جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۰ ، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۴
صفحات: ۲۳۵ - ۲۴۰

تهیه کنژوگه‌های مختلف از سم T-2 و تولید آنتی‌بادی علیه T-2

محمدعلی عارف پور* M.Sc. ، محمد باقر صالحی* M.Sc. ، مهناز سجادی* M.Sc. ،
جعفر سلیمیان*✍ M.Sc.

چکیـده

هدف: بررسی اثر کاریرهای مختلف بر تولید آنتی بادی علیه سم T-2 .

روش بررسـی: ایـن ترکیـب بـا وزن مولکولـی پاییـن یـک هاپتـن(Haptan) محسـوب مـی‌گـردد، لذا لازم است به یک کاریر (Carrier) مناسب اتصال یابد. بدین منظور این مولکول به سه کاریر BSA, KLH و Poly Lysine متصـل گـردید. در ایـن روش ابـتدا BSA ، Poly Lysine و KLH سوکسـینه بـه گروه هیدروکسـیل سـم T-2 وصل شد. سپس برای تهیه آنتی‌بادی علیه T-2 ، کنژوگه‌های BSA-T-2 و KLH-T-2 بـه‌طـور جداگانه به ده سر موش Balb/c تزریق گردید. در مرحله اول یک دوز ۲۰ میکروگرم از کنژوگه همـراه CFA (ادجـوان کامل فروند) به صفاق موشها تزریق گردید و بوسترها با فاصله سه هفته‌ای با IFA (ادجـوان نـاقص فـروند) صـورت گرفـت. در فواصـل بیـن بوسـترها و پس از تزریق بوستر چهارم از موشها خونگیری به عمل آمد. سرم آنها جدا و الیزای غیر مستقیم انجام شد.

یافته‌ها: هر چند موشها در برابر کنژوگه BSA-T-2 ایمن شده بودند اما در نهایت سرم آنها BSA (کاریر) را بـه مراتـب بهـتر از T-2 (هاپتـن) شناسـایی مـی‌کردند. اما در مورد کانژوگه KLH-T-2 ، سرم موشها T-2 (هاپتـن) را بهـتر از KLH (کاریـر) مـورد شناسـایی قـرار مـی‌داد. همچنیـن سرم این موشها هنگامی که با کـنژوگه‌هـای BSA-T-2 و Poly Lysine-T-2 مجـاور می‌شدند به خوبی سم T-2 را مورد شناسایی قرار می‌دادند.

نتـیجه‌گـیری: نتیجه حاصل از این تحقیق نشان دهنده این بود که کاریر KLH از آنجایی که یک ادجوان قوی بوده و دارای جایگاههای اتصال بیشتری برای سم T-2 نسبت به کاریر BSA می‌باشد، لذا ایمنی زایی و تیتر آنتی بادی آن خیلی بیشتر است.

واژه‌های کلیدی: سم T-2 ، کنژوگه، KLH, BSA ، آنتی بادی، الایزا

مقـدمـه

در مـیان سـموم قارچـی تریکوتسـنی که توسط گونه‌های مختلف فوزاریـوم، تـریکودرما، آکرومونیوم، تریکوتستیوم، استاکی بوتریس، دندرودوکـیوم تولـید مـی‌شـود، سم T-2 و مشتقات آن به خاطر سـمیت بـالا بـرای انسـان ودام مـورد توجه بیشتری قرار دارند. از آنجایی که زیستگاه قارچها وکپک‌های تولید کننده این سم غلات

دریافت مقاله: ۱۳۸۳/۹/۱۵ ، پذیرش مقاله: ۱۳۸۴/۹/۲۳

✍ نویسنده مسئول: کارشناس ارشد گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین «ع»، تهران ـایران
* آدرس: گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین «ع»
آدرس پست الکترونیکی: Jsoleman@ihu.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

و غـذای انسان و دام می‌باشد امکان مسمومیت انسان و دام با این سـم زیـاد می‌باشد. (۱،۲) این سم یک ترکیب شیمیایی از خانواده ترپـن‌هـا (سـزکوئی ترپنوئید) بوده و وزن ملکولی آن ۴۶۶ دالتون مـی‌باشـد. سـم T-2 عـلاوه بـر مهار سنتز پروتئین، بر روی غشاء سـلولی و اسـیدهای نوکلئـیک نـیز تاثـیر دارد و دارای اثـرات کارسـینوژنیک، تراتوژنیک و موتاژنیک است. مسمومیت با این سم عـوارض خطرناکـی برای انسان دارد که از علایم مسمومیت با آن می‌توان به اختلال در سیستم اعصاب مرکزی، شروع سریع تهوع و اسـتفراغ، تـب و لرز، نکروز اپیتلیومها، تضعیف مغز استخوان اشاره کرد که در نهایت به مرگ مسموم منتهی می‌شود. (۲،۳)

بـرای شناسـایی این سم روشهای گوناگونی وجود دارد که می‌توان بـه روش کروماتوگرافـی با لایه نازک (TLC)، گاز کروماتوگرافی (GC) و روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی (HPLC) اشاره کـرد. محـدوده تشخیص سم با روش TLC در حدود ۵۰ نانوگرم و بـا روش GC در حـدود ۱۰ نانوگـرم است و با روشHPLC تا مـیزان ۲۵ نانوگـرم را مـی‌تـوان تشـخیص داد. روش سـنجش بـیولوژیک در حـیوانات نیز وجود داردکه بسته به نوع حیوان و نوع تـزریق بیـن ۵۰۰-۱۰ نانوگـرم از سم را می‌توان تشخیص داد. اما تمامـی ایـن روشـها بـه نوعی به دستگاه و تجهیزات آزمایشگاهی وابسـته و هزیـنه‌بـر هسـتند و نـیاز به پرسنل مجرب دارد. (۶-۹) امـروزه روشـهای جدیـد تشـخیص بـر مبـنای واکـنش آنتـی‌ژن و آنتـی‌بادی بنا نهـاده شـده است که از آن در تشخیص سم T-2 استفاده می‌شود. از این روشها می‌توان به روش رادیوایمونواسـی، الایـزای رقابتی و غیر مستقیم و نوارهای تشخیصی یک مرحله‌ای اشـاره کـرد. حساسـیت ایـن روشـها عمومـاً در حـد ۵-۱ نانوگرم مـی‌باشـد و از مـزایای ایـن روشـها سریع و ارزان بودن، سادگی و حساسیت آنهاست. (۱۰-۱۶)

در ایـن تحقـیق سـعی برایـن شـده که ملکول هاپتن سم T-2 به حـامل (Carrier) مناسب متصل شود و سپس علیه آن آنتی‌بادی پلـی‌کلونـال تهـیه شـود. در گامهـای بعدی طراحی کیت الایزای پلـی‌کلونال غیر مستقیم و رقابتی مدنظر بوده همچنین این تحقیق مبنایـی بـرای تولید آنتی‌بادی منوکلونال و تهیه نوارهای تشخیص یک مرحله‌ای خواهد بود.

روش بررسی

کلیه مواد از شرکت سیگما خریداری گردید.

T-2 Toxin (T4887), Succinylated KLH (H5654), KLH (H7017), IFA (F5506), CFA (F5881), Poly lysine (P 7890) , Anti mouse Ig G-HRP (A0168), EDAC (E 1769), BSA (A 2058)

تهـیه کنژوگه KLH-T-2 . برای تهیه کانژوگه KLH-T-2 از روش Chu F.S (1979) و همکـاران بـا اعمال تغییرات خاصی استفاده شد. KLH سوکسینه حاوی تعداد زیادی اسید آمینه لیزین مـی‌باشـد کـه شـاخه‌هـای جانبی آنها می‌توانند در واکنش اتصال شـرکت کـنند و بـرای ایجـاد اتصـال مناسـب‌تـر یـک Linker سوکسـینیل بـه KLH وصـل شده است. در ساختمان T-2 یک عـامل هیدروکسـیل در جایگـاه کربـن شـماره سه حضور دارد که قابلیـت پـیوند اسـتری با عامل سوکسینیل دارد و در حضور عوامل فعال کننده مانند کاربودی ایمیدها می‌توان این پیوند را برقرار کرد. بـه‌طـور خلاصـه ایـن کـار بـه شـکل زیـر صـورت گرفت: مقدار ۵ میلـی‌گـرم از سـم T-2 در آب و کلروفـرم (۲۰٪) حل گردید و بـتدریج و در حـال هـم زدن، بـه محلول ۵ میلی‌گرم Succinyl KLH افـزوده شد و در نهایت به این محلول ۵ میلی‌گرم EDAC اضـافه شد و سه ساعت مهلت داده شد تا واکنش پیشرفت کند. در پایان واکنش در حال هم زدن از سوسپانسیون، نیم میلی‌لیتر از آن بـرای مطالعـات HPLC برداشته شد و باقیمانده سوسپانسیون در مقابل آب مقطر دیالیز و سپس لیوفیلیز گردید. (۳)

HPLC . بـرای سـنجش مـیزان T-2 آزاد در سوسپانسـیون در پایـان واکـنش (T-2 اتصـال نیافـته) ، از روش Omurtag GZ (2000) استفاده شد. (۵،۶) شرایط HPLC بدین شرح است:

a) Mobile phase: Acetonitrile- H_2O 1:1, TFA 0.1%

b) Colum:Nueleosil, 10mm, C18, I.D=4.6 mm, L=250mm , c) Wave length: 200nm , S=0.02

d) flow rate: 1ml/min

تهـیه کـنژوگه BSA-T-2 **و** Poly Lysine-T-2. از روش Fan T.S.L (1988) و روش Chu F.S 1979) بـا اندکـی تغییرات استفاده شد. (۳-۵)

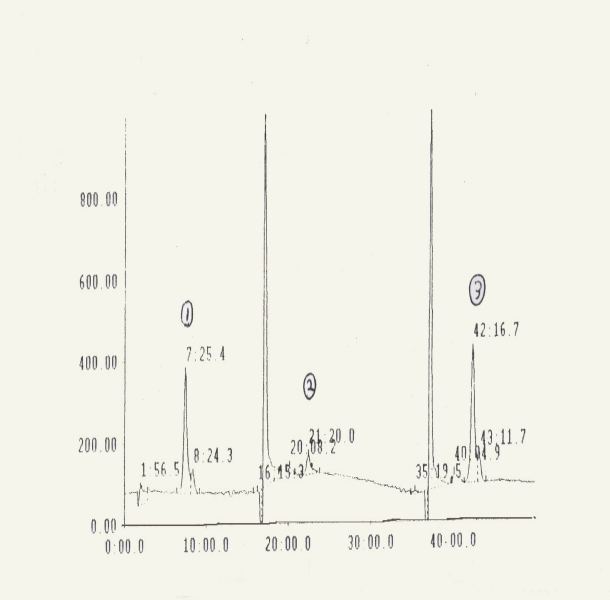
جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تـزریقات . بـه دو گروه ده‌تایی از موشهای ۲۰ گرمی Balb\c بـه طـور جداگانـه مقـدار ۲۰ میکروگرم از کنژوگه KLH-T-2 و BSA-T-2 همراه با ادجوان کامل فروند (CFA) در صفاق تزریق گـردید و بوسـترها بـا فاصـله سه هفته‌ای با ادجوان ناقص فروند (IFA) صـورت گرفـت. خونگـیری در فواصل بوسترها و در پایان بوستر چهارم انجام شد. (۳، ۱۷-۲۱)

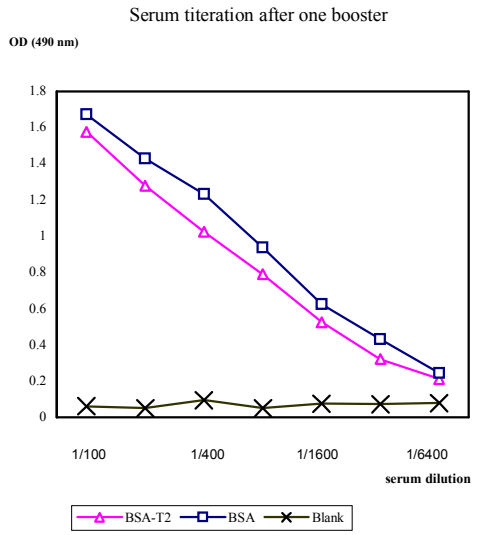
الایـــزای غیرمســـتقیم . چـاهک‌هـای میکروپلیـت الایـزا بـا کـنژوگه‌هـای مخـتلف شـامل KLH-T-2 ، BSA-T-2 و Poly Lysine-T-2 پوشـانده شـد. (بافرکربنات- بی‌کربنات سدیم pH 9.6 ، بـه مـیزان 5µg/100µl) . چـاهک‌هـای دیگـری از میکروپلیـت بـا KLH, BSA, Poly lysine تحت همان شرایط پوشـانده شـد. میکروپلیـت به مدت یک شب در ۴ درجه سانتیگراد قـرار گرفـت. در مرحله بعدی چاهک‌ها با بافرPBST (بافر PBS حـاوی ۰/۰۵ ٪ توئیـن ۲۰) شستشـو داده شـد و خشک گردید و چـاهک‌هـا بـا PBST حـاوی ۳٪ ژلاتیـن بـلاک گردیدند. (۱۰۰ میکرولیتر از بافر بلاکینگ به هر چاهک اضافه گردید و نیم ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت). پس از شستشو و خشک کردن پلیـت، سرم موش را در چاهکها از بالا به پایین و از رقت ۱/۱۰۰ الی ۱/۶۴۰۰ در PBST رقیق شدند و میکروپلیت به مدت نیم ساعت در ۳۷ درجـه سانتیگراد قرار گرفت. در مرحله بعدی پس از شستشو و خشـک کردن پلیت، رقت مناسب (۱/۱۲۰۰۰) از آنتی‌بادی کونژوگه (Anti mouse Ig G HRP Conjugated) در PBST تهیه کرده درون هـر چـاهک۱۰۰ مـیکرو لیـتر از آن ریخـته شـد. پـس از انکوباسـیون در ۳۷ درجـه سـانتیگراد بـه مـدت نـیم ساعت، پلیت شستشـو و خشـک شـد. در نهایـت سوبسترا ریخته شد. سوبسترا حاوی ۲ میلی‌گرم از OPD در ۵ میلی‌لیتر از بافر سیترات فسفات (pH 5) اسـت کـه بـه آن ۲/۵ میکرو لیتر آب اکسیژنه ۳۰٪ افزوده شـده اسـت. از سوبسـترا، ۱۰۰ میکرولیـتر بـه هر چاهک اضافه و میکروپلیـت بـه محـل تاریک منتقل شد تا واکنش انجام گیرد. در پایان رنگ سوبسترا از بی‌رنگ به زرد تبدیل می‌شود و این رنگ از بـالا بـه پایـین سـتون کـاهش می‌یابد. چاهکهای کنترل واکنش بـی‌رنـگ باقی خواهند ماند که نشانه صحت کار است. پس از آن واکـنش بـا اسـید سـولفوریک یک مولار متوقف و جذب در ۴۹۰ نانومـترخوانده شـد. در تمامی آزمایشات الایزا از سرم موش نرمال به عنوان شاهد استفاده شد. (۱۷)

یافته ها

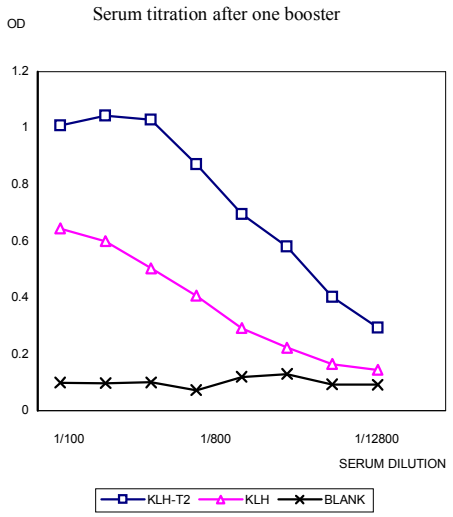
تهـــیه کـــنژوگه . پـــس از کانـژوگاســـیون، دیـالـــیـز و لیـوفیلیزاسیون ، وزن نمونه به میزان ۰/۶ میلی‌گرم افزایش یافته بـود. ایـن افـزایش وزن مـی‌توانـد مـربوط بـه رطوبـت نمونه و یا ملکـول‌هـای T_2 باشـد که بر روی پروتئین وصل شده‌اند. اما چون اولاً محصـول تـا حـد امکان لیوفیلیز و خشک گردیده است و ثانیاً طـبق محاسـبه، امکـان اتصـال بیش از ۵۰۰ عدد مولکول T-2 بر روی هر مولکول KLH وجود دارد احتمال اینکه این افزایش وزن مربوط به رطوبت باشد رد می‌شود. همچنین آزمایشHPLC برای انـدازه‌گـیری مـیزان T-2 آزاد پس از پایان واکنش، نشان می‌دهد کـه مقـدارT-2 آزاد در مقایسـه بـا پـیک اسـتاندارد افـت قـابل



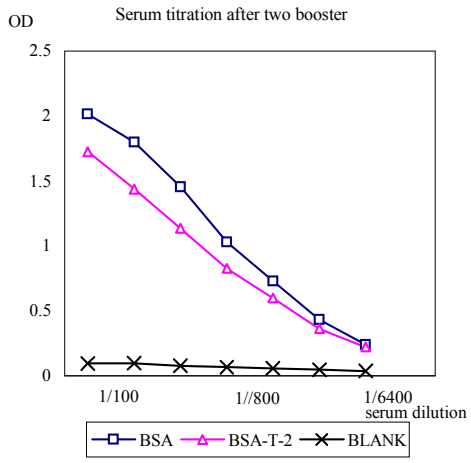
نمودار یک : نتایج کروماتوگرامHPLC : پیک شماره ۱: مربوط به T-2 استاندارد (سیگما) است. پیک شماره ۲:مربوط به نمونه ای است که پس از پایان اتصال برداشت شده است. پیک شماره ۳: مربوط به نمونه ای است که در ابتدای واکنش ,پیش از افزودن EDAC برداشت شده است.



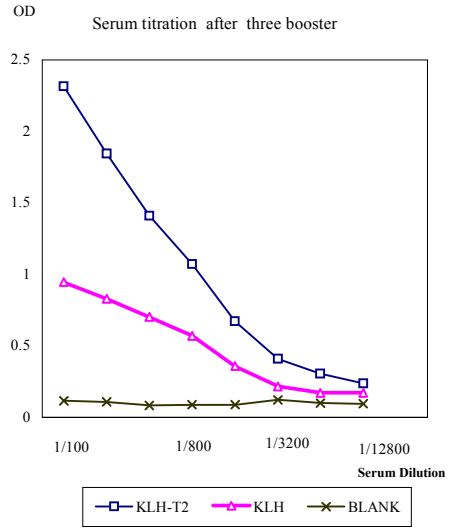
نمودار ۲. نتیجه الایزای سرم موش ایمن شده با کنژوگه BSA-T-2 پس از بوستر اول



نمودار ۴. نتیجه الایزای سرم موش ایمن شده با کنژوگه KLH-T-2 پس از بوستر اول



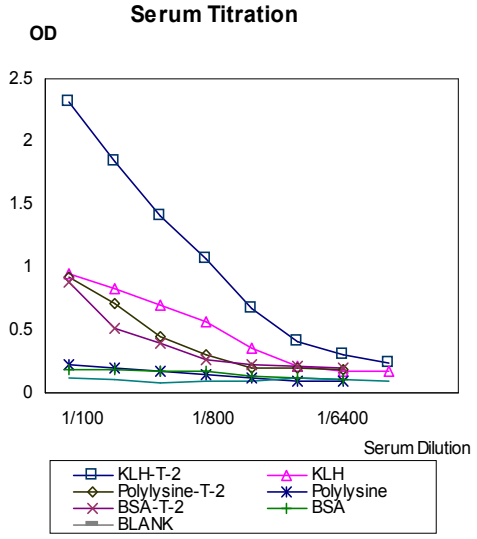
نمودار ۳. نتیجه الایزای سرم موش ایمن شده با کنژوگه BSA-T-2 پس از بوستردوم



نمودار ۵. نتیجه الایزای سرم موش ایمن شده با کنژوگه KLH-T-2 از بوستر سوم

ملاحظه‌ای را (درحدود ۸۰٪) نشان می‌دهد پس می‌توان گفت که در اثر اتصال T-2 به ملکولهای پروتئین از میزان ملکولهای آزاد کاسته شده است (نمودار ۱).

نتایج الایزای غیر مستقیم . موشهای ایمن شده با کنژوگه BSA-T-2: پس از خونگیری از موشهای ایمن شده با کانژوگه T-2 - BSA الایزای غیر مستقیم انجام شد. نتایج الایزا نشان می‌دهد که پس از بوستر اول آنتی‌بادی قادر به شناسایی BSA و BSA-T-2 است اما میزان اختلاف OD در



نمودار ۶. نتیجه الایزای سرم موش ایمن شده با کنژوگه KLH-T-2 در مقابل BSA-T-2 و Poly Lysine-T-2

چاهکهای حاوی BSA و چاهکهای BSA-T-2 بسیار ناچیز است و حتی میزان OD در ستون BSA بیشتر از ستون BSA- T-2 می‌باشد (نمودار ۲). پس از تزریق بوستر دوم هر چند تیترآنتی‌بادی نسبت به قبل بسیار افزایش داشته است اما نتایج این الایزا، همانند می‌دهد که پس از بوستر اول آنتی‌بادی قادر به شناسایی KLH وKLH - T-2 است اما این آنتی‌بادی کانژوگه KLH-T-2 را به مراتب بهتر از KLH (درحدود نیم OD بیشتر) مورد شناسایی قرار می‌دهد (نمودار۴). پس از تزریق بوستر سوم و چهارم تیتر و آنتی‌بادی نسبت به قبل افزایش بیشتری نشان می‌دهد و آنتی‌بادی کانژوگه KLH-T-2 را با اختلاف بیش از یک OD مورد شناسایی قرار می‌دهد (نمودار۵).

در دیگر آزمایشات الایزای انجام شده، سرم موشهای ایمن شده باکانژوگه KLH-T-2 با آنتی‌ژنهای BSA-T-2 و BSA و با آنتی‌ژنهای Poly Lysine-T-2 و Poly Lysine مجاور گردید. این آنتی‌بادی توانست با اختلاف نزدیک به یک OD کانژوگه‌های BSA-T-2 و Poly Lysine-T-2 را نسبت به BSA وPoly Lysine مورد شناسایی قرار دهد (نمودار ۶).

بحث

مایکو توکسین‌ها تریکوتسنی متابولیت‌های قارچی هستند که از نظر کشاورزی و پزشکی حائز اهمیت‌اند. زیرا قارچهای تولید کننده این توکسینها می‌توانند بر روی علوفه و غلات رشد کنند و این سموم را در آنها رها سازند و در صورت استفاده دام و انسان از علوفه وغلات موجب مسمومیت شدید و در نهایت موجب مرگ آنها شود. لذا داشتن سیستم سنجش و ردیابی برای این سموم می‌تواند از مسمومیتها جلوگیری نماید و یا در هنگام مسمومیت بتوان آنها را در مایعات بیولوژیک بدن شناسایی کرد. (۱-۳) به منظور ردیابی و سنجش این سموم و علی الخصوص سم T-2 در غلات، علوفه، مایعات بیولوژیک بدن تا کنون روشهای گوناگونی ابداع شده است که می‌توان به روشهای کروماتوگرافی با لایه نازک (TLC) ، گاز کروماتوگرافی (GC) و روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی (HPLC) اشاره کرد. این روشها اگر چه روشهای دقیق وحساسی هستند اما دارای معایبی نیز هستند از جمله وقت‌گیر و نسبتاً گران هستند و نیاز به دستگاه و پرسنل مجرب دارد. (۴-۷) در دهه‌های گذشته روشهای رادیو ایمونواسی، الایزای رقابتی و غیرمستقیم بر پایه آنتی‌بادی پلی‌کلونال و یا آنتی‌بادی منوکلونال برای تشخیص سم T-2 بنا گذاشته شده است و امروزه نیز با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال روش تشخیص به کمک نوارهای یک مرحله‌ای ابداع شده است. (۹-۱۶) برای رسیدن به یک روش ایمونواسی داشتن آنتی‌بادی ضروری است. در این تحقیق ابتدا سعی شد که ملکول هاپتنیک سمT-2 به کاریرهای BSA, KLH و Poly Lysine متصل شود و سپس با تزریق آنتی‌ژنها به موشهای Balb/c علیه آن آنتی‌بادی به دست آید. همان طور که در نمودار ۱ آورده شده است بیش از ۸۰٪ از سمT-2 به ملکول KLH متصل شده است که با انجام محاسبات مشخص شد که به یک ملکول KLH در حدود ۴۳۷ ملکول سم T-2 اتصال یافته است که به نظر برای تولید آنتی بادی مناسب باشد. در مقابل برای ملکول BSA در حدود ۵۰ جایگاه اتصال در نظر می‌گیرند که در بهترین شرایط بین ۳۰-۲۰ ملکول به آن پیوند می‌یابد. از مزایای دیگر KLH این است که دارای وزن ملکولی بسیار بالا (۴۰۰Kd) است و از یک خرچنگ که قرابت

کمتری با پستانداران دارد به دست می‌آید و اضافه بر آن دارای خاصیت ادجوانی است و می‌تواند سیستم ایمنی را تحریک نماید . اما در مقایسه، وزن ملکولی BSA کم (۶۷ Kd) و از پستاندار به دست می‌آید و دارای خاصیت ادجوانی نیست. (۱۷) بنا به دلایل گفته شده، همان‌گونه که از نتایج الایزا مشخص است کانژوگهKLH-T-2 توانسته است در مقایسه با کنژوگه BSA-T-2 ، سیستم ایمنی موش را به خوبی علیه سم T-2 تحریک و علیه آن آنتی‌بادی تولید کند. علاوه‌بر آن آنتی بادی به دست آمده علیه KLH-T-2 هنگامی که با کنژوگه‌های BSA-T-2 و Poly Lysine-T-2 مجاور می‌شود با حدود یک OD اختلاف و به خوبی سم T-2 را شناسایی می‌کند.

نتیجه‌گیری: بنابراین می‌توان امیدوار بود که بتوان از این آنتی‌بادی در طراحی کیت الایزای پلی کلونال استفاده نمود و با به دست آوردن آنتی بادی منوکلونال نسبت به تهیه نوارهای تشخیص یک مرحلهٔ ی اقدام کرد.

References

۱. علامه ع ،رزاقی ابیانه م. تریکوتسن‌ها در : مایکوتوکسینها،چاپ اول، انتشارات دانشگاه امام حسین«ع»، ۱۳۸۰، صفحات ۹۷- ۱۴۰.

2. Wannemacher R, Wiener S. Trichothecene ycotoxins IN: textbook of military Medicine. New York press; 2000. P. 5-32 .

3. Chu FS, Gyossman S. Production of Antibody Against T-2 Toxin. Appl Envionr Microb 1979; 37(1): 104-8 .

4. Guo Y, Liu X, Liu J. Perparation and identification of anti–fumonisin B1 monoclonal antibody. Wei Sheng Yan Jiu 1999; 28(5): 297-9.

5. Christensen HR, Yu FY, Chu FS. Development of a poly clonal antibody–based sensitive enzyme–linked immunosorbent assay for fumonisin B(4). J Agric Food Chem 2000; 48(5): 1977-84.

6. Cock RM, Vtley D. Analysis of some Trichothecene mycotoxins by liquid chromatography. J Chromatog. 1985; 347: 429-33 .

7. Omurtag GZ, Yazicioglu D. Determination of T-2 toxin in grain and grain products by HPLC and TLC. J Inviron Sci Health B 2000; 35(6): 797-807.

8. Omurtag GZ, Yazicioglu D. Occurance of T-2 inprocessed cereals and pulses in turkey determine by HPLC and TLC. Food additives and contaminants 2001; 18(9): 844-9.

9. Smoragiewicz W, Cossete B. Trichotecenemycotoxins in the dust of ventilation systems in office buildings.Int Arch Occup Environ Health . 1993; 65: 113-117.

10. Fontelo PA, Beheler J. Detection of T-2 toxin by an improved radioimmuno assay. Appl Environ Microb 1983; 45(2): 640–3.

11. Gendloff EH, pestka jj. Detection of T–2 Toxin in Fusarium sporotrichioides Infected Corn by Enzyme linked Immunosorbent Assay. Appl Environ Microb1984; 47(5): 1161–3.

12. Verto IB, Gyongyosl A. Monoclonal antibody–based enzyme–linked immunosorbent assay of fusarium T- 2 and zearalenone toxins in cereals. Appl Environ Microb 1994; 60(2): 729–31.

13. Fan TSL. Simultaneous analysis of T-2 toxin and HT –2 toxin by an indirect enzyme– linked immunosobebent assay. J Assoe off ANAL CHEM 1987; 70 (4): 657–61.

14. Nagayama S, Kawamura O. Application ofan enzyme linked immunosorbant assay for sdcreening of T-2 toxin-producing Fussarium spp. Appl Envionr Microb 1988; 54(5): 1302-3.

15. Kononenko GP, Burkin AA. Immunoenzyme assay for detection of T-2 toxin incontaminated graine. Prikl Biokhim MiKrobiol 1999; 35(4): 457-62.

16. De saeger S. Peteghem V. Dipstick enzyme immunoassay to detect fusarium T-2 toxin in wheat. Appl Environ Microb 1996; 62(6): 1880-4.

17. Harlow E, Lane D. Antibodies a laboratory manual. Cold spring harbor aboratory 1988. P. 53-113.

18. Fan TSL, Schubring R. Production and characterization of a Monoclonal Antibody Cross Reactive with Most Grop A Trichothecenes. Appl Environ Microb 1988; 54(123): 2959–63.

19. Guang S, schubring S. Improved method for production of antibodies against T-2 toxin and diacetoxyscirpenol in rabbits. Appl Environ Microb. 1986; 51(1): 132–7.

20. Juan I, Azcona Oliver A. Generation of antibodies reactive with Fumonisins B1, B2, and B3 by using Cholera toxin as the carrier–Adjuvant. Appl Environ Microb 1992. P. 169-73.

21. Chu FS, Zhang GS. Production and Characterization of antibody against diacetoxyscirpenol. Appl Environ Microb 1984; 48(4): 777–80.