

УДК 619.611.573.616:092.632.636.578

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ АЛЬТЕРНАРИОЛА ДЛЯ ОЦЕНКИ РИСКА КОНТАМИНАЦИИ АГРОПРОДУКЦИИ

© 2011 г. А. А. Буркин, Г. П. Кононенко

Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии,
гигиены и экологии РАСХН, Москва, 123022

e-mail: kononenkogp@mail.ru

Поступила в редакцию 03.11.2009 г.

На основе поликлональных кроличьих антител к конъюгату альтернариола и бычьего сывороточного альбумина, синтезированному в реакции формальдегидной конденсации, впервые разработана высоко-специфичная тест-система для непрямого конкурентного иммуноферментного анализа, обеспечивающая чувствительность определения альтернариола 0.4 нг/мл. Показана возможность применения анализа для оценки степени загрязненности альтернариолом зерна, кормовых рационов животных и сырья, используемого для их приготовления.

Для определения альтернариола (АОЛ, 3,4',5-тригидрокси-6'-метилдибензо- α -пирона), представителя обширной группы токсичных метаболитов грибов рода *Alternaria* [1, 2], в пищевых продуктах и кормах описаны различные приемы хроматографического анализа [3–5]. В последние годы для контроля безопасности этих объектов массового потребления все чаще используют иммунохимические методы, в частности, иммуноферментный анализ (ИФА). Так, американскими исследователями разработан иммуноанализ группы алициклических метаболитов *Alternaria* – ААЛ-токсинов [6], который далее был успешно применен для токсикологической оценки грубых, силосованных и смешанных зерновых кормов [7].

Цель работы – разработка непрямого ИФА для определения частоты и уровня встречаемости АОЛ в продукции зерно- и кормопроизводства.

МЕТОДИКА

Использовали АОЛ и метиловый эфир АОЛ фирмы “Sigma” (США), предоставленные отделом клеточных технологий Научно-исследовательского центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства, формальдегид, диметилформамид (ДМФА), диметилсульфоксид (ДМСО) фирмы “Fluka” (Германия), бычий сывороточный альбумин (БСА), яичный альбумин (ЯА) и желатин (Жел) отечественного производства. Антивидовой ферментный конъюгат получали по методу [8] из пероксидазы хрена (КФ 1.11.1.7) и антисыворотки осла к иммуноглобулинам кролика. ИФА выполняли на высокосвязывающих полистирольных планшетах (# 9018, “Costar”, США), для измерений использовали фотометр АКИ-Ц-01 (Россия).

УФ-спектры записывали на приборе Hitachi-557 (Япония).

Синтез белковых конъюгатов АОЛ осуществляли методом формальдегидной конденсации с соблюдением общей процедуры, изложенной в [9]. Для получения БСА-АОЛ (10), т.е. с 10-кратным мольным избытком АОЛ, а также БСА-АОЛ (30) и БСА-АОЛ (110), к растворам, содержащим по 7 мг БСА (0.1 мкмоль) в 1.0 мл воды, добавляли по 0.5 мл ДМФА и 5, 15 и 56 мкл раствора АОЛ в ДМСО с концентрацией 50 мг/мл. Для получения Жел-АОЛ (10) и ЯА-АОЛ (10) к растворам, содержащим по 4 мг ЯА (0.1 мкмоль) и 8 мг Жел (0.05 мкмоль) в 1.0 мл воды, добавляли по 0.5 мл ДМФА и 5 и 2.5 мкл раствора АОЛ в ДМСО с концентрацией 50 мг/мл. Далее к каждой смеси добавляли по 300 мкл 37%-ного формальдегида (3690 мкмоль) и после 24 ч перемешивания при 30°C реакционные смеси диализовали против трех смен 1000-кратного объема 0.5%-ного раствора хлористого натрия. К диализатам добавляли равный объем глицерина и хранили при минус 10–15°C. Для записи УФ-спектров использовали водные растворы конъюгатов с концентрацией 100 мкг/мл.

Иммунизацию кроликов-самцов серой масти (2–3 кг) проводили конъюгатом БСА-АОЛ (110). В первую инъекцию животные получали 100 мкг иммуногена в полном адьюванте Фрейнда подкожно в 10–15 точек области спины, во вторую и во все последующие – по 100 мкг в физиологическом растворе. Через 7 сут после каждой повторной инъекции, осуществляемой с месячным интервалом, у животных из краевой вены уха отбирали кровь, отделяли сыворотку, добавляли равный объем глицерина и хранили при минус 10–15°C. Тестирование сывороток проводили неконкурентным ИФА при концентрациях реагентов, обеспечивающих интенсивность аналитического сигнала (оптическую плот-

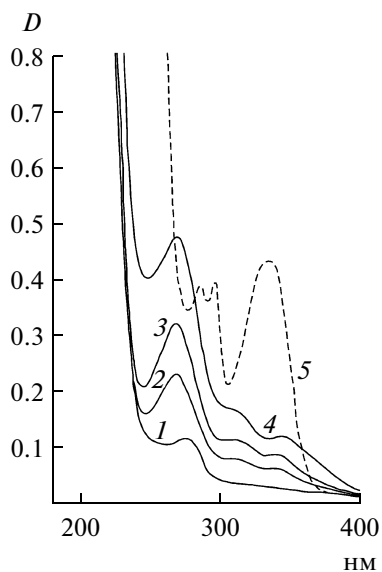


Рис. 1. Спектры УФ-поглощения: 1 – БСА, 2 – БСА-АОЛ (10), 3 – БСА-АОЛ (30), 4 – БСА-АОЛ (110), 5 – АОЛ.

ность) от 0.8 до 1.2. Для выполнения анализа ячейки планшетов заполняли 0.2 мл растворов конъюгатов, предназначенных для иммобилизации, в 0.05 М карбонат-бикарбонатном буфере pH 9.5 с концентрацией 0.05 мкг/мл и инкубировали 16 ч при 4°C. Затем ячейки отмывали 4–5 раз 0.15 М фосфатно-солевым буфером, pH 7.5, содержащим твин 20 (ФСБ-т), и в ячейки вносили по 0.1 мл растворов антител и аналита в этом же буфере. Через 1 ч инкубации ячейки вновь отмывали и заполняли 0.2 мл рабочего раствора ферментного конъюгата. После 1 ч инкубации и отмывки вносили по 0.2 мл субстратного раствора, содержащего 0.4 мг/мл о-фенилендиамина и 0.005% H₂O₂ в 0.15 М цитрат-фосфатном буфере pH 5.0. Через 45 мин в ячейки добавляли по 50 мкл 4М серной кислоты, содержащей 0.1 М Na₂SO₃, и проводили фотометрию при 492 нм.

Приготовление рабочих растворов АОЛ для конкурентного ИФА проводили путем соответствующих разбавлений исходного раствора в ацетонитриле с концентрацией 4.45 мкг/мл, определенной спектрофотометрически ($\lambda = 255$ нм, $\epsilon = 38000$), в смеси ФСБ-т и ацетонитрила в объемном соотношении 9 : 1. Градуировочный график в координатах: “процент связывания антител – концентрация раствора АОЛ” получали в условиях промежуточной прецизионности ($n = 10$) ежедневно или с интервалами 1–2 сут.

Объектами анализа были образцы зерна пшеницы, ячменя, овса и ржи из Севера Нечерноземья, предоставленные сотрудниками лаборатории микологии и фитопатологии им. А.А. Ячевского Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений РАСХН (г. Санкт-Петербург–

Пушкин), а также сырья и кормовых рационов, полученных от животноводческих предприятий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

АОЛ, взятый нами в качестве гаптена для конъюгирования с белками, в растворе ацетонитрила имел характерные максимумы УФ-поглощения при 255 нм, 288 и 300 нм, 330 и 340 нм, которые были близки описанным в литературе для спектра в этаноле – 258 нм ($\epsilon = 38000$), 302 и 330 нм [10]. Первый коротковолновый максимум поглощения мог быть перекрыт поглощением белковых носителей при 280 нм, поэтому факт присутствия гаптена в конъюгатах можно было надежно обнаруживать только по поглощению около 300 и 330 нм.

По типовой процедуре реакции формальдегидной конденсации (реакция Манниха) рекомендуется использовать 37%-ный раствор формальдегида (50 мкл на 2 мг БСА и на 2 мг гаптена), нагревание в диапазоне от 37 до 57°C с продолжительностью от 3 до 24 ч [9]. Попытка проведения реакции с 3690-кратным избытком формальдегида в течение 24 ч завершилась получением продуктов, имеющих неожиданные спектральные характеристики. У конъюгатов вместо свойственного АОЛ поглощению при 330–340 нм появился широкий максимум с центром при 347 нм (рис. 1). Батохромное смещение (на 17 нм) указывало на изменения в хромофорной системе АОЛ, возникшие в результате его связывания с белками. Интенсивность пика закономерно возрастала с увеличением избытка гаптена в реакции и при нагрузках 30 и 110 моль/моль БСА достигала 0.08 и 0.11 оптических единиц (рис. 1).

Выбранный для иммунизации конъюгат БСА-АОЛ (110) уже после второго введения (при первом взятии крови) обеспечил получение антител с рабочим титром 1 : 2500 и возможность определения АОЛ в растворах до концентрации 10 нг/мл в условиях взаимодействия с твердофазным антигеном ЯА-АОЛ (10). Продолжение процедуры иммунизации вплоть до 4 получения сыворотки крови сопровождалось сохранением этого же уровня титра антител и увеличением чувствительности анализа почти на 2 порядка (рис. 2). С иммобилизованными конъюгатами на основе БСА и Жел, взятыми в той же концентрации 0.05 мкг/мл титры антител оказались выше, по показателям конкурентного анализа некоторые преимущества имел Жел-АОЛ (10), который обеспечивал линейность аналитического сигнала в интервале (20–80%) для концентраций от 0.4 до 10 нг/мл (табл. 1).

Градуировочный график, построенный в координатах “процент связывания антител ($n = 10$) – логарифм концентрации АОЛ”, представлен на рис. 3. При равномерном возрастании концентраций калибровочных растворов (0.04, 2.0, 10.0 нг/мл) снижение уровня связывания антител с твердой фазой ($76 \pm$

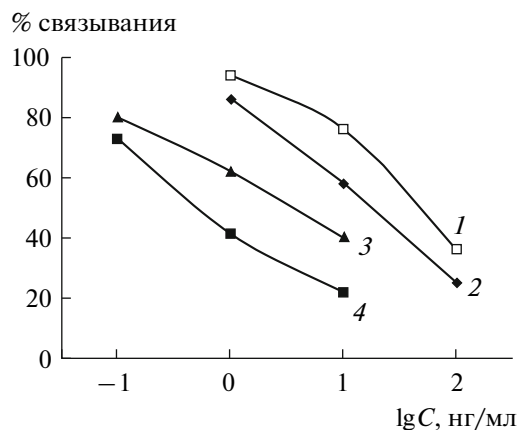


Рис. 2. Конкурентный ИФА АОЛ при тестировании анти-БСА-АОЛ (110) сывороток от 1 до 4 взятия крови в условиях взаимодействия с твердофазным антигеном ЯА-АОЛ (10).

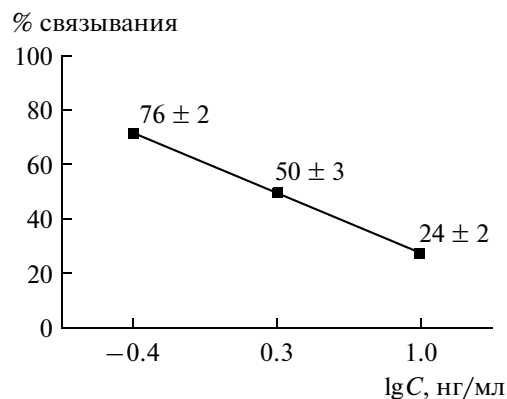


Рис. 3. Градуировочный график ИФА с анти-БСА-АОЛ (110) сывороткой от 6 взятия крови и твердофазным антигеном Жел-АОЛ (10) ($n = 10$) для растворов АОЛ в присутствии ацетонитрила.

2%, $50 \pm 3\%$, $24 \pm 2\%$) имело линейный характер. Значения процента связывания антител, имеющие относительное стандартное отклонение не более 0.05, указывали на стабильный характер функционирования тест-системы в лабораторных условиях при обычных колебаниях внешних факторов.

Для оценки специфичности анализа мы приготовили раствор метилового эфира АОЛ в ацетонитриле и по данным УФ-спектра подтвердили его идентичность. В спектре вещества присутствовали те же характеристические максимумы поглощения при 256 нм, 288 и 300 нм, 330 и 340 нм, что и у АОЛ, которые совпадали с описанными – 257, 290, 301, 335–342 нм [10]. В экспериментах использовали раствор метилового эфира АОЛ в ацетонитриле с концентрацией 10 мкг/мл, рассчитанной по величине $D_{256} = 1.354$ и значению $\epsilon = 38000$, указанной для АОЛ [10]. Антитела в условиях конкурентного анализа не обнаруживали метиловый эфир АОЛ даже в концентрации 1 мкг/мл. Таким образом, перекрестная реактив-

ность антител в отношении ближайшего природного аналога АОЛ – монометилового эфира была ниже 1%. Это свидетельствовало о высокой специфичности анализа и принципиальной возможности использования этого варианта ИФА для избирательной индикации АОЛ в объектах.

В ходе анализа водно-ацетонитрильных экстрактов зерна, продуктов переработки пшеницы, кукурузы, сои, подсолнечника и кормосмесей сопутствующие вещества, в том числе и другие микотоксины (Т-2-токсин, дезоксиниваленол, охратоксин А), не создавали каких-либо препятствий функционированию тест-системы. Предел количественного определения АОЛ составил 20 мкг/кг.

Результаты анализа зерна ячменя и овса представлены в табл. 2. В целом, показатель степени загрязненности зерна АОЛ у овса (35/56, т.е. 35 положительных образцов из 56 исследованных) оказался выше, чем у ячменя – 18/62. Ранее такой же результат был получен в Германии – частота обнаружения АОЛ для овса составила 17%, а для

Таблица 1. Конкурентное взаимодействие (процент связывания антител) анти БСА-АОЛ (110) сыворотки после 7 введения иммуногена с различными твердофазными антигенами

Иммобилизованный антиген	Рабочий титр антител	Концентрация раствора АОЛ, нг/мл		
		10	2	0.4
БСА-АОЛ (30)	1 : 100000	31	50	76
БСА-АОЛ (10)	1 : 120000	29	47	72
ЯА-АОЛ (10)	1 : 7000	25	42	78
Жел-АОЛ(10)	1 : 120000	27	49	71

Таблица 2. Частота обнаружения и содержание АОЛ в возделываемом зерне овса и ячменя

Вид	n^+/n	АОЛ, мкг/кг	
		диапазон	среднее
Овес	35/56	20–2505	144
Ячмень	18/62	20–126	48

Примечание к табл. 2 и 3: n – число исследованных образцов, n^+ – число положительных образцов.

ячменя и пшеницы – 1–2% [11]. У овса в большинстве положительных образцов (28/35) уровни накопления также соответствовали диапазону 20–250 мкг/кг (среднее 78.5 мкг/кг), тогда как у остальных в разной степени превышали этот верхний порог и составили от 323 до 2505 мкг/кг (среднее значение 966.7 мкг/кг).

Для ячменя уровни содержания токсина находились в интервале от 20 до 126 мкг/кг. Согласно данным, приведенным в работе [11], количества АОЛ, найденные в зерне в Германии, составляли 6–160 мкг/кг. В литературе описаны также случаи более высоких содержаний АОЛ в зерне хлебных злаков, которые связаны, как правило, с чрезмерно интенсивным поражением растений грибами рода *Alternaria*. Так, польскими исследователями показано, что в зерновках из колоса пшеницы с очевидным черным налетом на его поверхностных частях количество АОЛ составило 590 мкг/кг, а в соломе такой пшеницы и ржи его уровень достигал 1800 мкг/кг [12]. В Китае в 20 из 22 образцов зерна пшеницы с интенсивным инфицированием *Alternaria* (87.3%) накоп-

ление АОЛ наблюдалось в количествах от 116 до 731 мкг/кг (среднее 335 мкг/кг) [13].

Встречаемость АОЛ в пшенице, ячмене и кукурузе фуражного назначения составила в целом 19.9% (табл. 3), при этом уровни загрязненности зерна, а также продуктов его подработки (пшеничные отруби), не превышали 200 мкг/кг. В жмыхах и шротах из подсолнечника, а также в продукции переработки зерна кукурузы (“глютен” и “корм глютенный”) частота обнаружения АОЛ была значительно выше. В жмыхах и шротах из подсолнечника усредненный уровень накопления АОЛ оказался самым высоким среди кормовых ингредиентов и составил 192 мкг/кг. О присутствии АОЛ в семенах подсолнечника ранее сообщено итальянскими исследователями [14] и недавно в Бразилии в 18% образцов семян найден АОЛ в количествах 24.9–170.9 мкг/кг [15]. В комбинированных кормах частота обнаружения АОЛ (59/216, 27.3%) и уровни контаминации (от 20 до 334 мкг/кг) вполне соответствовали ожидаемым, исходя из результатов обследования основных видов сырья, используемых для их изготовления.

В ходе анализа единичных образцов сена и силоса нами установлены весьма высокие уровни их загрязнения – 560 и 760 мкг/кг. Этот вопрос заслуживает отдельного изучения, поскольку в составе микобиоты силосованных кормов, формирование которой происходит в специфических условиях, доля грибов *Alternaria* невелика [16]. Видовая принадлежность грибов рода *Alternaria*, наиболее активно участвующих в загрязнении АОЛ зерновых, сочных и грубых кормов, пока также остается невыясненной. Первичная оценка 50 изолятов *Alternaria* spp. из разных видов кормов (сусловый агар, 25°C, 7 сут) показала, что все они способны продуцировать этот метаболит в количествах от 7 до 700 мкг/мл среды.

Таблица 3. Частота обнаружения и содержание АОЛ в кормах

Вид корма	n^+/n	АОЛ, мкг/кг	
		диапазон	среднее
Зерно пшеницы	4/28	76–192	98
Зерно ячменя	22/76	20–126	47
Зерно кукурузы	5/52	38–169	88
Отруби пшеничные	4/10	20–63	34
Шрот из сои	1/7	23	23
Шрот, жмых из подсолнечника	17/21	25–388	192
“Глютен” кукурузный	16/20	20–190	56
Комбикорма	59/216	20–334	49
Сено, силос	2/2	560, 760	560, 760

Создание ИФА, с помощью которого возможно получать сведения о характере контаминации АОЛ различных видов агропродукции, позволит провести поиск активных штаммов грибов, обеспечивающих биосинтез этого токсина в условиях выращивания сельскохозяйственных культур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белякова Г.А., Левкина Л.М. // Микология и фитопатология. 1990. Т. 24. № 2. С. 128–135.
2. Белякова Г.А., Левкина Л.М. // Микология и фитопатология. 1992. Т. 26. № 3. С. 183–188.
3. Schade J.E., King A.D. // J. Food Prot. 1984. V. 47. № 12. P. 978–995.
4. Chromatography of Mycotoxins. Techniques and Applications / Ed. V. Betina Amsterdam: Elsevier, 1993, 373 p.
5. Scott P.M., Weber D., Kanhere S.R. // J. Chromatogr. A. 1997. № 765. P. 255–263.
6. Szurdoki F., Trousdale E., Ward B., Gee S.J., Hammock B.D., Gilchrist D.G. // J. Agr. Food Chem. 1996. V. 44. № 7. P. 1796–1803.
7. Yu W., Yu F.-Y., Undersander D.J., Chu F.S. // Food Agricul. Immunol. 1999. V. 11. № 4. P. 307–319.
8. Nakane P.K., Kawaoi A. // J. Histochem. Cytochem. 1974. V. 22. № 2. P. 1084–1091.
9. Hermanson G.T. Bioconjugate Techniques. San Diego: Acad. Press, 1996. P. 785.
10. Cole R.J., Cox R.H. Handbook of Toxic Fungal Metabolites. New York–London–Toronto–Sydney–San Francisco: Acad. Press, 1981. 937 p.
11. Gruber-Schley S., Thalmann A. // Landwirtschaft. Forsch. 1988. V. 41. № 1–2. P. 11–29.
12. Grabarkiewicz-Szczesna J., Chelkowski J., Zajkowski P. // Mycotoxin Res. 1989. V. 5. № 2. 77–80.
13. Li F.Q., Yoshizawa T. // J. Agr. Food Chem. 2000. V. 48. № 7. P. 2920–2924.
14. Logrieco A., Bottalico A., Visconti A., Vurro M. // Microbiol. Alim. Nutr. 1988. № 6. P. 13–17.
15. Pozzi C.R., Braghini R., Arcardo J.R.P., Zorzete P., Israel A.L.M., Pozar I.O., Denucci S., Correa B. // J. Agr. Food Chem. 2005. V. 53. № 14. P. 5824–5828.
16. Кислякова О.С. // Проблемы вет. санитарии и экологии. 2001. Т. 111. С. 115–122.

Enzyme Immunassay of Alternariol for the Assessment of Risk of Agricultural Products Contamination

A. A. Burkin and G. P. Kononenko

All-Russia Research Institute of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow, 123022 Russia

e-mail: kononenkorp@mail.ru

Received November 3, 2009

Abstract—A highly specific test system based on polyclonal rabbit antibodies targeting a conjugate of alternariol and bovine serum albumin prepared by formaldehyde condensation has been developed for the first time and shown to have the sensitivity of 0.4 ng/ml in the indirect competitive determination of alternariol. The possibility of applying the assay for assessment of the intensity of alternariol contamination of corn, animal feed, and raw materials used for the preparation of the latter has been demonstrated.