

## Využití metody imunoafinitní chromatografie pro stanovení obsahu deoxynivalenolu v zrně obilovin

### METODIKA PRO PRAXI

J. Chrpová a kol.



## **Dedikace**

Metodika vznikla za finanční podpory MZe ČR a je výstupem řešení projektu NAZV QH81293 Zvýšení úrovně rezistence k fuzarióze klasu u pšenice s využitím nově detekovaných zdrojů rezistence a efektivních metod hodnocení a výběru šlechtitelského materiálu.

Metodika je určena pro zemědělskou praxi. O uplatnění metodiky byla uzavřena smlouva s firmou SELGEN a.s.

Oponenti:

RNDr. Ivana Polišenská, Ph.D., Agrotest fyto, s.r.o.  
Ing. Marie Mrkvicová, ÚKZÚZ

© **Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2011**

© **Výzkumné centrum SELTON, s.r.o., Stupice, 2011**

**ISBN: 978-80-7427-067-3**

**Ing. Jana Chrpová, CSc.  
Ing. Lenka Štočková  
Ing. Taťána Sumíková**

**Ing. Ondřej Veškrna, Ph.D.  
Ing. Tibor Sedláček  
Ing. Karla Řehořová  
Dr. Ing. Pavel Horčíčka**

# **Využití metody imunoafinitní chromatografie pro stanovení obsahu deoxynivalenolu v zrně obilovin**

## **METODIKA PRO PRAXI**

**Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.**

**2011**

## **Využití metody imunoafinitní chromatografie pro stanovení obsahu deoxynivalenolu v zrně obilovin**

Cílem metodiky je poskytnout ucelené informace o možnosti využití nové metody imunoafinitní chromatografie pro stanovení obsahu deoxynivalenolu (DON). Stanovení obsahu DON pomocí imunoafinitní chromatografie je alternativou k imunochemickému. Tato nová metoda má díky své jednoduchosti a rychlosti (výsledek ze vzorku zrna je k dispozici během 15 min.) velký potenciál využití zejména ve výkupních organizacích. Ve šlechtění umožňuje analyzovat větší objemy šlechtitelského materiálu.

### **The use of newly developed method of DON content determination**

Newly developed ROSA DON quantitative test (a lateral-flow technique using colloidal gold-labelled monoclonal antibodies) can be effectively used for genotype screening and rapid evaluation of grain contamination with mycotoxin DON. In comparison with standard methods (HPLC/UV and ELISA) the "ROSA" method is evidently much cheaper and quicker, which are the most important prerequisites for a broader utilization of this method.

#### **Obsah:**

I)	Cíl metodiky.....	3
II)	Vlastní popis metodiky .....	3
	1. Úvod .....	3
	2. Princip stanovení .....	4
	3. Popis stanovení metodou ROSA .....	4
	4. Standardizace metody imunoafinitní chromatografie stanovení obsahu DON a porovnání se stanovením obsahu DON kitem ELISA a metodou HPLC/UV .....	6
	5. Dosažené výsledky.....	7
III)	Srovnání novosti přístupů .....	9
IV)	Popis uplatnění certifikované metodiky .....	9
V)	Ekonomické aspekty .....	9
VI)	Seznam použité literatury .....	10
VII)	Seznam publikací, které předcházely metodice .....	10

## I) Cíl metodiky

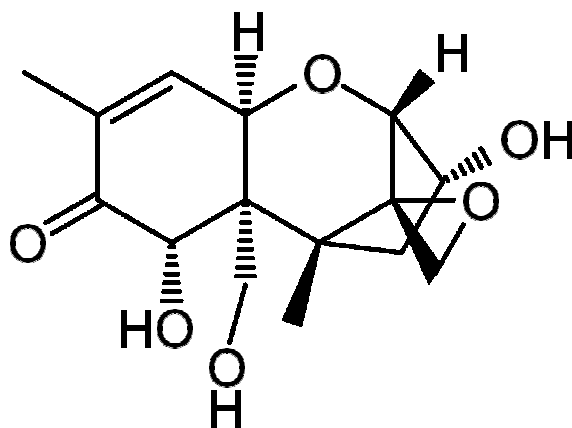
Cílem metodiky je podat ucelené informace o možnosti využití nové metody imunoafinitní chromatografie pro stanovení obsahu deoxynivalenolu (DON). Nižší pracovní náročnost, nižší cena a vyšší rychlost stanovení favorizují metodu pro využití ve šlechtění obilnin nebo v zemědělských výkupech, popřípadě ve sladovnách.

## II) Vlastní popis metodiky

### 1. ÚVOD

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity toxinogenních kmenů hub a mají toxické účinky pro člověka. Nejzávažnějším houbovým onemocněním obilovin z hlediska tvorby mykotoxinů jsou klasové fuzariózy (FHB – *Fusarium head blight*). Deoxynivalenol (DON) je uváděn v podmínkách střední Evropy jako nejčastější mykotoxin, který se vyskytuje ve vysokých koncentracích (GOLINSKI et al., 1996; Miedaner et al., 2008). U pšenice je DON považován za určitý indikátor kontaminace zrna mykotoxiny. Producenty tohoto mykotoxinu jsou druhy *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* a *F. poae*. Ve šlechtění pšenice a ječmene je žádoucí získat materiály s rezistencí k FHB, tj. s nízkým symptomatickým napadením, s nízkým obsahem DON a s nízkou redukcí výnosu.

Obrázek 1: Chemický vzorec mykotoxinu deoxynivalenol (DON)

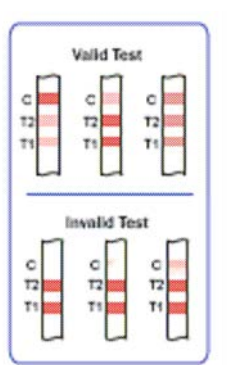


Stanovení obsahu DON je v současné době možno provádět přesnou metodou HPLC. Pro rutinní provozní stanovení nebo při využití ve šlechtitelském procesu je vhodnější imunochemické stanovení metodou ELISA s využitím komerčních kitů. Pro toto stanovení je třeba mít povolení od úřadu pro jadernou bezpečnost. Stanovení obsahu DON pomocí imunoafinitní chromatografie je alternativou k imunochemickému. Tato metoda (uvolnění na trh v únoru 2007) má díky své jednoduchosti a rychlosti (výsledek ze vzorku zrna je k dispozici během 15 min.) velký potenciál využití zejména ve výkupních organizacích. Ve šlechtění umožňuje analyzovat větší objemy šlechtitelského materiálu (provádět analýzy již od raných hybridních generací).

## 2. PRINCIP STANOVENÍ

V proužku chromatografického papíru jsou ukotveny tři oblasti s protilátkou specifickou pro DON. Na první dva tyto proužky (ve směru od startu chromatografie) je navázaná barevná látka. DON unášený od místa startu chromatografie vytěsňuje z vazebných míst protilátky barvivo, to je následně navázáno v posledním proužku. Koncentrace DON je přímo úměrná míře vytěsněného barviva a tím intenzitě zabarvení třetího proužku. Koncentrace se odečítá na předkalibrovaném readeru.

Obrázek 2: Výsledek imunoafinitní chromatografie ROSA DON Quantitative Test

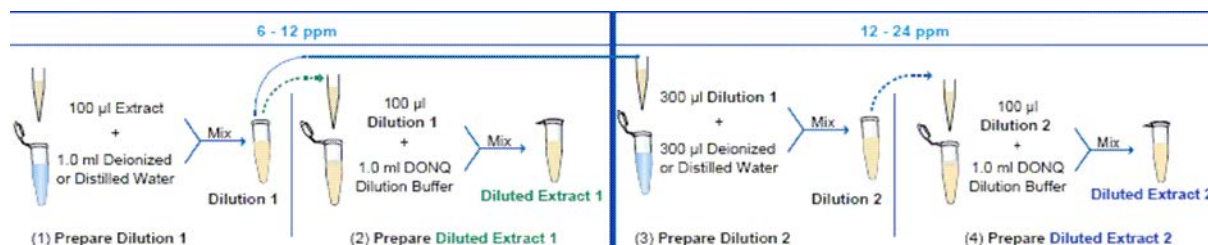


## 3. POPIS STANOVENÍ METODOU ROSA

### POSTUP DOPORUČENÝ VÝROBCEM:

Výrobce doporučený postup je schematicky uveden na obálce této publikace. Dle certifikátu č. FGIS 2007-104 vydaného Dep. of Agriculture USA je metoda standardizována pro kvantitativní stanovení obsahu DON v rozpětí 0 až 5,0 mg/kg, ze vzorku o min. navážce 50 g. Výrobce garantuje stanovení v rozpětí 0 - 6,0 mg/kg ze vzorku o min. navážce 10 g. V případě vyšších obsahů mykotoxinu je uváděn postup ředění vzorku pro rozpětí 6,0 - 12,0 a 12,0 - 24,0 mg/kg (obrázek 3).

Obrázek 3: Postup ředění vzorků s vyšším obsahem DON než 6,0 mg/kg doporučený výrobcem ROSA DON Quantitative Test



### POSTUP VHODNÝ PRO VZORKY Z POLNÍCH TESTŮ S UMĚLOU INFEKČÍ

Stanovení obsahu DON metodou ROSA je prováděno na vzorcích infikovaného zrna pšenice. Zrno je nutné rozdrtit, v našich analýzách byl použit laboratorní mlýnek IKA A11 Basic (pro analýzu je potřeba 1 g; dle zkušeností

jsou vhodné i běžné kávomlýnky). Pro každý vzorek je nutné připravit dvě mikrozkušavky (2,5 ml); do první 800  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O a do druhé 1 ml pufru. Další postup byl upraven pro nižší množství vzorku a pětinasobné ředění, které umožňuje měřit do 30 mg/kg). Upravený postup zahrnuje následující body:

- 1) Navážit vzorek do kyvetky 10 ml – 1 g (+/- 0,005 g);
- 2) Přidat 5 ml dH<sub>2</sub>O a krátce promíchat (vortex) do vytvoření suspenze;
- 3) Dále třepat v ruce po dobu 2 min.;
- 4) Odstředit (Hettich EBA20) 6000 ot/min, po dobu 3 min.;
- 5) Odebrat 200  $\mu$ l supernatantu do 800  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O, promíchat (=> 5x ředění);
- 6) Odebrat 100  $\mu$ l naředěného extraktu do 1 ml pufru, promíchat;
- 7) Nanést 300  $\mu$ l na strip;

Obrázek 4: Strip ROSA-DON



- 8) Stripy inkubovat při teplotě 45 °C po dobu 10 min. (obrázek 5);

Obrázek 5: inkubační komůrka s časovačem ROSA



- 9) Strip vložit do čtečky ROSA-M Reader (obrázek 6) a měřit 3x s nastavením kalibrace pro měření obsahu DON (pozn. V případě, že byly hodnoty přes limit 30 mg/kg – byly vzorky dále ředěny).

Obrázek 6: ROSA-M Reader pro stanovení obsahu DON metodou imunoafinitní chromatografie



#### **4. STANDARDIZACE METODY IMUNOAFINITNÍ CHROMATOGRFIE STANOVENÍ OBSAHU DON A POROVNÁNÍ SE STANOVENÍM OBSAHU DON KITEM ELISA A METODOU HPLC/UV**

Obsah DON byl stanoven ve vzorcích zrna 10 odrůd pšenice ozimé s odlišnou rezistencí k akumulaci DON. Odrůdy byly pěstovány ve 3 opakováních ve dvou variantách ošetření (I=umělá infekce směsí izolátů *F. graminearum* – plošný postřik parcel, IF=umělá infekce + ošetření fungicidem). Ke stanovení obsahu DON v reprezentativním vzorku byla využita nově zavedená metoda imunoafinitní chromatografie (ROSA<sup>®</sup> DON Quantitative Test). Tato metoda byla porovnávána se standardně využívanou metodou ELISA a s chromatografickou metodou HPLC/UV.

Byla zjištěna vysoká shoda ve výsledcích získaných výše uvedenými metodami (tabulka 1). Korelační koeficienty mezi použitými metodami byly vysoce významné (0,977-0,985). Relativně vyšší obsah DON byl stanoven metodou ELISA, zřejmě v důsledku křížové reakce s dalšími trichothecenovými mykotoxiny. Nejpřesnější stanovení bylo dosaženo metodou HPLC/UV. Na základě tohoto stanovení bylo možno separovat zkoušené odrůdy do 4 homogenních skupin. Další 2 metody umožnily pouze odlišení 3 skupin. Všechny 3 metody však shodně umožnily odlišit náchylné odrůdy Darwin a Mladka. Výsledky ukazují, že nově zavedená metoda imunoafinitní chromatografie může být efektivně využívána pro screening genotypů (Chrpová et al., 2008).



Tabulka 1: Průměrný obsah DON v mg/kg stanovený u 10 odrůd pšenice ozimé ve dvou variantách ošetření (I a IF) 3 metodami (ROSA-DON, ELISA a HPLC/UV)

I					IF				
Odrůda	ROSA DON	ELISA	HPLC/UV	Průměr	Odrůda	ROSA DON	ELISA	HPLC/UV	Průměr
Sakura	0,17 a	0,44 a	0,31 a	0,31	Sakura	0,00 a	0,05 a	0,02 a	0,02
SG-S316-05	0,85 ab	1,43 ab	0,94 ab	1,07	SG-S316-05	0,17 a	0,19 a	0,16 a	0,17
Simila	1,10 ab	1,55 ab	1,26 abc	1,30	Simila	0,03 a	0,36 ab	0,24 a	0,21
Bohemia	1,27 ab	1,70 ab	1,22 ab	1,40	Petrus	0,08 a	0,41 ab	0,32 ab	0,27
Petrus	1,26 ab	1,63 ab	1,30 abc	1,40	Bohemia	0,25 a	0,47 ab	0,41 ab	0,38
Rheia	1,08 ab	1,85 ab	1,28 abc	1,40	Sulamit	0,42 a	0,46 ab	0,41 ab	0,43
Raduza	2,87 ab	3,00 b	2,48 bc	2,78	Raduza	0,43 a	0,73 abc	0,39 ab	0,52
Sulamit	3,33 b	3,63 b	3,20 c	3,39	Rheia	0,65 ab	0,54 ab	0,46 ab	0,55
Mladka	7,80 c	7,47 c	5,93 d	7,07	Mladka	0,67 ab	1,06 bc	1,04 bc	0,92
Darwin	7,15 c	7,42 c	6,84 d	7,14	Darwin	1,19 b	1,51 c	1,49 c	1,40
<b>Průměr</b>	<b>2,69</b>	<b>3,01</b>	<b>2,48</b>		<b>Průměr</b>	<b>0,39</b>	<b>0,58</b>	<b>0,49</b>	

Rozdíly mezi odrůdami označenými stejnými písmeny nejsou statisticky významné (LSD, P=95 %)

## 5. DOSAŽENÉ VÝSLEDKY

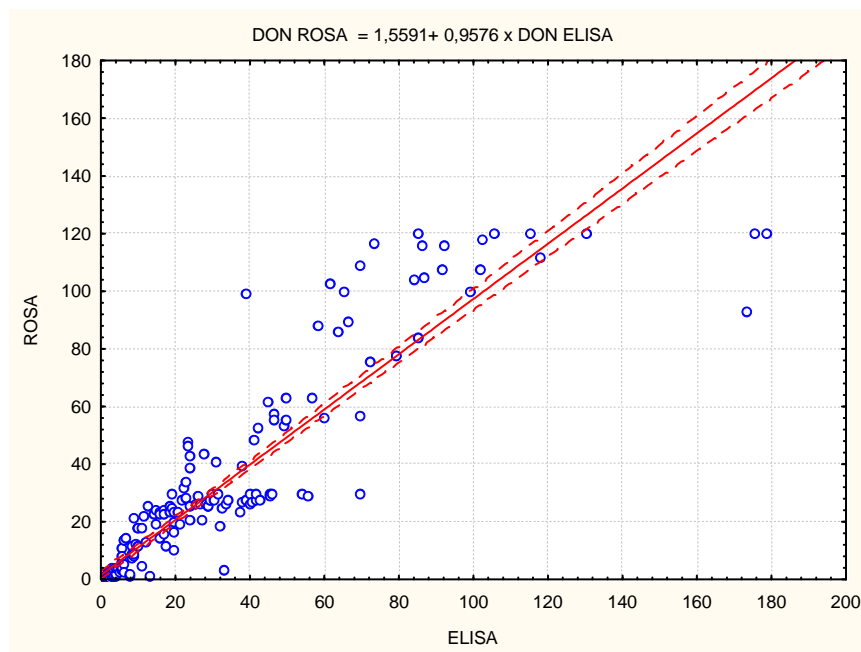
V rámci další validace metody ROSA bylo vyhodnoceno 327 vzorků z infekčních testů s umělou infekcí a z monitoringu SRS (odběry vzorků z provozních ploch pšenice). Na základě hodnocení párovým t-testem (tabulka 2) bylo zjištěno, že se oba soubory dat zjištěných metodou ROSA a metodou ELISA od sebe statisticky významně neliší. Základní statistická data prokazují lineární závislost mezi stanovením metodou ELISA a ROSA s vysokým koeficientem korelace 0,93. Graf 1 zobrazuje regresní přímku a rovnici závislosti stanovení metodou ROSA na metodě ELISA.

Tabulka 2: Hodnocení výsledků stanovení obsahu DON dvěma metodami (ROSA a ELISA) – hodnocení párovým t-testem

metoda	Průměr
ROSA	17,74
ELISA	16,89
	$t = 1,3765; p = 0,1696$
Rozdíl	0,85

Graf 1: Regresní přímka a rovnice závislosti stanovení obsahu DON pomocí metody ROSA a ELISA

(  $R^2 = 0,865$  )



Jak již bylo uvedeno ve šlechtění pšenice a ječmene je žádoucí získat materiály s nízkým obsahem DON. Při umělých infekcích se běžně dosahuje obsahu mykotoxinu DON u náchylných genotypů na úrovni 50-120 mg/kg. Pro šlechtitele je rozhodující odlišit materiály s obsahem DON pod hranicí 30 mg/kg. Pro tyto účely je metoda ROSA a uvedený postup s využitím ředění stejně vhodný jako metoda ELISA, protože obě metody umožní odlišit náchylné materiály. Přesnou kvantifikaci obsahu DON umožňují především chromatografické metody.

Z hlediska využití metody ROSA ve výkupních organizacích a v potravinářství je vhodnější využít oficiální postup stanovený výrobcem (Charm Sciences, Inc.; USA). Tento postup stanovení obsahu DON v zrna pšenice a ječmene je certifikovaný USDA (United States Dep. of Agriculture).

Obrázek 7: Porost pšenice silně napadený fuzariózou klasu, vzorek sklizeného zrna obsahoval 30 mg/kg DON.



### **III) Srovnání novosti přístupů**

Metodika přináší komplexní informace o využití nové metody ROSA. Tato metoda umožňuje finančně i časově méně náročné stanovení obsahu DON. Výsledky získané touto metodou vyhovují požadavkům pro výběr materiálů s vyšší rezistencí k FHB. Metoda ROSA může být náhradou ELISA pro využití ve šlechtění na odolnost k fuzarióze klasu. Výhodou této metody je možnost stanovovat obsah DON bez povolení Státního úřadu pro jadernou bezpečnost.

### **IV) Popis uplatnění certifikované metodiky**

Metodika nachází dobré uplatnění ve šlechtění obilnin a má i potenciál využití při výkupu zrna pokud je nutné stanovovat velké množství malých vzorků (mlýny, sladovny).

### **V) Ekonomické aspekty**

Porovnání finanční a časové náročnosti je uvedeno v tabulce 3. Finančně i časově je nejnáročnější metoda kapalinové chromatografie (HPLC/UV). Tato metoda se používá pro přesné analýzy. Důležité je porovnání s metodou ELISA, které se běžně využívá pro stanovení obsahu DON při hodnocení rezistence k fuzarióze klasu. Využití imunoafinitní chromatografie kromě snížení finančních nákladů na analýzu vzorku přináší i úsporu času. Na základě těchto údajů můžeme konstatovat, že zavedení metody ROSA vede k materiálovým úsporám asi 45%, mzdovým úsporám asi 40% (tj. nižší časová náročnost a nižší požadavek na kvalifikaci pracovníka provádějícího stanovení). K úsporám lze přičíst i vstupní náklady na vybavení pracoviště (asi 20% proti ELISA). Výhodou této metody je možnost stanovovat obsah DON bez povolení úřadu pro jadernou bezpečnost.

Předpokládané ekonomické přínosy na pracovišti Selgen, a.s., šlechtitelské stanici Stupice jsou 200 tis. Kč. Ekonomické přínosy jsou vypočteny na základě

tabulky 3. Výpočet je proveden pro 300 vzorků ročně, na období pěti let, při hodinové mzdě pracovníka 95 Kč. Pokud bude stanovení obsahu DON zavedeno do všech šlechtitelských programů fy Selgen, a.s. (dosud nebylo prováděno pro vysokou finanční náročnost metody ELISA), přinese tento nový postup úsporu 700 tis. Kč.

Tabulka 3: Porovnání finančních a časových požadavků pro stanovení obsahu DON v 1 vzorku třemi metodami

Metoda	Velikost vzorku (g)	Finanční náklady (EURO)	Časová náročnost (minuty)
ROSA DON	1	10	6*
ELISA	5	15	10*
HPLC/UV	5	48	14*

\*bez přípravy vzorku

## VI) Seznam použité literatury

GOLINSKI P., PERKOWSKI J., KOSTECKI M., GRABARKIEWICZ - SZCZESNA J., CHELKOWSKI J. (1996): *Fusarium* species and *Fusarium* toxins in wheat in Poland. *Sydowia*, 48: 12–22.

MIEDANER T., LÖFLER M., BOLDUAN CH., KESSEL B., OUZONOVA M., MIRDITA V., MELCHINGER A.E. (2008): Genetic variation for resistance and mycotoxin content of European maize inoculated with *Fusarium graminearum* and *F. verticillioides*, *Cereal Research Communications* 36, suppl. B: 45-48.

SHARPE J.R. (2007): Certificate of Conformance No. FGIS 2007-104, Quantitative test kit for DON, U.S. Dep. of Agri., Grain inspection, Packers and Stockyards Admin.

<http://www.charm.com/en/products/rosa-grain/don-vomitoxin/dong-quantitative.html>

## VII) Seznam publikací, které předcházely metodice

CHRPOVÁ J., ŠTOČKOVÁ L., SEDLÁČEK T., VEŠKRNA O., ŘEHOŘOVÁ K., HORČIČKA P. (2008): Verification of newly developed method of DON content determination, *Cereal Research Communications* 36, suppl. B: 349-352.

## Poznámky

---

## Poznámky

---

Autoři:

Ing. Jana Chrpová, CSc.  
Ing. Lenka Štočková  
Ing. Taťána Sumíková

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.  
Drnovská 507  
161 06 Praha 6 – Ruzyně

Ing. Ondřej Veškrna, Ph.D.  
Ing. Tibor Sedláček  
Ing. Karla Řehořová  
Dr. Ing. Pavel Horčíčka  
Výzkumné centrum SELTON, s.r.o.  
Stupice 24  
250 84 Sibřina

Název: Využití metody imunoafinitní chromatografie pro stanovení obsahu deoxynivalenolu v zrně obilovin

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.  
Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně

Redakce: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.  
Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně

Metodika je veřejně přístupná na adrese [www.vurv.cz](http://www.vurv.cz), [www.selton.cz](http://www.selton.cz)

Náklad: 75 výtisků

Vyšlo v roce 2011

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika je poskytována bezplatně

Kontakt na autora: [chrpova@vurv.cz](mailto:chrpova@vurv.cz)

© **Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2011**  
© **Výzkumné centrum SELTON, s.r.o., Stupice, 2011**

**ISBN: 978-80-7427-067-3**

# ROSA® DON postup kvantitativního stanovení

Testovací rozpětí 0 - 6 ppm

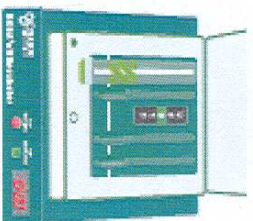


## Příprava vzorku

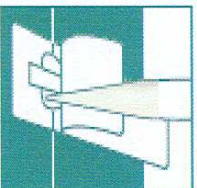
- (1) Navažka:**  
Základní vzorek  
50g\* nebo 10g
  - (2) Přidání vody:**  
Deionizovaná nebo destilovaná  
250ml\* nebo 50ml
  - (3) Extrakce:**  
Třepat nebo míchat  
po 1-2 min
  - (4) Čištění:**  
Centrifugace, filtrace
  - (5) Ředění:**  
Příprava ředěného extraktu
- 100 µl extraktu  
+  
1,0 ml DONQ ředícího pufru  
↓ Mix

\* dle uznané metody GPSA/10 g vzorek je doporučen výrobcem

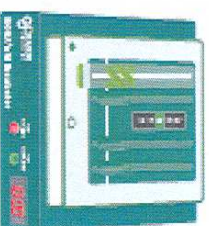
## Testovací postup



- (1)**  
Vložit strip do inkubátoru

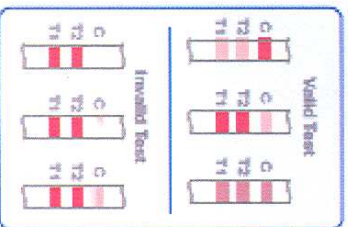


- (2)**  
Odlepit pásku  
Pipetovat 300 µl ředěného vzorku do startovací jamky  
Zpět strip zalepit



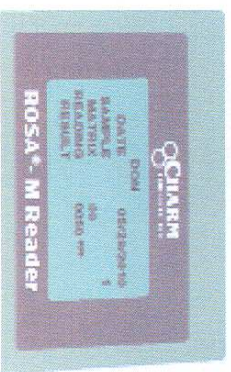
- (3)**  
Zavřít kryt inkubátoru  
Zajistit klíčku  
Inkubovat 10 min.

## Vyhodnocení výsledků



- (1)** Kontrola stripu

- (2)** Měření – ROSA-M reader



Nastavte reader na DON channel, 3 line mode (bilká) a MATRIX 00.  
Vhodné pro stanovení: Pšenice, ječmen, oves, rýže, kukurice

Výrobce: **Charm Science Inc., USA**

Obchodní zastoupení pro ČR:  
**O.K. SERVIS Biopro, s.r.o.**  
Bořetická 2668/1, 193 00 Praha 9-Horní Počernice, Česká republika  
Tel.: +420 281 091 460, +420 841 111 114  
Fax: +420 281 866 264  
E-mail: [info@oks.cz](mailto:info@oks.cz)