

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
BIOORGANIC CHEMISTRY

УДК 573.6.086.83:57.083.3+619.636

Поступила в редакцию 26.01.2016

Received 26.01.2016

**И. И. Вашкевич¹, Т. В. Терентьева¹, Г. С. Корнилович², Л. Н. Сухенко²,
А. И. Шибeko², О. В. Свиридов¹**

¹*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

²*Центральная научно-исследовательская лаборатория хлебопродуктов, Минск, Республика Беларусь*

**НОВЫЙ НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ЗЕАРАЛЕНОНА В КОРМАХ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ**

Разработан и испытан набор реагентов ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН для определения микотоксина зearаленонa в кормах и пищевой продукции методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа в микропланшетном формате. Установленные технико-аналитические параметры набора и метрологические характеристики методики выполнения измерений соответствуют современному уровню развития иммуноанализа и позволяют с надлежащей точностью определять содержание зearаленонa в диапазоне от 50 до 800 мкг/кг в сельскохозяйственной продукции.

Ключевые слова: микотоксины, зearаленон, иммуноферментный анализ.

**I. I. Vashkevich¹, T. V. Terentjeva¹, G. S. Kornilovich², L. N. Sukhenko²,
A. I. Shibeko², O. V. Sviridov¹**

¹*Institute of Bioorganic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

²*Central research laboratory of Grain Products, Minsk, Republic of Belarus*

A NEW KIT OF REAGENTS FOR THE ELISA DETERMINATION OF ZEARELENONE IN FEEDS AND FOODS

The EIA-ZEARELENONE reagent kit for the determination of zearalenone mycotoxin in feed and food by direct ELISA using microtitration plate has been developed and tested. The evaluated technico-analytical parameters of the kit and metrological characteristics of the technique of measurements correspond to the modern level of immunoassay development and provide the determination of zearalenone content in agricultural products in a range of 50 to 800 µg/kg with proper accuracy and precision.

Keywords: mycotoxins, zearalenone, ELISA.

Введение. Зearаленон является продуктом метаболизма грибов рода *Fusarium*, поражающих вегетирующие зерновые и зернобобовые культуры. Чаще всего он встречается в кукурузе, пшенице и продуктах из них. При попадании в организм теплокровных зearаленон способен оказывать эстрогеноподобное действие и вызывать серьезные нарушения репродуктивной системы [1, 2]. Вопросы, касающиеся международной системы обязательного контроля кормов и продуктов на наличие шести основных микотоксинов, в число которых входит зearаленон, скрининговых исследований содержания микотоксинов в сельскохозяйственной продукции растительного происхождения с помощью наборов реагентов для иммуноферментного анализа (ИФА) и сложившейся ситуации с такими исследованиями в нашей стране, освещены во вводной части нашей предыдущей статьи [3]. В данной публикации описаны разработка и свойства набора реагентов ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН.

Материалы и методы. Чистый зearаленон, гемигидрохлорид (аминокси)уксусной кислоты, диизопропилкарбодиимид, N-гидроксисукцинимид, детергенты и бактериостатики приобретены у фирмы «Sigma-Aldrich» (США). Очищенная пероксидаза из корней хрена (ПХ) поступила от фирмы «ДиаЭМ» (РФ). Разборные микропланшеты из полистирола, состоящие из двенадцати 8-луночных полосок (стрипов), куплены у «Greiner bio-one» (Германия). Моноклональное анти-

тело (МАт) к зеараленону и хромоген-субстратный раствор (3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) в смеси с органическим пероксидом) получены от ООО «ИЛ Тест-Пушино» (РФ). Индивидуальные хромоген (раствор ТМБ) и субстрат (раствор H_2O_2), а также стоп-реагент (раствор H_2SO_4) поступили от УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси».

В экспериментах применяли воду с удельным электрическим сопротивлением 17–18 МОм·см⁻¹, очищенную в модульной установке Water Pro Plus (Labconco, США). Для детекции колориметрического сигнала в ИФА использовали приборы АИФ М/340 (Беларусь). Спектры ультрафиолетового поглощения растворов зеараленона и его производных снимали в кювете с длиной оптического пути 1 см в приборе Specord M 40 («Carl Zeiss», Германия).

Ферментный конъюгат зеараленона получали через промежуточный 6-карбоксиметилоским путем активирования введенной карбоксильной группы N-гидроксисукцинимидом и последующего ацилирования первичных аминогрупп фермента, как описано нами ранее [3]. Содержание остатков микотоксина в конъюгате зеараленон-ПХ определяли путем дифференциальной спектрофотометрии, используя $\epsilon_{270} \sim 12\ 600\ M^{-1}cm^{-1}$ для зеараленона. Очищенные конъюгаты переводили в 50 %-ный глицерин и хранили при -18 °С.

Синтез конъюгатов МАт с биотином осуществляли следующим образом. Исходные концентрированные растворы МАт, содержащие глицерин и Трис-НСl, переводили в фосфатно-солевой буфер последовательными процедурами диализа и гель-фильтрации на сефадексе G-25. В раствор с концентрацией МАт около 1 мг/мл по каплям при постоянном перемешивании прибавляли раствор в диметилсульфоксиде N-гидроксисукцинимидного эфира биотина или биотинил-ε-аминокапроновой кислоты в мольном соотношении иммуноглобулин : реагент = 1 : (10–20) и выдерживали при комнатной температуре в течение 3 ч. Конъюгат биотин-МАт отделяли от избытка реагента гель-фильтрацией на сефадексе G-25 и одновременно переводили в стабилизирующий буфер. Концентрацию химически модифицированного МАт определяли спектрофотометрически по известному коэффициенту экстинкции при 280 нм. Лигандную активность конъюгата биотин-МАт в отношении биотинсвязывающего белка оценивали с использованием планшета, покрытого авидином, путем выявления связанных мышинных иммуноглобулинов антимышиными антителами, мечеными комплексоном Eu^{3+} , и детекции сигнала в диссоциативно-усиливающем растворе флуориметрией с задержкой во времени регистрации излучения [4]. Раствор биотин-МАт хранили в холодильнике при температуре от +2 до +8 °С в течение месяца. Для более длительного хранения модифицированное МАт переводили в 50%-ный водный раствор глицерина и помещали в морозильник с температурой минус -18 °С.

Микропланшетный иммуносорбент получали биоспецифической иммобилизацией или пассивной (физической) адсорбцией МАт в лунках. В первом случае полистирольную поверхность лунки предварительно покрывали авидином [5] и прибавляли биотинилированное МАт (0,1 мл, 0,1–1,0 мг/л). Для простой адсорбции брали немодифицированное МАт в количествах 100–400 нг на лунку. Для стабилизации иммобилизованного МАт применяли специальные растворы, содержащие инертные для анализа белки, неорганические соли, сахара и антибактериальные добавки.

В состав готового набора ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН входят следующие компоненты:

- иммуносорбент, 96-луночный полистирольный планшет, 12 стрипов по 8 лунок с биоспецифически иммобилизованным МАт готовый к использованию, 1 планшет;
- планшет для смешивания, 96-луночный полистирольный планшет, 12 стрипов по 8 лунок, 1 планшет;
- градуировочные растворы зеараленона, жидкие препараты, 5 флаконов, (0,7±0,02) мл; массовая концентрация зеараленона в диапазоне (0, 2,5–40) нг/мл (с учетом фактора разведения при пробоподготовке соответствует массовой доле зеараленона в пробах 0, 50–800 мкг/кг или ppb);
- конъюгат зеараленон-ПХ, жидкий препарат, 21-кратный концентрат, 1 флакон или микропробирка, (0,30 ± 0,02) мл;
- раствор для разбавления конъюгата, жидкий препарат, 1 флакон, (10,0±0,5) мл;
- хромоген-субстратный раствор, жидкий препарат, 1 флакон, (12,0±0,5) мл;
- стоп-реагент, жидкий препарат, 1 флакон, (15,0±0,5) мл.

Если при подготовке набора к работе предусматривается приготовление хромоген-субстратной смеси, то компонентами набора являются раствор ТМБ, 1 флакон ($0,7 \pm 0,02$) мл и субстратный буферный раствор, 1 флакон ($14,0 \pm 0,5$) мл.

В кратком изложении методика применения набора ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН состоит в следующем. Образец корма или пищевого продукта размалывали на мельнице типа «Циклон» и просеивали через лабораторное сито с отверстиями диаметром 1 мм. Точную навеску (5,0 г) размолотого образца экстрагировали 25 мл смеси метанол–вода в объемном соотношении 70:30, раствор фильтровали, доводили рН до значения 6–8. В пробирку отбирали дозатором 0,5 мл фильтрата и добавляли 0,5 мл дистиллированной воды. Раствор перемешивали и добавляли 1 мл раствора смеси метанол–вода в объемном соотношении 35:65. Пробирку закрывали пробкой, раствор перемешивали и использовали для проведения ИФА в течение последующих 2 ч. При выполнении измерений проб с концентрацией зеараленона, превышающей верхний предел измерений, добавляли в зависимости от необходимого разбавления 2, 3, 4 или 5 мл раствора метанол : вода = 35:65 вместо 1 мл этого раствора. При этом фактор дополнительного разбавления равен соответственно 1,5, 2,0, 2,5, 3,0.

В лунки планшета для смешивания восьмиканальным дозатором вносили по 50 мкл конъюгата зеараленон-ПХ, а затем добавляли в дубликатах по 100 мкл каждого градуировочного раствора и растворов проб каждого исследуемого образца. Немедленно после перемешивания отбирали восьмиканальным дозатором и вносили в лунки микропланшетного иммуносорбента по 100 мкл градуировочных растворов и растворов проб вместе с конъюгатом. Закрытый иммуносорбент инкубировали в течение 15 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре от +20 до +25 °С. По окончании времени инкубации растворы из всех лунок удаляли и с применением восьмиканального дозатора проводили 5-кратное промывание планшета дистиллированной водой порциями по 200 мкл на одно промывание каждой лунки, выдерживая заполненные лунки не менее 10 с. Далее в каждую лунку промытого планшета-иммуносорбента восьмиканальным дозатором вносили 100 мкл хромоген-субстратного раствора. Общее время внесения не более 2 мин. Закрытый планшет инкубировали в течение 5 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре от +20 до +25 °С. По истечении времени инкубации в каждую лунку планшета восьмиканальным дозатором вносили 100 мкл стоп-реагента и растворы в лунках перемешивали круговыми движениями планшета по поверхности лабораторного стола. В течение не более 15 мин после добавления стоп-реагента измеряли оптическую плотность в каждой лунке на микропланшетном фотометре при длине волны 450 нм.

Обработку результатов измерений проводили с применением прилагаемого к набору шаблона в формате Microsoft Excel. В соответствующие графы шаблона вносили полученные в условиях повторяемости результаты измерения оптической плотности градуировочных растворов C_0 – C_4 и растворов исследуемых проб. Компьютерная программа автоматически рассчитывает параметры связывания конъюгата зеараленон-ПХ иммобилизованным МАт для градуировочных растворов C_1 – C_4 и для раствора неизвестной пробы относительно градуировочного раствора C_0 строит градуировочную зависимость и рассчитывает массовую долю зеараленона в пробе, C , мкг/кг (ppb).

При разработке набора ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН его технико-аналитические параметры настраивали с учетом установленных в Беларуси предельно допустимых уровней содержания зеараленона (200–1000 мкг/кг) в пищевых продуктах, кормах и комбикормах [6].

Метрологические характеристики методики выполнения измерений массовой доли зеараленона набором реагентов ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН получены на основании экспериментальных данных в ходе внутрिलाбораторных испытаний с использованием образцов зерна злаковых и масличных культур (пшеница, рожь, овес, тритикале, ячмень, кукуруза, соя, рапс), продуктов их переработки (мука, мучки, отруби), жмыхов, шротов и комбикормов. При этом концентрации микотоксина находились в начальном, среднем и конечном отрезках градуировочной кривой, что соответствовало 58, 271, 366, 476, 588 и 736 мкг/кг (ppb). Подготовленные образцы анализировали в условиях повторяемости в лаборатории с изменяющимся фактором «время + оператор». Показатели прецизионности и правильности определяли соответственно по СТБ ИСО 5725-3 и СТБ ИСО 5725-4, а оценки неопределенности делали, как описано в руководствах [7, 8].

Результаты исследований и их обсуждение. В химическом отношении зеараленон представляет собой ароматический поликетид, конкретно – циклический лактон 6-(10'-гидрокси-6'-оксо-*транс*-1'-ундеценил)- β -резорциловой кислоты или 3,4,5,6,9,10-гексагидро-14,16-дигидрокси-3-метил-1*H*-2-бензоксациклотетрадецин-1,7(8*H*)-дион, что следует из его формулы на рис. 1. Этот микотоксин имеет молекулярную массу 318 г/моль. Он растворим в обычных полярных растворителях (ацетонитрил, ацетон, этанол) и не растворим в воде. Его УФ-спектр имеет несколько пиков поглощения (236, 274, 316 нм; раствор в метаноле). Коэффициент экстинкции в ацетонитриле $\epsilon_{274} = 12600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, пик сине-зеленой флуоресценции в этаноле имеет максимум при 450 нм.

Как и в случае афлатоксина В₁, модификация зеараленона для получения конъюгатов, пригодных для прямого (иммобилизованные на твердой фазе антитела и меченный ферментом антиген в растворе) [3] или непрямого (твёрдофазный антиген и растворенные антитела) [9] ИФА, включала синтез карбоксиметилоксима у С6 и последующее активирование введенной карбоксильной группы N-гидрокси-сукцинимидом в присутствии карбодиимида. В другой работе [10] для получения белковых конъюгатов зеараленона была использована реакция формальдегидной конденсации, которую относят к числу классических приемов биоконъюгирования. Присоединение зеараленона к белку через фенольное кольцо проводили также путем нитрования с последующими стадиями восстановления и конъюгирования полученного 15-аминозеараленона через глутаровый альдегид с полипептидной цепью [11].

В настоящее время разработаны и используются методы гетерогенного прямого [12, 13] и непрямого [9, 10, 13] конкурентного ИФА для определения зеараленона с применением поликлональных [9, 10] или моноклональных [11–13] антител.

Набор реагентов ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН основан на принципе прямого конкурентного ИФА (рис. 2). Микотоксин экстрагировали из размолотого образца раствором метанол:вода = 70 : 30. В лунки планшета для предварительного смешивания вносили конъюгат зеараленона с ПХ и добавляли градуировочные растворы зеараленона с известной концентрацией и подготовленные к анализу растворы проб. Во время последующей инкубации в планшетном иммуносорбенте зеараленон в составе градуировочного раствора или исследуемой пробы конкурирует с конъюгатом зеараленон-ПХ за связывание с биотинилированным антителом, иммобилизованным через биотинсвязывающий белок авидин на внутренней поверхности лунок. После промывки, в ходе которой из лунок удаляли не прореагировавшие с антителом компоненты, к системе добавляли хромоген-субстратный раствор, который позволил визуализировать реакции антиген–антитело. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации зеараленона в анализируемом образце или градуировочном растворе. Затем добавляли стоп-реагент, останавливающий цветную реакцию и одновременно изменяющий цвет окраски. Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряли на микропланшетном фотометре, как величину оптической плотности при длине волны 450 нм. По результатам измерений оптической плотности градуировочных растворов с известным содержанием зеараленона строили градуировочную зависимость, с помощью которой определяли массовую долю зеараленона в анализируемых образцах.

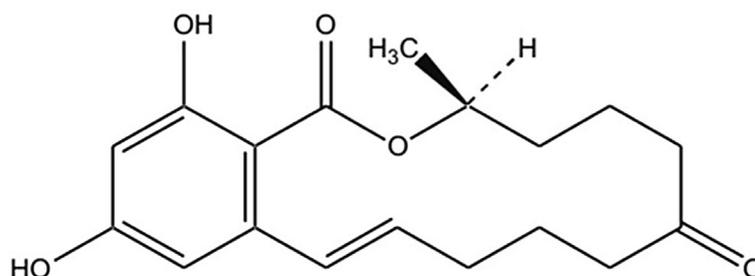


Рис. 1. Структурная формула зеараленона

Fig. 1. Chemical structure of zearalenone

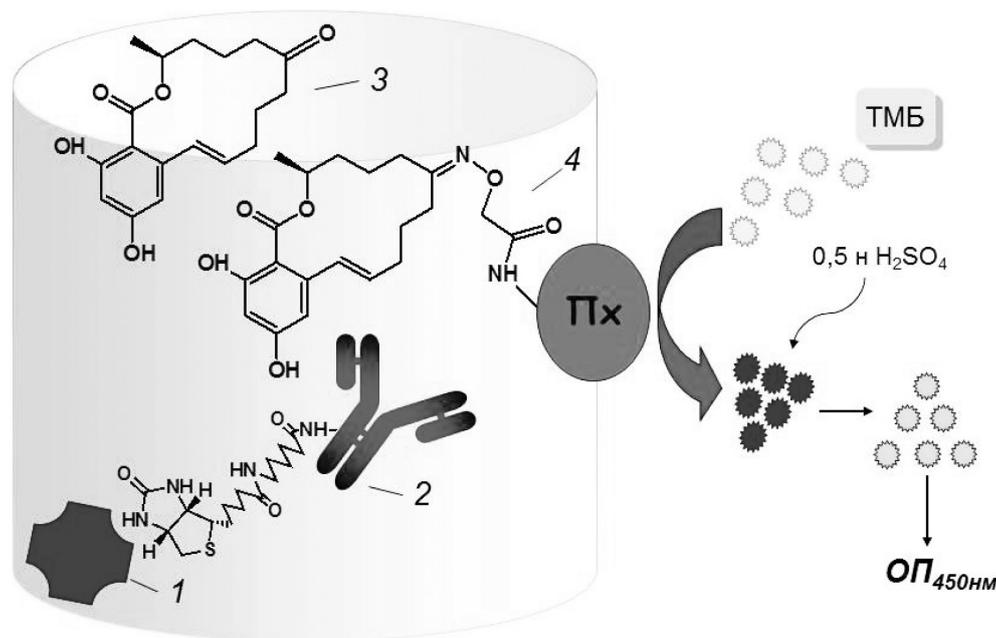


Рис. 2. Конструкция и принцип действия набора реагентов ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН: 1 – авидин, 2 – моноклональное антитело к зearаленону, 3 – зearаленон, 4 – конъюгат 6-карбоксиметилоксида зearаленона и пероксидазы хрена, ТМБ – хромоген 3,3',5,5'-тетрамтилбензидин

Fig. 2. The construction and operation of EIA-ZEARALENONE kit. 1 – avidin, 2 – monoclonal antibody to zearalenone, 3 – zearalenone, 4 – conjugate of zearalenone 6-carboxymethyl oxime and horseradish peroxidase, TMB – chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

Базовым компонентом набора ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН является разборный пластмассовый микропланшет (иммуносорбент), лунки которого покрыты специфическим МАт к зearаленону. Пассивно (физически) адсорбированное МАт в лунках рабочего планшета обеспечивало приемлемую аналитическую чувствительность в отношении микотоксина (около 40 мкг/кг образца) только при очень низком колориметрическом сигнале в лунках (B_0 не выше одной оптической единицы). Биоспецифическая иммобилизация МАт после его биотинилирования и последующего взаимодействия с пассивно адсорбированным авидином существенно увеличивала устойчивость антитела к метанолу в ИФА-системе. В результате оптическая плотность в «нулевой» пробе повышалась до 1,9, что позволяло построить типичный градуировочный график в координатах \log_{it}/\log , представленный на рис. 3.

Градуировочные пробы как компоненты разработанного набора – это растворы на основе стабилизированных водно-органических сред с точными концентрациями зearаленона, проверенными по международным стандартам и независимыми физико-химическими методами. Конъюгат антигена с ферментом представляет собой бифункциональное химическое соединение на основе зearаленона и ПХ, имеющее высокие и стабильные показатели энзиматической активности и сродства к иммобилизованному МАт. Хромоген-субстратная смесь – ТМБ и органический пероксид, индифферентные в подобранных условиях совместного хранения, но взаимодействующие в ходе ферментативной реакции на заключительной стадии анализа с образованием продуктов, высокочувствительная детекция которых обеспечивается регистрацией колориметрического сигнала в видимой области спектра многоканальным планшетным спектрофотометром. Стоп-реагент – разбавленная H_2SO_4 в нужной концентрации, останавливающая ферментативный процесс с изменением окраски продуктов реакции и фиксацией ее на уровне и во времени, которые оптимальны для надежной детекции.

В табл. 1 приведены значения технико-аналитических параметров набора реагентов ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН, усредненные по результатам независимых ИФА, которые были выполнены в ходе внутрилабораторных испытаний опытной партии набора.

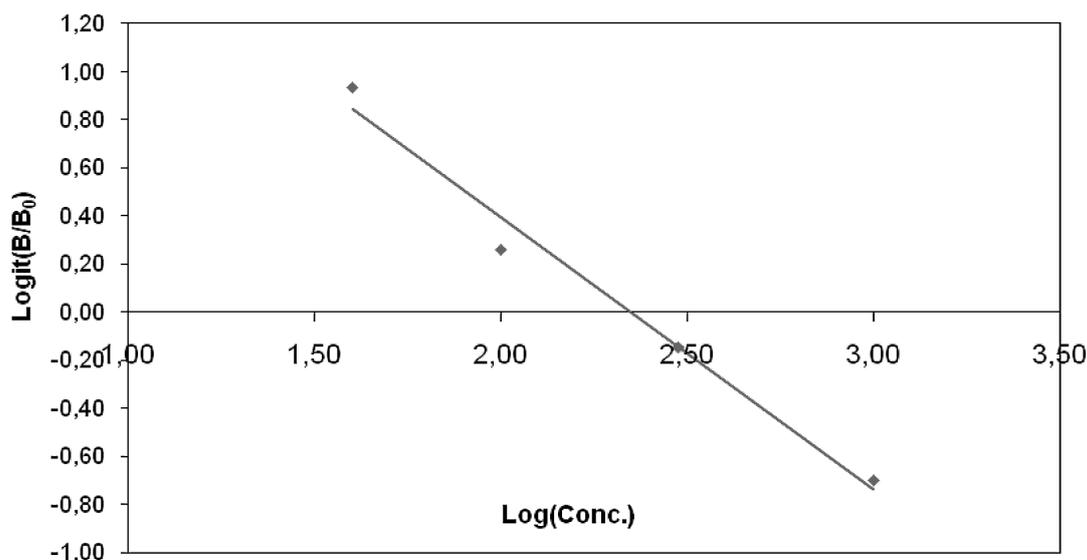


Рис. 3. Типичный градуировочный график набора реагентов ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН

Fig. 3. Typical calibration curve for EIA-ZEARALENONE

Т а б л и ц а 1. Техничко-аналитические параметры набора ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН

Наименование показателя	Предписанное значение	Полученное значение
Соотношение B_0, B_1, B_2, B_3, B_4 , о. е.	$B_0 > B_1 > B_2 > B_3 > B_4$	$B_0 > B_1 > B_2 > B_3 > B_4$
B_0 , о. е.	1,3–2,7	2,03
B_4 , о. е., не более	0,3	0,13
B_1/B_0 , %	70–95	86
B_4/B_0 , %	5–30	6
Чувствительность ² , нг/мл, не более	2,5	< 2,0
50 % интерсепт ³ , мкг/кг (ppb), в пределах	110–200	170
Коэффициент вариации ⁴ , %, не более	15	4,2

П р и м е ч а н и я: ¹ B_0 – B_4 – оптические плотности растворов в лунках, содержащих градуировочные пробы с увеличивающейся концентрацией зearаленона (C_0 – C_4) соответственно, измеряемые в оптических единицах (о.е.).

² Минимальная массовая концентрация зearаленона, определяемая набором, которая рассчитана на основании удвоенного значения среднего квадратичного отклонения от среднего арифметического значения B_0 .

³ Массовая доля зearаленона при 50%-ном связывании от B_0 , полученная в результате измерения градуировочных растворов.

⁴ Для результатов определения массовой концентрации зearаленона в лунках, содержащих градуировочный раствор C_3 .

Установленные в результате испытаний технико-аналитические показатели набора ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН соответствуют ТУ ВУ 100185129.134-2015 и общим требованиям качества иммуноанализа, что обеспечивает количественное определение зearаленона в сельскохозяйственной продукции.

Определение метрологических характеристик методики выполнения измерений содержания зearаленона в образцах набором реагентов ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН проводили в соответствии с существующими требованиями и действующими правилами [7, 8]. В табл. 2 приведены полученные относительные значения показателя повторяемости σ_r , показателя промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}$ с изменяющимся фактором «время+оператор», предела повторяемости r , предела промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор» $r_{I(TO)}$ и относительной расширенной неопределенности U измерений массовой доли зearаленона при доверительной вероятности $P = 0,95$.

Т а б л и ц а 2. Метрологические характеристики набора реагентов ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН

Диапазон измерений, мкг/кг	σ_r , %	$\sigma_{r(то)}$, %	r , %	$r_{(то)}$, %	U , %
50–800	6	8	17	22	36

П р и м е ч а н и е. Предел измерений определяется значением величины нижней границы диапазона измерений.

Из данных табл. 2 следует, что разработанная методика обеспечивает получение результатов измерений массовой доли зеараленона с надлежащими параметрами точности.

Выводы Разработанный набор реагентов ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН имеет современную конструкцию, основан на принципе конкурентного связывания определяемого и меченного ферментом зеараленона с МАт, биооспецифически иммобилизованным в 96 лунках разборного микропланшета, содержит эффективные вспомогательные реагенты и дает возможность исследовать 43 образца на содержание зеараленона. Технично-аналитические параметры набора и метрологические характеристики методики выполнения измерений соответствуют современному уровню ИФА и требованиям контроля безопасности пищевых продуктов питания и кормов. Изделие устойчиво при хранении и применении в обычных лабораторных условиях.

Список использованных источников

1. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems // Task Force Report. No 139. 2003. Council for Agricultural Science and Technology. – Ames, Iowa, USA, 2003. – N 139. – P. 199.
2. Kuiper-Goodman, T. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone / T. Kuiper-Goodman, P. M. Scott, H. Watanabe // Regul. Toxicol. And Pharmacol. – 1987. – Vol. 7. – P. 253–306.
3. Новый набор реагентов для иммуноферментного определения афлатоксина В₁ в кормах и пищевых продуктах / И. И. Вашкевич [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2016. – № 2. – С. 69–75.
4. Гарбуз, О. С. Химическая модификация белков поликарбоксилатным комплексоном европия / О. С. Гарбуз, И. И. Вашкевич, О. В. Свиридов // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2014. – № 1. – С. 85–90.
5. Дубовская, Л. В. Биоспецифический метод детекции биотинилированных иммуноглобулинов / Л. В. Дубовская, И. И. Вашкевич, О. В. Свиридов // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2008. – № 1. – С. 84–88.
6. Ветеринарно-санитарные правила обеспечения безопасности кормов, кормовых добавок и сырья для производства комбикормов, утвержденные постановлением Мин-ва с/х и продовол. Респ. Беларусь 10.02.2011. – № 10.
7. Руководство ЕВРАХИМ / СИТАК. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях: пер. с англ.; ред. Л. А. Конопелько. – СПб: ВНИИМ им. Д. И. Менделеева, 2002. – 149 с.
8. Barwick, V. J. VAM Project 3.2.1. Development and Harmonisation of Measurement. Uncertainty Principles. Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data / V. J. Barwick, S. L. R. Ellison. – Teddington: LGC Ltd, 2000. – 87 p.
9. Получение конъюгированных антигенов на основе карбоксиметилоксида зеараленона и их применение в иммуноферментном анализе / А.А. Буркин [и др.] // Прикл. биохимия и микробиология. – 2000. – Т. 36. – С. 328–335.
10. Буркин, А. А. Получение и аналитические свойства антител с высокой специфичностью к зеараленону / А. А. Буркин, Г. П. Кононенко, Н. А. Соболева // Прикл. биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38. – С. 305–311.
11. Production and characterization of a specific monoclonal antibody against mycotoxin zearalenone / R. Teshima [et al.] // J. Agr. Food Chem. – 1990. – Vol. 38. – P. 1618–1622.
12. Application of a new anti-zearalenone monoclonal antibody in different immunoassay formats / N. A. Burmistrova [et al.] // Anal. Bioanal. Chem. – 2009. – Vol. 395. – P. 1301–1307.
13. Production of a highly group-specific monoclonal antibody against zearalenone and its application in an enzyme-linked immunosorbent assay / S.-H. Cha [et al.] // J. Vet. Sci. – 2012. – Vol. 13. – P. 119–125.

References

1. Niyo, K. (ed.) (2003) Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems, Council for Agricultural Science and Technology, Task Force Report, no. 139, Ames, Iowa, USA, 2003. – N 139. – P. 199.
2. Kuiper-Goodman, T., Scott, P. M. and Watanabe, H. (1987) «Risk assessment of the mycotoxin zearalenone», Regulatory Toxicology and Pharmacology, vol. 7, no. 3, pp. 253–306.
3. Vashkevich, I. I., Kornilovich, G. S., Sviridov, O. V., Sukhenko, L. N., Terent'eva, T. V. and Shibeko, A. I. (2016) «New reagent kit for enzyme immunoassay of aflatoxin B₁ in feeds and foods», Vestsi NAN Belarusi. Seryya khimichnykh navuk [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], no. 2, pp. 69–75.
4. Garbuz, O. S., Vashkevich, I. I. and Sviridov, O. V. (2014) «Chemical modification of proteins with polycarboxylate europium complexonate», Vestsi NAN Belarusi. Seryya khimichnykh navuk [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], no. 1, pp. 85–90.
5. Dubovskaya, L. V., Vashkevich, I. I. and Sviridov, O. V. (2008) «Biospecific method of detection of the biotinylated antibodies», Vestsi NAN Belarusi. Seryya khimichnykh navuk [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], no. 1, pp. 84–88.

6. (2011) Veterinarno-sanitarnye pravila obespecheniya bezopasnosti kormov, kormovyykh dobavok i syr'ya dlya proizvodstva kombikormov, utverzhdennye postanovleniem Ministerstva sel'skogo khozyaistva i prodovol'stviya Respubliki Belarus' ot 10.02.2011, №10 [Veterinary and sanitary rules to ensure safety of feed, feed additives and raw materials for feed production, approved by the Decree of the Ministry of Agriculture and Food of the Republic of Belarus from 10.02.2011, no. 10.]
7. (2002) Rukovodstvo EVRAKhIM / SITAK. Kolichestvennoe opisanie neopredelennosti v analiticheskikh izmereniyakh [Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement], Translated by Konopel'ko, L. A., VNIIM im. D. I. Mendeleeva, St. Petersburg, RU
8. Barwick, V. J. and Ellison, S. L.R. (2000) VAM Project 3.2.1. Development and Harmonisation of Measurement Uncertainty Principles. Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data, LGC Ltd, Teddington, UK
9. Burkin A. A., Kononenko G. P., Soboleva N. A., Zotova E. V. (2000) «Preparation of conjugated antigens from zearalenone carboxymethyl oxime and their use in ELISA», Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya [Applied Biochemistry and Microbiology], vol. 36, no. 3, pp. 328–335.
10. Burkin, A. A., Kononenko, G. P. Soboleva, N. A. (2002) «Preparation and analytical properties of antibodies highly specific to zearalenone», Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya [Applied Biochemistry and Microbiology], vol. 38, no. 3, pp. 305–311.
11. Teshima, R., Kawase, M., Tanaka, T., Hirai, K., Sato, M., Sawada, J.-i., Ikebuchi, H., Ichinoe, M. and Terao, T. (1990) «Production and characterization of a specific monoclonal antibody against mycotoxin zearalenone», Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 38, no. 7, pp. 1618–1622.
12. Burmistrova, N. A., Goryacheva, I. Yu., Basova, E. Yu., Franki, A.-S., Elewaut, D., Van Beneden, K., Deforce, D., Van Peteghem C. and De Saeger, S. (2009) «Application of a new anti-zearalenone monoclonal antibody in different immunoassay formats», Analytical and Bioanalytical Chemistry, vol. 395, no. 5, pp. 1301–1307.
13. Cha, S. H., Kim, S. H., Bischoff, K., Kim, H. J., Son, S. W. and Kang, H. G. (2012) «Production of a highly group-specific monoclonal antibody against zearalenone and its application in an enzyme-linked immunosorbent assay», Journal of veterinary science, vol. 13, no. 2, pp. 119–125.

Информация об авторах

Вашкевич Ирина Игнатьевна – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vashkevich@iboch.bas-net.by.

Терентьева Татьяна Викторовна – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. акад. В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: info@iboch.bas-net.by.

Корнилович Галина Сергеевна – зам. директора по науке. Центральная научно-исследовательская лаборатория хлебопродуктов (222220, Минская обл., Смолевичский р-н, пос. Октябрьский). E-mail: cnilhp@ya.ru.

Сухенко Лилия Николаевна – нач. отдела. Центральная научно-исследовательская лаборатория хлебопродуктов (222220, Минская обл., Смолевичский р-н, пос. Октябрьский). E-mail: cnilhp@ya.ru.

Шибeko Анна Ивановна – вед. инж.-химик. Центральная научно-исследовательская лаборатория хлебопродуктов (222220, Минская обл., Смолевичский р-н, пос. Октябрьский). E-mail: cnilhp@ya.ru.

Свиридов Олег Васильевич – д-р хим. наук, ст. науч. сотрудник, зав. лаб. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sviridov@iboch.bas-net.by.

Для цитирования

Новый набор реагентов для иммуноферментного определения зearаленона в кормах и пищевых продуктах / И. И. Вашкевич [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2016. – № 4. – С. 72–79.

Information about the authors

Vashkevich Irina Ignatievna – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (Academician V. F. Kuprevich str., 5/2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vashkevich@iboch.bas-net.by.

Terentieva Tatiana Viktorovna – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (Academician V. F. Kuprevich str., 5/2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: info@iboch.bas-net.by.

Kornilovich Galina Sergeevna – Deputy Director for Science. Central Research Laboratory of Grain Products (222220, Minsk reg., Smolevichi distr., Oktyabrsky vil.). E-mail: cnilhp@ya.ru.

Sukhenko Liliya Nikolaevna – Head of Department. Central Research Laboratory of Grain Products (222220, Minsk reg., Smolevichi distr., Oktyabrsky vil.). E-mail: cnilhp@ya.ru.

Shibeko Anna Ivanovna – Leading Engineer-Chemist. Central Research Laboratory of Grain Products (222220, Minsk reg., Smolevichi distr., Oktyabrsky vil.). E-mail: cnilhp@ya.ru.

Sviridov Oleg Vasilievich – D. Sc. (Chemistry), Senior Researcher, Head of Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (Academician V. F. Kuprevich str., 5/2, Minsk, 220141, Republic of Belarus). E-mail: sviridov@iboch.bas-net.by.

For citation

Vashkevich I. I., Terentieva T. V., Kornilovich G. S., Sukhenko L. N., Shibeko A. I., Sviridov O. V. A new kit of reagents for the ELISA determination of zearalenone in feeds and foods. Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series, 2016, no. 4, pp. 72–79.