зі стандартним методом виконання імуноензимного аналізу, використовуючи антикролячі антитіла кози, кон'юговані з пероксидазою хрому (Sigma, США). Для визначення пероксидазної активності як субстрат застосовували ортофенілєндіамін (Sigma, США). Раніше [11] було проведено порівняння чутливості визначення зв'язувальної активності антисироваток до Т-2 токсину за допомогою методу ELISA та імуносенсорним методом на основі ефекту поверхневого плазмонного резонансу.

Поставлення методу ELISA «конкурентним» шляхом

За цим методом вільний Т-2 токсин конкурував із кон'югатом Т-2 токсину з желатиною, іммобілізованою на поверхні, за місця зв'язування на антитілах, і кількість зв'язаних антитіл була обернено пропорційною концентрації досліджуваного антигену.

Для проведення імуноензимного аналізу використовували планшети з оптично прозорого полістиролу фірми Dinatex (Швейцарія). Результати імуноензимного аналізу детектували при 492 нм за допомогою вертикального спектрофотометра Сумаль РЕ-2 (Карл Цейс, Німеччина).

Відпрацювання алгоритму аналізу Т-2 токсину за допомогою імунного біосенсора на основі ППП

Спектрометр поверхневого плазмонного резонансу Плазмон-SPR-4М та супутнє обладнання (сенсорні платівки, виготовлені з кварцового скла з напиленими на них

шарами хрому і полікристалічного золота, та проточна кювета) було розроблено й виготовлено в Інституті фізики напівпровідників НАН України.

«Конкурентний» аналіз Т-2 токсину починали з реєстрації зміни резонансного кута після введення у вимірювальну комірку забуференого фізіологічного розчину. Потім заповнювали її розчином кон'югату Т-2 токсину з желатиною, який інкубували протягом 20 хв за кімнатної температури. 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 овальбуміну. Після промивання комірку заповнювали розчином, одержаним шляхом змішування розчинів антисироваток (у певному розведенні) і чистого Т-2 токсину в діапазоні концентрацій від 0,01 до 1 000 нг/мл у співвідношенні 1:1. Час інкубації для кожної проби становив 10 хв. Кожного разу комірку промивали забуференим фізіологічним розчином з 0,05% -м Твін-20 і реєстрували відгук імунного біосенсора. За інтерпретації даних, одержаних методом ППП, вважали, що зміна величини кута ППП (відгук ППП) обернено пропорційна поверхневій концентрації Т-2 токсину.

Підготовка зразків до аналізу

Для контролю вмісту Т-2 токсину в кормах у підсобному господарстві Національного університету біоресурсів та природокористування України було відібрано зразки зерна кукурудзи та дерті. Зразки продуктів харчування — вівсяних пластівців і гречки (свіжих та пліснявих, після 1–3 місяців зберігання) було вибрано довільно і взято для порівняльної демонстрації наявності Т-2 токсину в досліджуваних об'єктах. Для приготування екстрактів до наважок зернового матеріалу (1,0 г) в конічні пробірки об'ємом 10 мл додавали по 5,0 мл суміші ацетонітрилу і води у співвідношенні 5:1, перемішували та витримували 14–16 год за кімнатної температури. Потім відбирали аліквоту, фільтруючи суміш через паперовий фільтр, готували калібровані розчини й аналізували вміст Т-2 токсину імуноензимним та біосенсорним методами. Одержані дані обробляли статистично з використанням критерію Стьюдента.

Результати та обговорення

Сироватку крові, одержану після імунізації кролів кон'югатом Т-2 токсину з БСА, одночасно аналізували за допомогою імуноензимного методу та біосенсора з ефектом поверхневого плазмонного резонансу.

Антисироватки, отримані від кролів після першого циклу імунізації, як було встановлено нами імуноензимним методом, мали робочий титр в інтервалі 1:800 — 1:3 200. Наступні взяття крові дозволили одержати антисироватки з титром у межах 1:3 200 — 1:12 800. Такий титр після реімунізації (другого циклу імунізації) надалі практично не змінювався. Порівняльне визначення титру антисироваток проти кон'югату Т-2 токсину з БСА проводили методом «неконкурентного» імуноензимного аналізу. В результаті вимірювань було встановлено, що 50% -й рівень інтенсивності забарвлення комірок плати досягається за розведення антисироваток 1:9 600 (рис. 2). Визначена імуноензимним методом зв'язувальна активність імуноглобулінів суттєво не відрізняється від активності антисироваток (дані не наведено).



Рис. 2. Встановлення титру специфічних антисироваток кролів, імунізованих кон'югатом Т-2 токсину з БСА, неконкурентним методом ELISA: досліджених у межах 1:3 200 — 1:12 800 (0,01 М натрійфосфатний буфер, рН 7,4, що містив 0,05% -й твін-20, використовували для видалення нез'язаних антитіл)

Одержані результати дали змогу зробити наступний крок — перейти безпосередньо до визначення концентрації Т-2 токсину шляхом поставлення «конкурентного» імуноаналізу. Попередньо готували маточний розчин Т-2 токсину, для якого брали 50% -й етанол. Питання про вплив органічних розчинників на аналітичні можливості імуноензимних систем давно дискутуються в літературі. У більшості робіт встановлено, що застосування будь-якого розчинника зни-

жує чутливість визначення, але при цьому є дані про те, що можливе проведення імуноензимного аналізу в сумішах з 50% -м вмістом метанолу [12]. Наступні розведення здійснювали в забуференому фізіологічному розчині. Було одержано робочі розчини від 0,01 нг/мл до 10 мкг/мл. Рівень зв'язування антитіл (без Т-2 токсину) із твердою фазою в лунках приймали за 100%. Межею визначення аналізу вважали концентрацію Т-2 токсину, що спричинювала 20% -не гальмування зв'язування як вірогідно відмінне від 100% контролю. Конкурентні дослідження із введенням у процедуру імуноензимного аналізу розчинів Т-2 токсину показали, що поліклональні антисироватки, отримані нами проти Т-2 токсину з БСА, дають змогу досягти межі виявлення Т-2 на рівні 10 нг/мл з робочим діапазоном концентрацій від 10 до 1000 нг/мл (рис. 3).



Рис. 3. Калібрувальна крива методу ELISA для визначення Т-2 токсину: з використанням антисироватки проти Т-2-БСА та іммобілізованого кон'югату Т-2-желатина; n = 5

Розроблення імуноного біосенсора для визначення Т-2 токсину також розпочинали зі встановлення оптимальної концентрації компонентів, які беруть участь у специфічній реакції. Попередніми дослідженнями [11] встановлено, що оптимальна концентрація кон'югату Т-2 токсину з желатиною для імуносенсорних досліджень становить 50 мкг/мл. Було показано, що внесені у вимірювальну комірку антисироватки проти Т-2 токсину з БСА уможливають реєстрування вірогідних змін відгуку біосенсора в розведенні 1:5 000; оптимальна концентрація антитіл для імуносенсорних досліджень становить близько 10 мкг/мл. Наступні дослідження («конкурентний» аналіз Т-2) не виявили переваг у зв'язувальній активності антисироваток та імуноглобулінів з використанням як поліклональних, так і моноклональних антитіл (дані не наведено).

Слід зазначити, що тривалість тестування однієї антисироватки чи імуноглобулінів імуносенсорним методом становила 10–15 хв, що є зручним для проведення окремих аналізів. У разі одночасного тестування великої кількості дослідного матеріалу доцільніше використовувати імуноензимний метод.

Для порівняльного визначення Т-2 токсину за допомогою імуносенсора на основі ефекту поверхневого плазмонного резонансу також застосовували «конкурентний» аналіз. Методологія його виконання така сама, як і в імуноензимному «конкурентному» аналізі. Після іммобілізації кон'югату Т-2-ЖЛ (50 мкг/мл) та «блокування» вільних місць на поверхні 1%-м овальбуміном у комірку вносили суміш антисироватки в концентрації 10 мкг/мл і чистого Т-2 токсину в діапазоні відомих з імуноензимного аналізу концентрацій у співвідношенні 1:1. Встановлено, що у разі використання антисироваток проти Т-2 токсину з БСА імуносенсор на основі ефекту поверхневого плазмонного резонансу в «конкурентному» режимі аналізу дає змогу визначати Т-2 токсин у розчинах з межею виявлення 1 нг/мл; діапазон визначення становить 1–1000 нг/мл (рис. 4).

Для швидкої екстракції Т-2 токсину із зернових культур ми застосували розроблену раніше схему [12], яка передбачає пряме введення екстрактів зернового матеріалу в імуноензимному аналізі. На думку дослід-

ників, суміш ацетонітрил:вода (5:1) є близькою до азеотропної, що дає змогу в разі потреби проводити концентрування екстракту, тому її найчастіше використовують як екстрагент. При цьому вміст розчинника не повинен перевищувати 20% за наступного приготування суміші з антитілами. Враховуючи доцільність уніфікації етапів підготовки проб [13], ми також вибрали цю схему для екстракції токсину із зернового матеріалу.

Результати показали відсутність Т-2 токсину у зразках свіжих харчових продуктів при визначенні його вмісту за допомогою імуноензимного та імуносенсорного методів.

Інша ситуація спостерігалась у разі визначення концентрації Т-2 токсину в зразках продуктів харчування, що мали тривалий (1–3 міс) період зберігання. Методом ELISA було встановлено наявність цього токсину в пліснявих зразках вівсяних пластівців та гречки у концентраціях 400 і 450 нг/г, відповідно. За допомогою біосенсорного методу реєстрували Т-2 токсин у цих продуктах в концентраціях 390 і 410 нг/г, відповідно. Такий перерахунок зроблено з урахуванням співвідношення продукту та розчину, використовуюваного для екстракції, а також розведення вихідного екстракту перед аналізом [12].

У зразках кормів, відібраних у підсобному господарстві Національного університету

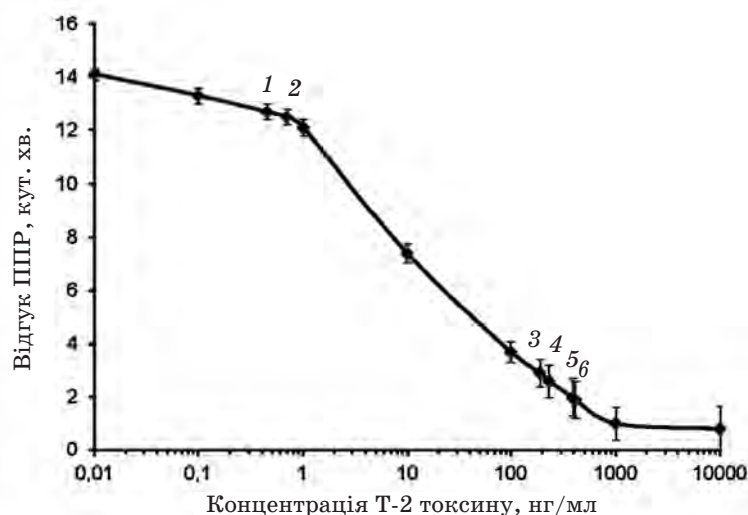


Рис. 4. Калібрувальна крива біосенсора на основі ППР при визначенні Т-2 токсину в «конкурентному» режимі аналізу:

з використанням антисироватки проти Т-2-БСА та іммобілізованого кон'югату Т-2-желатина у свіжих (1 — вівсяні пластівці; 2 — гречка) та пліснявих (3 — дерть; 4 — кукурудза; 5 — вівсяні пластівці; 6 — гречка) продовольчих зразках; $n = 5$

біоресурсів та природокористування України, методом ELISA виявили Т-2 токсин у зразках зерна кукурудзи та дерті в концентраціях 220 і 180 нг/г, відповідно. За допомогою імуносенсорного аналізу було знайдено Т-2 токсин у цих кормах у концентраціях 230 та 188 нг/г, відповідно. Попри те, що об'єм проаналізованих зразків був невеликим, показано принципову можливість використання розроблених нами методів для визначення Т-2 токсину в зразках кормів та продуктів харчування.

Таким чином, результати експериментів свідчать, що одержані нами кон'югати Т-2 токсину з такими протеїнами-носіями, як бичачий сироватковий альбумін та желатин, є оптимальними для використання в імунохімічних аналізах. Вони забезпечили високі титри антисироваток в ході тестування, а надалі — і високу чутливість визначення Т-2 токсину розробленими нами методами. Відпрацьований варіант «конкурентного»

ELISA дає змогу виявляти Т-2 токсин у розчинах з межею від 10 нг/мл. Встановлено, що в разі визначення Т-2 токсину за допомогою імуносенсора на основі ефекту поверхневого плазмонного резонансу та виконання аналізу «конкурентним» способом досягається межа виявлення на рівні 1 нг/мл. Одержані дані є початковим етапом застосування імуносенсорного аналізу для простого та чутливого визначення Т-2 токсину в об'єктах довкілля. Запропоновані нами нові імуносенсорні методи не поступаються за чутливістю імуноензимним методам аналізу і дозволяють визначати вміст Т-2 токсину в продуктах харчування та кормах у межах концентрацій від 1 до 500 нг/г.

Нормативні документи, які діють на сьогодні в нашій країні, визначають гранично допустимі концентрації вмісту Т-2 токсину в харчових продуктах на рівні 100 нг/г. Такий її рівень лежить у межах чутливості розроблених нами як ELISA-методу, так й імуносенсора.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Seeboth J., Solinac R., Oswald I. P. et al.* The fungal T-2 toxin alters the activation of primary macrophages induced by TLR-agonists resulting in a decrease of the inflammatory response in the pig // *Veter. Res.* — 2012. — V. 43. — P. 35–45.
2. *Busman M., Poling S. M., Maragos C. M.* Observation of T-2 Toxin and HT-2 Toxin Glucosides from *Fusarium sporotrichioides* by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) // *Toxins (Basel)*. — 2011. — V. 3, N 12. — P. 1554–1568.
3. *Andreotti N., Hassine A. et al.* Peptide binding to ochratoxin A mycotoxin: a new approach in conception of biosensors // *Biosens. Bioelectr.* — 2013. — V. 40, N 1. — P. 240–246.
4. *Li Y., Zhang Y., Shi W. et al.* Determination of T-2 toxin in milk: a comparison of three formats of immunoassays // *Anal. Lett.* — 2012. — V. 45. — P. 2425–2435.
5. *Mitchell J.* Small molecule immunosensing using surface plasmon resonance. A review // *Sensors*. — 2010. — V. 10, N 8. — P. 7323–7346.
6. *Adányia N., Levkovets I. A., Rodriguez-Gil S. et al.* Development of immunosensor based on OWLS technique for determining Aflatoxin B1 and Ochratoxin A // *Biosens. Bioelectr.* — 2007. — V. 22, N 6. — P. 797–802.
7. *Bryden W. L.* Mycotoxin contamination of the feed supply chain: implication for animal productivity and feed security // *Anim. Feed Sci. Technol.* — 2012. — V. 173. — P. 134–158.
8. *Котик А. Н., Чернобай В. Т., Комисаренко Н. Ф., Труфанова В. А.* Выделение микотоксина *Fusarium sporotrichioides* и изучение его физико-химических свойств // *Микробиол. журн.* — 1979. — Т. 41, Вып. 6. — С. 636–639.
9. *Grossman S., Mirocha C. J.* Production of antibody against T-2 toxin // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1979. — V. 73, N 1. — P. 104–108.
10. *Антитела.* Методы / Под ред. Кэтти Д. М. — М.: Мир, 1991. — Т. 1. — 287 с.
11. *Гойстер О. С., Хмельницький Г. О., Дзядевич С. В., Мінченко О. Г.* Дослідження впливу модифікації чутливої поверхні імуносенсора з ефектом ППР на визначення Т-2 мікотоксину з використанням полі- та моноклональних антитіл // *Біотехнологія*. — 2009. — Т. 2, № 2. — С. 111–117.
12. *Кононенко Г. П., Буркин А. А., Соболева Н. А., Зотова Е. В.* Иммуноферментный метод определения Т-2 токсина в контаминированном зерне // *Прикл. биохим. микробиол.* — 1999. — Т. 35, № 4. — С. 457–462.
13. *Whitaker T. B.* Standardisation of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity // *Food Contr.* — 2003. — V. 14. — P. 233–237.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ Т-2 ТОКСИНА С ПОМОЩЬЮ ИММУНОЭНЗИМНОГО И ИММУНОСЕНСОРНОГО МЕТОДОВ

О. С. Гойстер¹
В. Е. Кривенчук²
Г. А. Хмельницкий³
А. Г. Минченко¹

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

²Институт фармакологии и токсикологии
НАМН Украины, Киев

³Национальный университет биоресурсов
и природопользования Украины, Киев

E-mail: gojsterO@ukr.net

Целью работы была разработка методов определения Т-2 токсина с помощью иммуноэнзимного и биосенсорного анализов. Для выполнения поставленных задач созданы конъюгаты Т-2 токсина с протеинами для получения антител, изучена специфичность антител методами иммунохимического анализа. Показано, что в реализации иммуногенных свойств гаптена Т-2 важная роль принадлежит выбору протеина-носителя. Определенная иммуноэнзимным и иммуносенсорным методами связывающая активность IgG-фракции существенно не отличается от активности антисывороток. Время тестирования одной антисыворотки или иммуноглобулинов иммуносенсорным методом составляло 10–15 мин, при этом в случае одновременного тестирования большого количества исследуемого материала более целесообразно использовать иммуноэнзимный метод. Предложены два варианта определения Т-2 токсина в «конкурентном» режиме иммунохимического анализа: метод твердофазного конкурентного иммуноэнзимного анализа, который обеспечивает определение Т-2 токсина от 10 нг/мл, и иммуносенсорный метод на основе эффекта поверхностного плазмонного резонанса — от 1 нг/мл. Разработанные методы могут быть использованы для определения содержания Т-2 токсина в продуктах питания и кормах в концентрациях от 1 до 500 нг/мл.

Ключевые слова: Т-2 токсин, конъюгаты, антитела, иммуноэнзимный анализ, иммунный биосенсор.

DETERMINATION OF T-2 TOXIN BY THE IMMUNOENZYME AND IMMUNOSENSOR METHODS

O. S. Gojster¹
W. E. Kriwenchuk²
G. O. Chmelnitsky³
O. H. Minchenko¹

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

²Institute of Pharmacology and Toxicology
of National Academy of Medical Sciences
of Ukraine, Kyiv

³National University of Bioresources and
Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: gojsterO@ukr.net

The aim of this work was the development of T-2 toxin immune-detection method using biosensor approaches. For this aim the conjugates of T-2 toxin with proteins were obtained and used for antibody preparation. The specific properties of obtained antibodies were studied by immunochemical methods. It was shown that carrier enzyme plays important role in realization of immunogenic properties of T-2 hapten. The detection time of IgG fraction as well as antiserum binding activity by immunoenzyme and immunosensor analyses is 10–15 minutes. Two variants of T-2 toxin determination in competitive mode of immunochemical analysis were suggested, i. e. ELISA and immunosensor method (based on surface plasmon resonance phenomenon) with detection from 10 ng/ml and 1 ng/ml, correspondingly. These methods can be applied for detection of T-2 toxin in the food and fodder in concentration from 1 up to 500 ng/ml.

Key words: T-2 toxin, conjugates, antibody, immune enzymatic analysis, immune biosensor.