

Thema: „Entwicklung eines Screening-Verfahrens für den hochsensitiven Nachweis von Gliotoxin in Lebens- und Futtermitteln“

FuE-Teilprojekt: Generierung von Gliotoxin-spezifischen Antigenen und Antikörpern

Beteiligte Einrichtungen: Gesellschaft für Lebensmittel- und Umweltanalytik mbH, Hoppegarten, Institut für Bakteriologie und Mykologie, Veterinär-medizinische Fakultät der Universität Leipzig

Problem- und Zielstellung

Der weltweit größte Risikofaktor für den Verderb von Lebens- und Futtermitteln ist die Kontamination mit Giften von Schimmelpilzen. Diese führen zu schwerwiegenden gesundheitlichen Risiken für Mensch und Tier sowie zu massiven wirtschaftlichen Verlusten in der Futter- und Lebensmittelproduktion. Für einige prominente Toxine bestehen bereits Nachweisverfahren und auch routinemäßige Kontrollen. Auf andere, ebenso problematische Gifte, wie das Gliotoxin, wird bisher aber nicht geprüft. Im Projekt sollte daher eine Screening-Methode für das ubiquitäre Schimmelpilztoxin Gliotoxin entwickelt werden, welche als standardisierte Methode für eine Routine-Analyse von Lebens- und Futtermitteln etabliert werden kann.

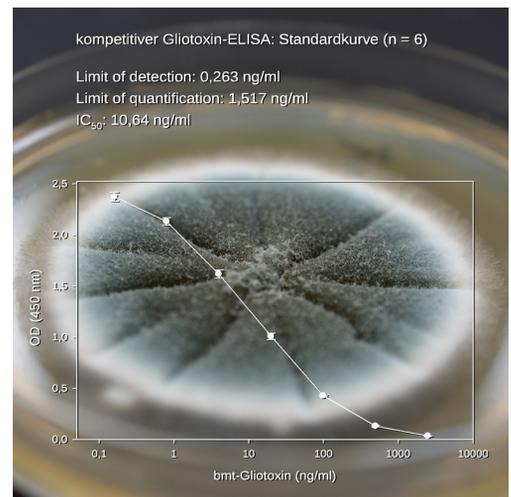
Die Aufgaben der Frankenförder Forschungsgesellschaft im Projekt umfassten zum einen die Entwicklung eines Gliotoxin-Antigens, von spezifischen Antikörpern gegen Gliotoxin, die Entwicklung eines ELISA-Nachweisverfahrens, den Abgleich und die Validierung des ELISA-Verfahrens mit etablierten Methoden, wie HPLC/LC-MS sowie die Entwicklung von geeigneten Probenvorbereitungsverfahren von Lebens- und Futtermitteln verschiedener Matrices.

Ergebnisse

Für die Immunisierung wurde erfolgreich ein Gliotoxin-Protein-Konjugat entwickelt, mit welchem im Tiermodell Gliotoxin-spezifische Antikörper produziert werden konnten. Durch anschließende affinitätschromatographische Reinigung konnten die Spezifität und Sensitivität der Antikörper optimiert und Kreuzreaktionen zu anderen, von der chemischen Struktur her ähnlichen Toxinen eliminiert werden. Erstmals konnten die gewonnenen Antikörper im kompetitiven Test durch freies Gliotoxin vollständig gehemmt werden.

Mit den spezifischen Antikörpern wurde ein indirekter kompetitiver ELISA entwickelt. Der ELISA reagiert auf Gliotoxin und das Abbauprodukt bmtGliotoxin gleichermaßen und liefert somit ein Summensignal der beiden Stoffe. Die untere Nachweisgrenze des ELISA lag bei 5 µg/kg, die untere Grenze der Quantifizierbarkeit bei 30 µg/kg.

Zum ELISA wurde eine Probenverarbeitungsmethode entwickelt, mit der eine hohe Winderfindungsrate bei gezielt mit Gliotoxin dotierten Proben erreicht wurde. Die Validierung des ELISA ergab im Vergleich mit der Standard-Nachweismethode LC-MS/MS tatsächlich höhere Konzentrationen, da die LC-MS/MS nur Gliotoxin, der ELISA aber zusätzlich bmtGliotoxin nachweist.



Standardkurve des kompetitiven Gliotoxin-ELISA (n=6)
Limit of detection: 0,263 ng/ml
Limit of quantification: 1,517 ng/ml
IC₅₀: 10,64 ng/ml

Ausblick

Der im Projekt entwickelte ELISA ist für das Screening von Futter- und Lebensmittelproben auf eine Kontamination mit Gliotoxin geeignet und kann damit generell in der Diagnostik eingesetzt werden.

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Energie

Dieses Projekt (16 KN 077327) wurde durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

www.frankenfoerder-fg.de