

УДК 619:577.27

**ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА БЕЛКОВЫХ
КОНЬЮГАТОВ 15-ГЕМИСУКЦИНАТА 3-АЦЕТИЛ –
4-ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛА**

Г.П. КОНОНЕНКО

кандидат химических наук

А.А. БУРКИН

кандидат медицинских наук

Н.А. СОБОЛЕВА

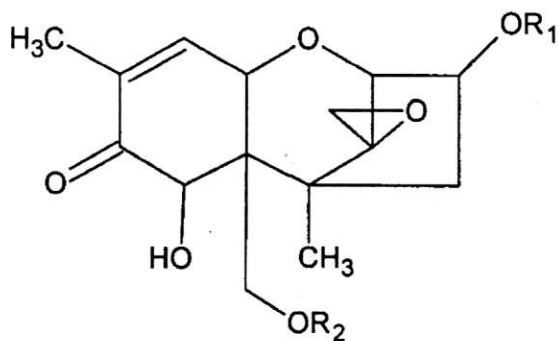
кандидат биологических наук

РЕЗЮМЕ

Показано, что антитела к 3-ацетил-15-гемисукцинил-4-дезоксиниваленолу, конъюгированному с модифицированным этилендиамином бычьим сывороточным альбумином, имеют высокую и близкую специфичность узнавания 3,15-диацетил- и 3,7,15-триацетил-замещенных 4-дезоксиниваленола и могут быть использованы для иммуноферментного анализа природных 8-оксотрихотеченов после соответствующей модификации. Чувствительность конкурентного анализа 3,15-диацетил-4-дезоксиниваленола составила 0,1 нг/мл. Замена макроносителя в твердофазных антигенах на желатин и столбнячный анатоксин при высокой нагрузке гаптенном не обеспечивала существенных преимуществ.

Введение

Биосинтетически связанные метаболиты двух широко распространенных видов токсигенных грибов *F. graminearum* Schw. и *F. culmorum*, имеющие строение 8-оксо-12,13-эпокситрихотец-9-ена с заместителями, расположенными при C₃, C₇ и C₁₅, образуют одну из самых известных групп структурно-родственных фузариотоксинов, четыре представителя которой идентифицированы в фузариозном зерне – 4-дезоксиниваленол (ДОН), 3-ацетил-ДОН, 15-ацетил-ДОН и 3,15-диацетил-ДОН.



ДОН $R_1 = R_2 = H$
 3-ацетил-ДОН $R_1 = COCH_3, R_2 = H$
 15-ацетил-ДОН $R_1 = H, R_2 = COCH_3$
 3,15-диацетил-ДОН $R_1 = R_2 = COCH_3$

Исследования показали, что индивидуальное определение каждого из этих веществ может быть проведено с использованием ГЖХ – масс-спектрометрии и ВЭЖХ – спектрофотометрии, но ввиду сложности исполнения эти приемы не могли быть рекомендованы для серийных испытаний. Общая структура этих соединений и единообразие в расположении заместителей позволяли рассчитывать на существенное упрощение аналитической задачи путем их исчерпывающего ацетилирования или дезацетилирования в ходе гидролиза. В 1991 г. нами был предложен вариант суммарной количественной оценки всех природных производных ДОН после гидролиза до одного компонента спиртовым раствором КОН с последующим измерением его содержания в условиях ТСХ-флуориметрии [2].

Исследование продукта ацетилирования ДОН показало, что в мягких условиях, исключающих изомеризацию, реакция идет неоднозначно и приводит к получению смеси 3,15-диацетил-ДОН и 3, 7, 15-триацетил-ДОН [5]. Осуществлять такое превращение в аналитических целях было целесообразно лишь при том условии, что детектирующая система сможет одинаково распознавать оба образующихся вещества. На принципиальную возможность ее создания указывали результаты иммунохимических исследований 3,15-диацильных производных ДОН и их структурных аналогов [6–9, 10, 11], которыми было установлено, что антитела к 15-гемиглутарату 3-ацетил-ДОН не распознают тип заместителя при C_7 . Это обстоятельство, которое могло быть связано с близким распо-

ложением данной части структуры к молекуле белка в конъюгате и возможным ее экранированием, позволяло надеяться на то, что антитела такого типа могут быть использованы для группового анализа трихотеценов после ацетилирования, несмотря на его неоднозначность.

Целью данной работы было получение конъюгатов 15-гемисукцинил-3-ацетил-4-ДОН с различными белковыми носителями и сравнительное изучение свойств антител к этому гаптену в условиях конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА).

Материалы и методы

В работе использовали этилендиамин дигидрохлорид (Е 2126), янтарный ангидрид (S 7626), N-гидроксисукцинимид (ГСИ) (Н 7377) и гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (КДИ) (Е 7750), полученные через фирму «Sigma» (США), пероксидазу хрена (МКФ 1.11.1.7), желатин (ЖЕЛ), бычий сывороточный альбумин (БСА), столбнячный анатоксин (САТ) и антисыворотку к иммуноглобулинам кролика отечественного производства.

ДОН, 3-ацетил-ДОН и 15-ацетил-ДОН выделяли из мицелиально-грибной биомассы по методу, описанному в работе [3]. 3,15-Диацетил-ДОН и 3,7,15-триацетил-ДОН получали реакцией ацетилирования ДОН уксусным ангидридом в растворе пиридина при комнатной температуре в течение 2 ч и последующим хроматографическим разделением продукта реакции.

Синтез гаптена 15-гемисукцината 3-ацетил-ДОН. 25 мг 3-ацетил-ДОН (78,6 мкмоль) растворяли в 7,5 мл пиридина, добавляли 0,38 г янтарного ангидрида (380 мкмоль) и кипятили смесь с обратным холодильником в течение 4 ч. Затем пиридин отгоняли в вакууме, к остатку добавляли 20 мл хлороформа, прокипятили раствор 5 мин с обратным холодильником и оставили при комнатной температуре на 16 ч. Образовавшийся осадок отфильтровали через бумажный фильтр, фильтрат поместили в делительную воронку и отмывали водой (5x35 мл). Все водные порции объединяли и экстрагировали этилацетатом (5x40 мл), экстракты объединяли, сушили безводным сульфатом натрия, упаривали досуха и взвешивали. Получили 6,7 мг 15-гемисукцината 3-ацетил-ДОН с выходом 20,4%. Идентичность продукта реакции подтверждали сравнением его с 3-ацетил-ДОН по спектрофотометрическим и хроматографическим характеристикам на силуфоле после обработок пластин 10%-ным раствором хлористого алюминия и 0,3%-ным спиртовым раствором бромфенолового синего.

Получение модифицированного этилендиамином БСА (эБСА). К раствору 30 мг БСА (0,43 мкмоль) в 1,5 мл воды приливали

раствор 10 мг дигидрохлорида этилендиамина (75 мкмоль) в 0,1 мл воды, добавляли 40 мг КДИ (210 мкмоль), перемешивали 2 ч, затем добавляли еще 20 мг КДИ (105 мкмоль), продолжали перемешивание в течение 16 ч и затем реакционную смесь подвергали исчерпывающему диализу против воды.

Синтез конъюгированных антигенов осуществляли через получение активированных эфиров гаптена с использованием двукратных мольных избытков ГСИ и эквимольных количеств КДИ. Смеси расчетных объемов растворов 15-гемисукцината 3-ацетил-ДОН, ГСИ и КДИ в диметилформамиде с концентрациями 10 мг/мл перемешивали 1 ч при комнатной температуре, затем добавляли 1 мл раствора расчетного количества белка в карбонатном буфере рН 9, продолжали перемешивание в тех же условиях 16 ч и затем подвергали исчерпывающему диализу в 0,2%-ном растворе хлористого натрия, по завершении которого к раствору добавляли равный объем глицерина. Сокращенные обозначения синтезированных конъюгатов и мольные соотношения реагентов в реакциях приведены в табл. 1.

Таблица 1

Условия получения белковых конъюгатов с использованием 15-гемисукцината 3-ацетил-ДОН в качестве гаптена

Сокращенное обозначение конъюгата	Мольный избыток гаптена	Количество реагентов в реакции, мкмоль	
		гаптен	белок
БСА-3-ацетил-ДОН (25)	25	2,5	0,1
БСА-3-ацетил-ДОН (63)	63	2,28	0,036
БСА-3-ацетил-ДОН (100)	100	7,0	0,07
эБСА-3-ацетил-ДОН (75)	75	7,5	0,1
САТ-3-ацетил-ДОН (100)	100	3,0	0,03
ЖЕЛ-3-ацетил-ДОН (200)	200	10,0	0,05

Иммунизацию кроликов проводили 100 мкг конъюгата эБСА-3-ацетил-ДОН (75), эмульгированного в полном адъюванте Фрейнда, в последующие иммунизации – тем же количеством иммуногена в физиологическом растворе. Тестирование антисывороток выполняли сначала неконкурентным ИФА в диапазоне разведения 1:1000-1:1000000 для оценки связывания с твердофазным антигеном БСА-3-ацетил-ДОН (63), сорбированным из раствора с концентрацией 0,15 мкг/мл, а затем в рабочих разведениях в конкурентном анализе со свободным 3-ацетил-ДОН. Все синтезированные конъюгаты тестировали в качестве твердофазных антигенов при сорбции из растворов с концентрацией 0,15 мкг/мл.

Специфичность антител оценивали по результатам конкурентного ИФА для растворов ДОН, 3-ацетил-ДОН, 15-ацетил-ДОН, 3, 15-диацетил-ДОН и 3, 7, 15-триацетил-ДОН в ацетонитриле с исходной концентрацией 100 мкг/мл. Относительную перекрестную реактивность рассчитывали как отношение концентрации каждого аналога, вызывающей 50%-ное ингибирование связывания антител с твердой фазой, к соответствующей концентрации 3-ацетил-ДОН.

ИФА выполняли на микропланшетах «Corning» (США), для измерения оптической плотности при 492 нм использовали фотометры «ИФА-ОЭП-С» и «АКИЦ-01» (Россия), условия иммуноанализа не отличались от описанных нами ранее [1]. УФ-спектры снимали на приборе «Hitachi-557» (Япония), масс-спектры получали методом лазерной десорбции в рефлекторном режиме с использованием в качестве матрицы 2,5-дигидроксибензойной кислоты на приборе «Vision 2000» (фирма «Finnigan», США).

Результаты и обсуждение

Попытки получения иммунореагентов для группового анализа природных аналогов ДОН в виде ацетильных производных были начаты в 1986 г. американскими исследователями, сообщившими о получении антител высокоспецифичных к триацетату ДОН, при иммунизации кроликов 8-гемисукцинатом 7, 8-диоксикалопектрина [11]. В том же году получением английскими исследователями антител к 15-гемиглутарату 3-ацетил-ДОН [6] было положено начало подробным иммунохимическим исследованиям различных 3, 15-диацетильных замещенных ДОН в качестве гаптенных, проведенным в Германии [7–9] и в Канаде [10]. При обобщении приведенных в литературе данных стало очевидно, что только использование аналога 3-ацетил-ДОН, ацилированного по C_{15} , может позволить получить иммунореагенты, пригодные для упрощенного варианта анализа этих соединений после ацетилирования. Для проверки такой возможности нами был предпринят синтез 15-гемисукцината 3-ацетил-ДОН, связывание его N-гидрокси-сукцинимидного эфира с различными белковыми носителями и изучение иммунохимических свойств полученных конъюгатов.

Реакция сукцинирования 3-ацетил-ДОН избытком янтарного ангидрида при нагревании в течение 4 ч, как и ожидалось, привела к образованию продукта, замещенного по одному положению — C_{15} . На это указывало сохранение у вещества способности флуоресцировать в УФ после обработки раствором хлористого алюминия и нагревания, свойственной 8-оксотрихотеченам со свободной C_7 -гидроксильной группой. Действительно, в литературе есть достаточно свидетельств тому, что ацилирование C_7 -ОН у этих соеди-

нений крайне затруднительно. Так, взаимодействие 7,8-дигидроксикалонектрина с янтарным ангидридом в присутствии 4-диметиламинопиридина привело к образованию 7-гидрокси-8-сукцинилкалонектрина [11]. При ацетилировании 8-гидразобензоильного производного ДОН в пиридине, судя по данным масс-спектра, был получен 7-гидрокси-8-гидразобензоил-3,15-диацетил-ДОН с выходом 80% [12]. Многократно повторенная нами реакция сукцинирования ДОН избытком янтарного ангидрида при длительном нагревании также всегда завершалась образованием в качестве основного продукта его 3,15-дисукцината, сохраняющего способность к флуоресценции в УФ под действием хлористого алюминия и имеющего в масс-спектре лазерной десорбции максимальный по интенсивности пик иона (M+Na) при m/z 519, что указывало на молекулярную массу вещества, равную 496.

По некоторым данным, эффективность конъюгирования карбоксилсодержащих гаптенон с БСА возрастает при использовании носителя, в котором собственные карбоксильные группы блокированы этилендиамином [4]. В связи с этим мы провели обработку БСА этилендиамином и затем использовали его конъюгат с гаптенон для иммунизации животных.

Титры (рабочие разведения) антисывороток оставались практически неизменными — от 5 тыс. до 10 тыс., но при этом процесс формирования аналитических свойств антител имел свои особенности. Тестирование первых четырех сывороток, полученных при повторных ежемесячных иммунизациях, показало, что для всех порог высокодозового плато находится на концентрации 100 нг/мл, соответствует уровню 45%, а динамика прироста измеряемого показателя выражена слабо (рис. 1).

Последовавшая за этим 3-месячная пауза в процедуре иммунизации привела при 5-м отборе крови к некоторому снижению стартового уровня измерений до 30%, однако при возобновлении ежемесячных повторных иммунизаций этот эффект больше не развивался. Очередная 2-месячная пауза перед 9-м отбором крови также привела к улучшению аналитических характеристик тест-системы — процент связывания антител при концентрации 3-ацетил-ДОН, равной 100 нг/мл, составлял уже 20% и достигал предельного значения 95% при концентрации 0,1 нг/мл. Последовавшие за этим два ежемесячных отбора крови (10-й и 11-й) указывали на сохранение сыворотками приобретенных характеристик.

У антител аналитического качества равношаговому изменению концентрации свободного конкурента внутри диапазона 0,1–100 нг/мл должно соответствовать пропорциональное изменение измеряемого сигнала — процент связывания антител с твердой фа-

зой от 20 до 80% с примерно равным приростом в 20–30%. Таким образом, в сыворотках от 9–11 отборов крови было достигнуто полное соответствие таким требованиям.

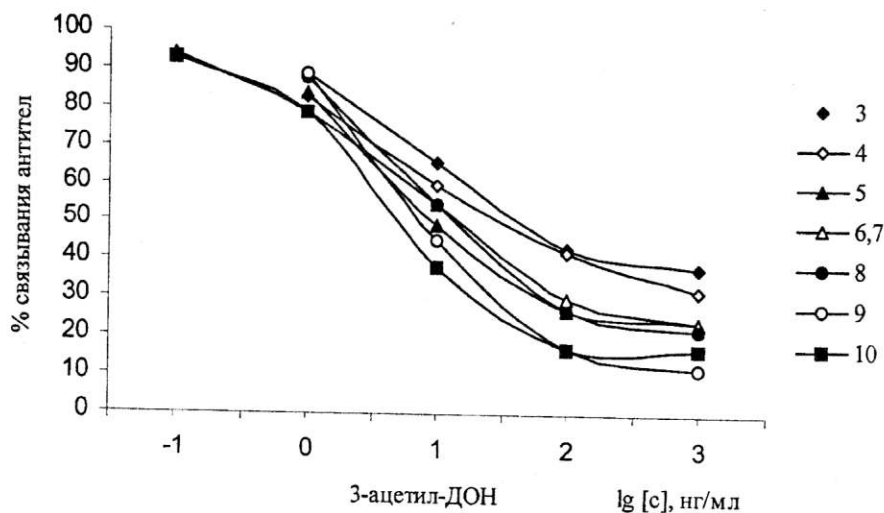


Рис. 1. Результаты конкурентного ИФА с твердофазным БСА-3-ацетил-ДОН (63) при тестировании антисывороток от 3 до 10 взятия крови.

Получение аналитически пригодных антител в неоптимизированных условиях динамического тестирования сывороток на одном твердофазном антигене, чаще иммуногене или близком к нему конъюгате, как в данном случае, является ключевым моментом в создании конкурентного ИФА и уже само по себе означает принципиальное решение проблемы. При необходимости коррекция функционирования тест-системы может быть выполнена дополнительными исследованиями взаимодействия этих антител с иммобилизованными антигенами, отличающимися белком-носителем, эпитопной плотностью, методом синтеза, гаптенной детерминантой и т.д., которое принято называть оптимизацией условий анализа путем гетерологичного комбинирования иммунореагентов.

Выбор твердофазного антигена, в наибольшей мере отвечающего целям высокочувствительного ИФА, был проведен не только путем тестирования конъюгатов БСА с разной гаптенной нагрузкой и конъюгатов с ЖЕЛ, САТ и модифицированным БСА, полученных при значительных избытках гаптена в реакции. Результаты изучения взаимодействия анти-3-ацетил-ДОН антител с этими конъюгатами приведены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты конкурентного взаимодействия анти-эБСА-3-ацетил-ДОН сыворотки от 10 отбора крови с твердофазными антигенами, детерминированными 3-ацетил-ДОН

Иммобилизованный конъюгат	Связывание антител, %				
	концентрация раствора 3-ацетил-ДОН, нг/мл				
	1000	100	10	1	0,1
БСА-3-ацетил-ДОН (25)	-	43	48	81	96
БСА-3-ацетил-ДОН (63)	-	17	38	79	93
БСА-3-ацетил-ДОН (100)	12	20	32	74	90
эБСА-3-ацетил-ДОН (75)	75	78	86	96	-
ЖЕЛ -3-ацетил-ДОН (200)	42	46	54	77	-
САГ -3-ацетил-ДОН (100)	-	38	50	91	96

Обозначения: «-» – не определяли.

Наилучшие показатели анализа обеспечили два конъюгата – БСА-3-ацетил-ДОН (63) и БСА-3-ацетил-ДОН(100) – эффект ингибирования связывания 3-ацетил-ДОН активно развивался в диапазоне концентраций от 0.1 до 10 нг/мл и был прямо пропорционален концентрации. Все остальные конъюгаты не только не показали преимуществ, но и уступали им по всем показателям.

Оценка перекрестной реактивности антител с ДОН, 15-ацетил-ДОН, 3-ацетил-ДОН, 3, 15-диацетил-ДОН и 3, 7, 15-триацетил-ДОН была выполнена на сыворотке от 10-го отбора крови. Полученные результаты (рис. 2) свидетельствовали о ее явно преимущественном и примерно равном сродстве к двум последним соединениям – ИК₅₀ для 3, 15-диацетил-ДОН и 3, 7, 15-триацетил-ДОН были равны 0,08 нг/мл и 0,06 нг/мл соответственно. Гораздо меньшее узнавание отмечено в отношении 3-ацетил-ДОН (ИК₅₀ = 2,8 нг/мл) и 15-ацетил-ДОН (ИК₅₀ = 79,4 нг/мл). Использование ДОН в качестве свободного конкурента в концентрации 10 мкг/мл приводило к снижению связывания антител с твердой фазой лишь на 30% от контрольного уровня. Сравнение полученных нами результатов с данными по перекрестной реактивности подобных антител, приведенными в работах зарубежных исследователей, показало их полное соответствие (табл. 3).

Таким образом, результаты проведенных исследований показывают, что использование в ИФА антител к 15-гемисукцинату 3-ацетил-ДОН, конъюгированному с модифицированным этилендиамином БСА, и твердофазных антигенов, гомологичных иммуногену по методу синтеза, имеет несомненную аналитическую перспективу. Возможность высокочувствительного и равного узнавания антителами двух аналогов, образующихся при ацилировании

большой группы токсичных 8-оксотрихотеценов, позволяет надеяться на создание тест-систем, пригодных для группового анализа этих соединений в зерне и способных обеспечить надежный и своевременный контроль его санитарного качества.

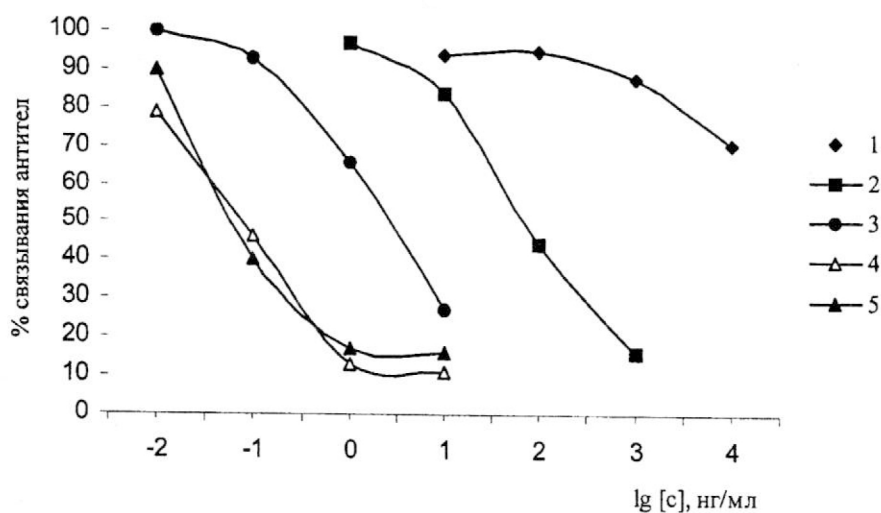


Рис. 2. Влияние ДОН (1), 15-ацетил-ДОН (2), 3-ацетил-ДОН (3), 3,15-диацетил-ДОН (4) и 15-триацетил-ДОН (5) на взаимодействие антител с твердофазным БСА-3-ацетил-ДОН (63).

Таблица 3

Относительная перекрестная реактивность антител, индуцированных на различные ацильные производные ДОН, %

Трихотецены	Тип гаптена в иммуногене					
	3,15-дигемисукцинат ДОН	15-гемиглутарат (гемисукцинат) 3-ацетил-ДОН				3-гемиглутарат 15-ацетил-ДОН
		[7]*	[6]*	[9]*	[10]*	
ДОН	1	0,007	<0,1	0,01	<0,03	0,01
15-ацетил-ДОН	1,1	-	1,6	4,6	3,5	100
3-ацетил-ДОН	100	100	100	100	100	0,18
3,15-диацетил-ДОН	-	-	2300	917	3500	602
3,7,15-триацетил-ДОН	-	-	2300	917	4700	0,85

Обозначения: «-» — не определяли;

* — литературный источник.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кононенко Г.П., Буркин А.А., Соболева Н.А., Зотова Е.В. Иммуноферментный метод определения Т-2 токсина в контаминированном зерне // Прикладная биохимия и микробиология. – 1999. – Т. 35. – № 4. – С. 457–462.
2. Кононенко Г.П., Соболева Н.А., Леонов А.Н. Методика определения суммарного содержания дезоксиниваленола и его моноацетатов в контаминированном зерне // Доклады ВАСХНИЛ. – 1991. – № 2. – С. 27–30.
3. Леонов А.Н., Кононенко Г.П., Соболева Н.А. Особенности биосинтеза трихотеценов у изолятов *Fusarium graminearum* Schwabe (579A ВНИИЗ) на зерне // Микология и фитопатология. – 1990. – Т. 4. – № 6. – С. 551–557.
4. Chu F.S., Lau H.P., Fan T.S., Zhang G.S. Ethylenediamine Modified Bovine Serum Albumin as Protein Carrier in the Production of Antibody against Mycotoxins // Journal of Immunological Methods. – 1982. – V. 55. – P. 73–78.
5. Greenhalgh R., Gilbert J., King R.R., Blackwell B.A., Startin J.R., Shepherd M.J. Synthesis, characterization, and occurrence in bread and cereal products of an isomer of 4-deoxynivalenol (vomitoxin) // J. Agric. Food Chem. – 1984. – V. 32. – N 6. – P. 1416–1420.
6. Kemp H.A., Mills E.N.C., Morgan M.R.A. // Enzyme-linked Immunosorbent Assay of 3-Acetyldeoxynivalenol Applied to Rice. // J. Sci. Food Agric. – 1986. – V. 37. – N 9. – P. 888–894.
7. Usleber E., Martlbauer E., Dietrich R., Terplan G. Direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Detection of the 8-Ketotrichothecene Mycotoxins Deoxynivalenol, 3-Acetyldeoxynivalenol, and 15-Acetyldeoxynivalenol in Buffer Solutions // J. Agric. Food Chem. – 1991. – V. 39. – N 11. – P. 2091–2095.
8. Usleber E., Schneider E., Martlbauer E., Terplan G. Two Formats of Enzyme Immunoassay for 15-Acetyldeoxynivalenol Applied to Wheat // J. Agric. Food Chem. – 1993. – V. 41. – N 11. – P. 2019–2023.
9. Usleber E., Abramson D., Gessler R., Smith D.M., Clear R.M., Martlbauer E. Natural Contamination of Manitoba Barley by 3,15-Diacetyldeoxynivalenol and Its Detection by Immunochromatography // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – V. 62. – N. 10. – P. 3858–3860.
10. Wang N.A., Kierek-Jaszczuk D., Marquardt R.R., Frohlich A.A., Abramson D. Use of a Heterologous Bridge Coating Antigen for the Immunoassay of 3-Acetyldeoxynivalenol in Barley // J. Food Protection. – 1996. – V. 59. – N. 5. – P. 525–533.
11. Zhang G.-S., Li S.W., Chu F.S. Production and Characterization of Antibody against Deoxynivalenol Triacetate // J. Food Protection. – 1986. – V. 49. – N. 5. – P. 336–339.
12. Xu Y.-Ch., Zhang G.-Sh., Chu F.S. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Deoxynivalenol in Corn and Wheat // J. Assoc. Off. Anal. Chem. – 1988. – V. 71.N.5. – P. 945–949.

IMMUNOCHEMICAL EVALUATING THE PROTEIN
CONJUGATES OF 15-HEMISUCCINATE
3-ACETYL-4-DEOXYNIVALENOL

G.P. KONONENKO, A.A. BURKIN, N.A. SOBOLEVA