

УДК 619.611.573.616:092.632.636.578:582.29

## ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ЛИШАЙНИКАХ

© 2013 г. А. А. Буркин\*, Г. П. Кононенко\*, Т. Ю. Толпышева\*\*

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

e-mail: kononenkogp@mail.ru

\*\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992

Поступила в редакцию 11.05.2012 г.

Разработан метод иммуноферментного анализа усниновой кислоты в лишайниках с чувствительностью 0.1 мкг/г воздушно-сухого материала (0.00001%). Поликлональные кроличьи антитела к бычьему сывороточному альбумину, конъюгированному с (+)-усниновой кислотой в условиях формальдегидной конденсации, при взаимодействии с гомологичным по способу связывания иммобилизованным конъюгатом с желатином позволяли определять анализируемое вещество в растворах с концентрацией от 1 нг/мл. Усниновая кислота найдена во всех 236 исследованных образцах лишайников, относящихся к 53 видам и 8 семействам, в количествах 2–26600 мкг/г (0.0002–2.6%).

DOI: 10.7868/S0555109913030069

Усниновая кислота (УК) [2,6-диацетил-7,9-дигидрокси-8,9b-диметилдибензофуран-1,3(2H,9bH)-дион] – один из метаболитов лишайников, обладающих широким спектром антимикробного, противовирусного и противовоспалительного действия [1]. Многие годы УК использовали для лечения особо опасных инфекций, а в наши дни, несмотря на доказанную аллергенность и токсичность, продолжают рекомендовать в качестве профилактического средства в диетологии и косметологии [2]. Биопрепараты на основе лишайников готовят, как правило, из экстрактов слоевищ, поэтому они всегда содержат сложный комплекс структурно подобных и совершенно различных по строению физиологически активных веществ. Многие из них могут оказывать прямое или опосредованное негативное воздействие на организм, поэтому контроль компонентного состава подобных препаратов является обязательным.

В настоящее время в распоряжении исследователей есть несколько методов определения УК на основе газовой и жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым, фотодиодным и масс-спектрометрическим детектированием, обеспечивающих нижние пределы измерения от 50 до 400 нг/мл [3–6]. Однако иммунохимический анализ, который не уступает хроматографическим методам по селективности, обладает гораздо большей чувствительностью и требует минимальной пробоподготовки, для определения УК до сих пор не разработан.

Цель работы – создание и применение иммуноферментного анализа (ИФА) для количествен-

ного определения УК в составе экстрактивных веществ лишайников разной видовой и родовой принадлежности.

### МЕТОДИКА

Использовали (+)-УК (кат. № 329967) (“Aldrich”, Швейцария), эмодин (кат. № E 7881) (“Sigma”, США), формальдегид, диметилформамид (ДМФА) фирмы “Fluka” (Германия), бычий сывороточный альбумин (БСА), яичный альбумин (ЯА) и желатин (Жел) производства “Биохимреактив” (Россия). Антивидовой ферментный конъюгат получали по методу [7] из пероксидазы хрена (КФ 1.11.1.7) (“Sigma”, США) и гамма-глобулина антисыворотки осла к иммуноглобулинам кролика (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН). Атранорин предоставлен сотрудниками кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. ИФА выполняли на высокосвязывающих полистирольных планшетах (# 9018, “Costar”, США), для измерений использовали фотометр АКИ-Ц-01 (Россия). УФ-спектры записывали на приборе Hitachi-557 (“Hitachi”, Япония).

Синтез белковых конъюгатов УК осуществляли методом формальдегидной конденсации. Для получения БСА-УК(10), т.е. конъюгата с 10-кратным мольным избытком УК, а также БСА-УК(30) и БСА-УК(100), к растворам, содержащим по 5 мг БСА (0.07 мкмоль) в 1.5 мл 0.1 М водного раствора ацетата натрия, добавляли 24, 72, 241 мкл раствора УК в ДМФА с концентрацией 10 мг/мл (241,

723 и 2410 мкг УК соответственно). Для получения Жел-УК(30) и ЯА-УК(30) к растворам, содержащим по 4 мг ЯА (0.1 мкмоль) и 8 мг Жел (0.05 мкмоль) в 1.5 мл 0.1 М водного раствора ацетата натрия, добавляли 1032 и 516 мкг УК в виде раствора в ДМФА с концентрацией 10 мг/мл. Далее к каждой смеси добавляли по 300 мкл 37%-ного формальдегида (3690 мкмоль) и после 6 ч перемешивания при 30°C реакционные смеси диализовали против трех смен 1000-кратного объема 0.5%-ного раствора хлористого натрия. Для получения БСА-УК(100/16) после добавления формальдегида реакционную смесь перемешивали 16 ч при 30°C и диализовали. Затем ко всем 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-УК(100/16). В первую инъекцию животные получали 200 мкг иммуногена в полном адьюванте Фрейнда подкожно в 10–15 точек области спины, во вторую и третью – по 300 мкг в физиологическом растворе. Повторные инъекции осуществляли с 1 мес интервалом. Через 7 сут после третьей инъекции антигена у животных из краевой вены уха отобрали кровь, отделили сыворотку, добавили равный объем глицерина и хранили при минус 10–15°C.

Для выполнения анализа ячейки планшетов заполняли 0.2 мл растворов конъюгатов, предназначенных для иммобилизации, в 0.05 М карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9.5, 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 анализируемого вещества и антител 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 *o*-фенилендиамина и 0.005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 0.15 М цитрат-фосфатном буфере, pH 5.0. Через 45 мин в ячейки добавляли по 50 мкл 4 М серной кислоты, содержащей 0.1 М Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, и проводили измерение оптической плотности при 492 нм.

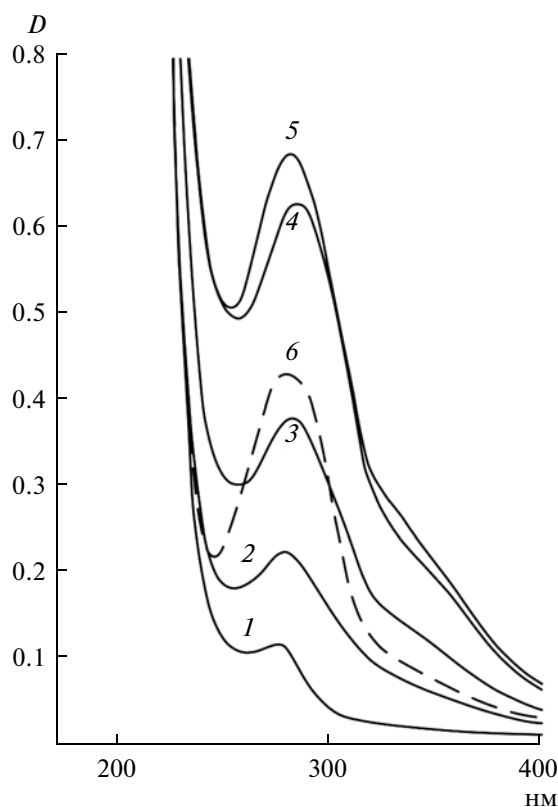
Приготовление рабочих растворов УК для конкурентного ИФА проводили из исходного раствора в ацетонитриле с концентрацией 10 мкг/мл, определенной спектрофотометрически ( $\lambda = 282$  нм,  $\epsilon = 25350$ ). Градуировочный график в координатах “процент связывания антител – концентрация раствора УК” получали в условиях промежуточной прецизионности ( $n = 10$ ) ежедневно или с интервалами 1–2 сут.

Объектами анализа были образцы слоевищ лишайников, использованные ранее для микотоксикологического анализа [8], а также эпилитные, эпифитные и эпигейные лишайники, отобранные в 2010–11 гг. в Лапландском, Печоро-Ильчском заповедниках, на Таймыре, в окрестностях Петропавловска-Камчатского и Якутска. Способ экстракции материала не отличался от описанного [8].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Конденсация УК, взятой в 10-, 30- и 100-кратных мольных избытках по отношению к БСА, в присутствии формальдегида при 30°C в течение 6 ч завершилась получением продуктов, имеющих вполне ожидаемые спектральные характеристики. Следует отметить, что нередко формальдегидная конденсация сопровождается изменением спектров поглощения конъюгатов, что, однако, не приводит к утрате их иммунореактивности как в случаях с альтернариолом и тетрациклином [9, 10]. Максимумы УФ-поглощения УК, которые находятся при длинах волн 233 нм ( $\epsilon 34740$ ) и 282 нм ( $\epsilon 25350$ ) [8], перекрываются поглощением БСА при 280 нм, поэтому факт присутствия гаптена в конъюгатах можно было обнаруживать только по приросту оптической плотности на этой длине волны. У всех полученных конъюгатов наблюдалось усиление поглощения при 280 нм в сравнении с исходным БСА (рис. 1). Интенсивность его закономерно возрастала с увеличением количества гаптена в реакции, и значения эпитопных плотностей у первых трех продуктов составили 3.1, 7.3 и 14.3. Конъюгированием БСА со 100-кратным мольным избытком УК в условиях более продолжительного – 16 ч выдерживания реакционной смеси с формальдегидом (рис. 1) эпитопную плотность удалось повысить до 15.8. Отношение к теоретически возможным значениям эпитопной плотности составило в среднем 21%, оно оказалось близким такому же показателю для других физиологически активных веществ, например ципрофлоксацина (20%) [11], циклопиазоновой кислоты (29%) [12] и было гораздо выше, чем у цитринина (8%) [13]. У белковых конъюгатов УК не наблюдалось равенства эпитопных плотностей теоретически возможным значениям или их превышения, как это было отмечено для микотоксина зеараленона при аналогичной процедуре связывания [14].

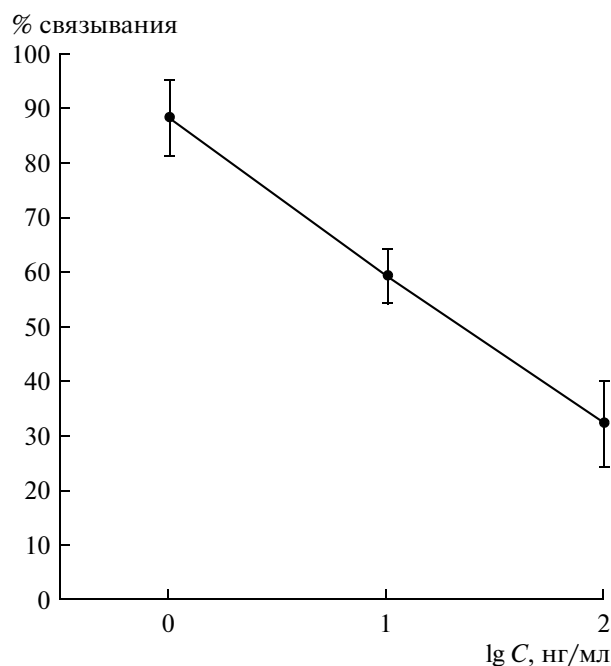
Конъюгат БСА-УК(100/16), взятый для иммунизации, обеспечил получение антисыворотки с рабочими титрами 1:1000–1:5000, которая могла быть использована в конкурентном анализе УК при иммобилизации всех синтезированных конъюгатов (табл. 1). С твердофазным антигеном Жел-УК (30) оказалось возможным определять



**Рис. 1.** Спектры УФ-поглощения 1 – БСА, 2 – БСА-УК(10), 3 – БСА-УК(30), 4 – БСА-УК(100), 5 – БСА-УК(100/16), 6 – УК.

УК в растворах вплоть до концентрации 1 нг/мл. Линейность аналитического сигнала сохранялась в интервале концентраций от 1 до 100 нг/мл, а значения доверительных интервалов, рассчитанных по 10 определениям, составили 5–8% (рис. 2).

Известно, что, кроме дибензофуранов, в составе ароматических веществ лишайников представлены и другие структурные группы, такие, как депсиды, депсидоны и антрахиноны. Антитела в условиях конкурентного анализа не обнару-



**Рис. 2.** Градуировочная кривая ИФА с анти-БСА-УК(100/16) сывороткой и твердофазным антигеном Жел-УК(30) ( $n = 10$ ) для растворов УК в присутствии ацетонитрила.

живали два из них – депсид атранорин и соединение антрахинонового ряда – эмодин даже в концентрации 1 мкг/мл. Это указывало на высокую специфичность анализа и возможность использования его при работе с нативными экстрактами. С иммунологической точки зрения интересно было бы оценить перекрестную реактивность полученных антител в отношении оптического изомера (–)-усниновой кислоты, а также ее ближайших структурных аналогов, но мы, к сожалению, не имели такой возможности.

С помощью созданной тест-системы при анализе исходных водно-ацетонитрильных экстрактов лишайников, разведенных в 10 раз ФСБ-т,

**Таблица 1.** Конкурентное взаимодействие (процент связывания антител) анти БСА-УК(100/16) сыворотки с разными твердофазными антигенами

Твердофазный антиген и его концентрация, мкг/мл		Рабочий титр антител	Концентрация раствора УК, нг/мл		
			100	10	1
БСА-УК(10)	0.15	1:3000	42	73	92
БСА-УК(30)	0.15	1:5000	34	77	97
БСА-УК(100)	0.05	1:4000	39	76	93
БСА-УК(100/16)	0.05	1:4000	43	76	95
ЯА-УК(30)	0.5	1:1000	35	72	91
Жел-УК(30)	0.5	1:1000	33	61	88

оказалось возможным проводить определение УК в диапазоне содержания от 0.1 до 10 мкг/г сухого вещества или 0.00001–0.001%. Для того чтобы перейти к определению УК в тех лишайниках, где она преобладает среди других метаболитов и накапливается в количествах от сотых долей до десятков процентов, необходимо было разбавлять экстракты в 100 и более раз. Методом хроматографического анализа ранее было показано, что среди представителей рода *Cladonia* (семейство Cladoniaceae) накопление УК более 0.05% свойственно всем обследованным видам секции *Unciales* [15], большинству видов *Cladina* [16], многим видам секции *Cocciferae* [17] и подсекции *Foliosae* в секции *Helopodium* [18], а также отдельным видам секции *Perviae* [19], секции *Cladonia* и группы *Furcatae* [20].

Выполненная нами оценка лишайников из семейства Cladoniaceae показала, что у видов *Cladonia* наблюдаются существенные различия по содержанию УК. В *Cladonia amaurocraea*, *C. deformis*, *C. stellaris*, *C. sulphurina* и *C. uncialis* количество УК составляет 0.5–2.3% (табл. 2), что вполне согласуется с ранее полученными данными [15–17, 21]. Для другой группы – *C. arbuscula*, *C. macroceras*, *C. mitis*, *C. rangiferina* накопление этого вещества соответствовало диапазону 0.05–0.4% (табл. 2). Однако ранее в двух образцах *C. arbuscula*, собранных в Ленинградской области и в Эстонии на о. Ворсми, количество УК составило 0.99 и 1.60%, а *C. mitis* – 0.97 и 1.72% [21]. В одном образце *C. macroceras* из Финляндии, исследованным хроматографическим методом с порогом обнаружения 0.05%, УК найти не удалось [20], а в двух анализированных нами образцах, отобранных на севере Мурманской области (в окрестностях г. Кола) и на побережье Белого моря вблизи Полярного круга, ее содержание составило 0.1 и 0.2% (табл. 2).

При анализе лишайников *C. cenotea* (Ach.) Schaer., *C. cornuta*, *C. rangiformis* методом ВЭЖХ с чувствительностью 0.05% были получены отрицательные результаты [15, 16]. По нашим данным, УК присутствует в слоевищах этих видов, но в количествах менее 0.02%, при этом для *C. cornuta* отмечена значительная изменчивость по местам сбора (табл. 2).

Все эти сведения имеют непосредственное отношение к выпуску биопрепаратов, поскольку нередко основным действующим началом в них заявляют просто смесь видов р. *Cladonia*, часто без какой-либо конкретизации и уточнений по условиям сбора материала.

Для того чтобы получить достоверные сведения при таксономических исследованиях р. *Cladonia*, необходимо использовать большие выборки. Пока

**Таблица 2.** Содержание усниновой кислоты в лишайниках семейства Cladoniaceae

Вид лишайника (исследовано образцов)	УК, мкг/г мин.— <b>среднее</b> —макс.
<i>Cladonia amaurocraea</i> (Flörke) Schaerer (4)	9200— <b>13 100</b> —20 900
<i>C. arbuscula</i> (Wallr.) Flot. (6)	480— <b>2020</b> —4100
<i>C. cenotea</i> (Ach.) Schaer. (1)	158
<i>C. cornuta</i> (L.) Hoffm. (7)	5— <b>63</b> —200
<i>C. deformis</i> (L.) Hoffm. (3)	13 000— <b>14 100</b> —14 700
<i>C. macroceras</i> (Flörke) Ahti (2)	1350, 2500
<i>C. mitis</i> Sandst. (6)	600— <b>900</b> —1600
<i>C. rangiferina</i> (L.) Web. (9)	390— <b>840</b> —1900
<i>C. rangiformis</i> Hoffm. (2)	4, 5
<i>C. stellaris</i> (Opiz) Pouz. et Vězda (4)	10 000— <b>15 600</b> —23 200
<i>C. sulphurina</i> (Michx.) Fr. (9)	9000— <b>12 600</b> —19 600
<i>C. uncialis</i> (L.) Wigg. (4)	5000— <b>5800</b> —6400

выводы о видовых особенностях накопления УК сделаны лишь на немногих или единичных образцах. Использование ИФА позволит в дальнейшем значительно расширить знания в этой области, поскольку появляется возможность одновременного испытания десятков образцов.

Среди лишайников семейства Parmeliaceae высокие уровни содержания УК от 0.7 до 2.6% имели представители рода *Flavocetraria* (табл. 3), а также виды *Vulpicida pinastri* и *Alectoria sarmentosa* (табл. 3). У *A. ochroleuca* количество УК было ниже – от 0.1 до 0.4%. По данным работы [22], виды р. *Alectoria* часто являющиеся богатым источником УК и накапливают ее до 6% от сухого образца. Ранее сообщенный уровень накопления УК у *Flavocetraria cucullata* (= *Cetraria cucullata*) [21], соответствовал нижней границе определенного нами содержания (табл. 3).

Лишайники р. *Evernia* и р. *Usnea*, а также *Cetraria islandica* уступали по этому показателю (табл. 3). Уровни накопления УК у *E. mesomorpha* варьировали от 0.05 до 0.6%, а у *E. prunastri* – от 0.01 до 0.02%. Для двух видов рода *Usnea* – *U. dasy-poga* и *U. subfloridana* – диапазоны измеренных количеств были близки – 0.06–0.1 и 0.01–0.1%.

В 6 образцах *C. islandica* из географически различных мест количество УК варьировало от 25 до 1200 мкг/г, что, по-видимому, связано с условиями их обитания. Тот факт, что в этом лишай-

**Таблица 3.** Содержание усниновой кислоты в лишайниках семейства Parmeliaceae

Вид лишайника (исследовано образцов)	УК, мкг/г мин.—среднее—макс.
<i>Alectoria ochroleuca</i> (Hoffm.) Massal. (4)	1200— <b>2900</b> —3800
<i>A. sarmentosa</i> (Ach.) Ach. (9)	7900— <b>11 600</b> —25 100
<i>Arctoparmelia centrifuga</i> (L.) Hale (2)	200, 360
<i>Bryoria capillaris</i> (Ach.) Brodo et D. Hawksw. (3)	14— <b>25</b> —40
<i>B. chalybeiformis</i> (L.) Brodo et D. Hawksw. (4)	9— <b>41</b> —100
<i>B. fremontii</i> (Tuck.) Brodo et D. Hawksw. (3)	6— <b>39</b> —98
<i>B. fuscescens</i> (Gyeln.) Brodo et D. Hawksw. (2)	25, 33
<i>B. implexa</i> (Hoffm.) Brodo et D. Hawksw. (4)	8— <b>13</b> —16
<i>B. nadvornikiana</i> (Gyeln.) Brodo et D. Hawksw. (1)	51
<i>B. simplicior</i> (Vain.) Brodo & D. Hawksw. (1)	130
<i>B. subcana</i> (Nyl. ex Stizenb.) Brodo et D. Hawksw. (1)	12
<i>Cetraria islandica</i> Ach.(6)	25— <b>350</b> —1200
<i>Evernia mesomorpha</i> Nyl. (6)	500— <b>3000</b> —6200
<i>E. prunastri</i> (L.) Ach. (5)	100— <b>150</b> —250
<i>Flavocetraria cucullata</i> (Bellardi) Kärnefelt et A. Thell (7)	7100— <b>12 600</b> —26000
<i>F. nivalis</i> (Bellardi) Kärnefelt et A. Thell (9)	7700— <b>10 600</b> —16500
<i>Hypogymnia farinacea</i> Zopf (1)	164
<i>H. physodes</i> (L.) Nyl. (9)	14— <b>27</b> —65
<i>Melanohalea exasperata</i> (DeNot.) O. Blanco et al. (2)	2, 5
<i>M. olivacea</i> (DeNot.) O. Blanco et al. (6)	4— <b>28</b> —64
<i>M. septentrionalis</i> (DeNot.) O. Blanco et al. (4)	18— <b>42</b> —90
<i>Parmelia saxatilis</i> (L.) Ach.(5)	9— <b>83</b> —250
<i>P. sulcata</i> Taylor (4)	10— <b>62</b> —138
<i>Platismatia glauca</i> (L.) W.L. Culb. et C.F. Culb. (3)	100— <b>350</b> —780
<i>Pseudevernia furfuracea</i> (L.) Zopf (2)	2, 3
<i>Usnea dasypoga</i> (Ach.) Nyl. (3)	580— <b>900</b> —1300
<i>U. hirta</i> (L.) Wigg. emend. Mot.(1)	316
<i>U. subfloridana</i> Stirt. (7)	130— <b>500</b> —1200
<i>Vulpicida pinastri</i> (Scop.) J.-E. Mattsson et M.J. Lai (5)	11 300— <b>16 300</b> —26600

нике УК может содержаться на уровне 0.1%, заслуживает внимания, поскольку некоторые фармацевтические компании на основе *C. islandica* выпускают лекарства от простуды [2]. С другой стороны, есть сообщение о том, что в этих лишайниках, собранных на территории Исландии, УК не смогли обнаружить даже в фоновом содержании [1]. Для *Arctoparmelia centrifuga* и *Platismatia glauca* характерны уровни накопления УК около 0.03%, а у представителей родов *Bryoria*, *Melanohalea*, *Parmelia*, *Hypogymnia* и вида *Pseudevernia furfuracea* они оказались еще ниже (табл. 3).

Низкое содержание УК было найдено в лишайниках из семейств Peltigeraceae и Umbilicariaceae, а также у 4 видов, представляющих другие семейства — *Thamnotia vermicularis*, *Lobaria scrobiculata*, *Nephroma arcticum* и *Xanthoria parietina* (табл. 4). У видов *Lobaria scrobiculata* и *Nephroma arcticum* количества УК в среднем составили 0.02%, а у всех остальных — ниже 0.01%. Наименьший уровень накопления 0.0002–0.0005% был найден в образцах *Melanohalea exasperata*, *Pseudevernia furfuracea* (Parmeliaceae) (табл. 3),

Таблица 4. Содержание усниновой кислоты в лишайниках других семейств

Семейство, вид лишайника (исследовано образцов)	УК, мкг/г мин.—среднее—макс.
Isomadophilaceae, <i>Thamnolia vermicularis</i> (Sw.) Ach. ex Schaerer (9)	13— <b>38</b> —100
Lobariaceae, <i>Lobaria scrobiculata</i> (Scop.) DC (7)	85— <b>240</b> —530
Nephromataceae, <i>Nephroma arcticum</i> (L.) Torss. (9)	80— <b>177</b> —320
Peltigeraceae, <i>Peltigera aphthosa</i> (L.) Willd. (10)	9— <b>49</b> —130
<i>P. canina</i> (L.) Willd. (2)	6, 18
<i>P. didactyla</i> (With.) J.R. Laundon (2)	11, 33
<i>P. horizontalis</i> (Huds.) Baumg. (4)	5— <b>12</b> —15
<i>P. leucophlebia</i> (Nyl.) Gyeln. (2)	8, 40
<i>P. rufescens</i> (Weiss) Humb. (3)	6— <b>9</b> —16
<i>P. scabrosa</i> Th.Fr. (2)	3, 32
Teloschistaceae, <i>Xanthoria parietina</i> (L.) Th. Fr. (7)	4— <b>15</b> —39
Umbilicariaceae, <i>Umbilicaria deusta</i> (L.) Baumg. (1)	42
<i>U. hyperborea</i> (Ach.) Hoffm. (1)	72
<i>U. proboscidea</i> (L.) Schrad. (2)	30, 132
<i>U. torrefacta</i> (Lightf.) Schrad. (4)	10— <b>67</b> —180

*Peltigera horizontalis*, *P. scabrosa* (Peltigeraceae) и *Xanthoria parietina* (табл. 4).

Таким образом, УК в количествах 0.0002–2.6% выявлена во всех 236 исследованных образцах лишайников, относящихся к 53 видам и 8 семействам. Указания на отсутствие или редкую встречаемость УК в некоторых видах лишайников (например, в *Pseudevernia furfuracea*, *Cetraria islandica*, *Thamnolia vermicularis*, *Xanthoria parietina*, р. *Peltigera*, *Evernia prunastri* и некоторых других) [23–25] обусловлены недостаточной чувствительностью использованного метода.

Применение ИФА, с помощью которого можно получать исчерпывающую информацию о содержании УК в составе экстрактивных веществ лишайников, позволит повысить безопасность и эффективность пищевых биодобавок и лечебных препаратов на их основе, а также расширить представления о биосинтетических возможностях этих симбионтных организмов. Этот метод можно использовать также в целях систематики.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ingolfsdottir K. // Phytochemistry. 2002. V. 61. № 7. P. 729–736.
2. Muggia L., Schmitt I., Grube M. // SIM News. 2009. V. 59. № 3. P. 85–94.
3. Ji H., Khan I.A. // J. AOAC Intern. 2005. V. 88. № 5. P. 1265–1268.
4. Roach J.A.G., Musser S.M., Morehouse K., Woo J.Y.J. // J. Agric. Food Chem. 2006. V. 54. № 7. P. 2484–2490.
5. Dailey R., Siemion R., Raisbeck M., Jesse C. // J. AOAC Intern. 2010. V. 93. № 4. P. 1137–1142.
6. Smeds A.I., Kytoviita M.M. // Lichenologist. 2010. V. 42. № 6. P. 739–749.
7. Nakane P.K., Kawaoi A. // J. Histochem. Cytochem. 1974. V. 22. № 2. P. 1084–1091.
8. Кононенко Г.П., Буркин А.А., Толышева Т.Ю. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 1. С. 81–87.
9. Буркин А.А., Кононенко Г.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 1. С. 79–83.
10. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Буркин М.А. // Сельхоз. биол. 2010. № 4. С. 110–117.

11. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Буркин М.А. // Сельхоз. биол. 2011. № 4. С. 108–114.
12. Кононенко Г.П., Буркин А.А. // Микология и фитопатология. 2008. Т. 42. № 2. С. 178–184.
13. Кононенко Г.П., Буркин А.А. // Журн. аналит. химии. 2007. Т. 62. № 7. С. 769–774.
14. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Соболева Н.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 3. С. 305–311.
15. Huovinen K., Ahti T. // Ann. Bot. Fennici. 1986. V. 23. № 3. P. 173–188.
16. Huovinen K., Ahti T. // Ann. Bot. Fennici. 1986. V. 23. № 2. P. 93–106.
17. Huovinen K., Ahti T., Stenroos S. // Ann. Bot. Fennici. 1989. V. 26. № 2. P. 133–148.
18. Huovinen K., Ahti T., Stenroos S. // Ann. Bot. Fennici. 1989. V. 26. № 3. P. 297–306.
19. Huovinen K., Ahti T. // Ann. Bot. Fennici. 1988. V. 25. № 4. P. 371–383.
20. Huovinen K., Ahti T., Stenroos S. // Contributions to Lichenology. In honour of A. Henssen. – Bibl. Lichenol. 1990. V. 38. P. 209–241.
21. Вайнштейн Е.А., Равинская А.П. // Бот. журн. 1984. Т. 69. № 10. С. 1347–1351.
22. Proksa B., Sturdikova M., Pronayova N., Liptaj T. // Pharmazie. 1996. V. 51. № 3. P. 195–196.
23. Thell A., Moberg R. Nordin Lichen Flora. V. 4. Parmeliaceae. Gotenborg: Zetterqvist tryckeri, 2011. 184 p.
24. Vitikanen O. Nordin Lichen Flora. V. 3. Peltigeraceae. Gotenborg: Zetterqvist tryckeri, 2007. P. 113–131.
25. Brodo I.M., Sharnoff S.D., Sharnoff S. Lichen of North America. New Haven and London: Yale University Press, 2001. 795 p.

## Enzyme Immunoassay of Usnic Acid in Lichens

A. A. Burkin<sup>a</sup>, G. P. Kononenko<sup>a</sup>, and T. Yu. Tolpysheva<sup>b</sup>

<sup>a</sup> All-Russian Research Institute of Veterinary Sanitary, Hygiene, and Ecology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow, 123022 Russia

e-mail: kononenkogp@mail.ru

<sup>b</sup> Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

Received May 11, 2012

**Abstract**—An enzyme immunoassay for usnic acid in lichens was developed, the sensitivity of which was 0.1 µg/g of air-dried material (0.00001%). Polyclonal rabbit antibodies against bovine serum albumin conjugated to (+)-usnic acid under the conditions of formaldehyde condensation made it possible to determine the analyzed substance in solutions at concentrations from 1 ng/mL when it interacts with an immobilized gelatin conjugate homologous in the binding mode. Usnic acid in 2–26 600 µg/g (0.0002–2.6%) amounts was found in all 236 studied samples of lichens belonging to 53 species and 8 families.

---

Сдано в набор 27.12.2012 г.	Подписано к печати 19.03.2013 г.	Дата выхода в свет 23 нечетн.	Формат 60 × 88 <sup>1</sup> / <sub>8</sub>
Цифровая печать	Усл. печ. л. 13.0	Усл. кр.-отт. 1.5 тыс.	Уч.-изд. л. 13.0
	Тираж 113 экз.	Зак. 1225	Бум. л. 6.5
		Цена свободная	

---

Учредители: Российская академия наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

---

Издатель: Российская академия наук. Издательство “Наука”, 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90  
 Оригинал-макет подготовлен МАИК “Наука/Интерпериодика”  
 Отпечатано в ППП “Типография “Наука”, 121099 Москва, Шубинский пер., 6