

85

תקציר הדו"ח:

מטרת המחקר היתה לפתח שיטה לגלוי מוקדם של פטריות אפלטוקסיגניות בגרעינים ובמזון יבש. פותחו מערכות מולקולריות המבוססות על PCR והושרו נוגדנים רב-שבטיים כנגד חלבונים כימריים הייחודיים לביוסינטזה של אפלטוקסינים. שלב המערכות הניב אמצעי גילוי רגיש וייחודי בו ניתן היה לזהות גם רמות נמוכות של פטריות אפלטוקסיגניות בגרעינים מאולחים. ההיפוטזה אשר היתה ביסודו של מחקר זה הוכחה כנכונה. בעבודה זו פותחו ויושמו שיטות רגישות וסגוליות לגלוי מוקדם של פטריות אפלטוקסיגניות בגרעינים ובמזון. בעזרת השיטות המתוארות. ניתן היה לגלות תאים ספורים של הפטריות. ואמצעי זה מאפשר טיפול במזון חשוד עוד בטרם התפתחה הפטריה ונוצר אפלטוקסין ובכך למנוע נזק עתידי כבד כלכלי ובריאותי כאחד.

חוקר ראשי: נמי פסטר, מינהל המחקר החקלאי
חוקרים: חני שפירא, הפקולטה לחקלאות
רפי סלומון, מינהל המחקר החקלאי

תוכן עניינים

1	1. מבוא
1	1.1 פטריות עובש בגרעינים מאוסמים
1	1.1.1 הגורמים המשפיעים על התפתחות פטריות עובש בגרעינים מאוסמים
2	1.1.2 נזקים הנגרמים על ידי פטריות
3	1.1.3 דרכים למניעת התפתחותן של פטריות בגרעינים
4	1.2 מיקוטוקסינים - רעלני פטריות
5	1.3 אפלטוקסינים
5	1.3.1 פטריות אפלטוקסיגניות
6	1.3.2 אפלטוקסינים
7	1.3.3 גורמים המשפיעים על יצירת אפלטוקסינים
7	1.3.4 השפעות טוקסיות של אפלטוקסינים
7	1.3.5 אפלטוקסינים כגורמי תחלואה באדם
8	1.3.6 ביוסינתזה של אפלטוקסינים
11	1.3.7 תבדוד מוטנט <i>Aspergillus flavus</i> NRRL649 שאינו אפלטוקסיגני
12	1.4 שיטות לאיבחון אפלטוקסינים במזון
13	1.5 שיטות לגילוי וזיהוי עובשים בגרעינים ובמזון
14	1.6 גישות חדישות להערכת אוכלוסיית פטריות בגרעינים מאוסמים ובמזון
14	1.6.1 שיטות אימונולוגיות
14	1.6.2 שיטות מולקולריות
16	2. שיטות וחומרים
16	2.1 חומרים
16	2.1.1 רשימת קיצורים
17	2.1.2 כתובות החברות
18	2.1.3 חומרים
21	2.1.4 חומר ביולוגי
21	2.2 שיטות
21	2.2.1 הפקת DNA
22	2.2.2 הכנת תחלים לראקציית PCR
22	2.2.3 אמפליפיקציה של הגן בשיטת ה-PCR
22	2.2.4 ג'ל אגרוז להפרדת מקטעי DNA

24 RNA הפקת 2.2.5
25 RNA ג'ל אגרוז להפרדת מקטעי RNA 2.2.6
25 RT-PCR הכנת תחלים לראקציית RT-PCR 2.2.7
25 RT-PCR אמפליפיקציה של קטע הגן בשיטת ה-RT-PCR 2.2.8
27 בדיקת יצירת אפלטוקסין 2.2.9
28 קביעה כמותית של אפלטוקסין 2.2.10
28 מדדים לבדיקת גידול פטריות 2.2.11
29 שיבוט מקטעי DNA לפלסמיד והחדרתם לחיידקים 2.2.12
30 הפקת חלבונים רקומביננטים להשראת נוגדנים בארנבות 2.2.13
32 ACP-ELISA 2.2.14
33 Western blot אנליזת 2.2.15
35 3. תוצאות
35 3.1 שיבוט מקטעי DNA לפלסמיד והחדרתם לחיידקי <i>Escherichia coli</i>
35 3.1.1 שיבוט מקטע הגן <i>apa-2</i> לפלסמיד והחדרתו לחיידקי <i>Escherichia coli</i>
39 3.1.2 שיבוט הגן <i>ver-1</i> לפלסמיד והחדרתו לחיידקי <i>Escherichia coli</i>
42 3.1.3 שיבוט הגן <i>apa-2</i> לפלסמיד והחדרתו לחיידקי <i>Escherichia coli</i>
	3.2 זיהוי ספציפי של הפטריה <i>Aspergillus parasiticus</i> בדוגמאות תירס ברמות אילוח
44 שונות
	3.2.1 שימוש בשיטת ה-PCR לזיהוי ספציפי של <i>A. parasiticus</i> בדוגמאות תירס
44 מאולחות
	3.2.2 זיהוי ספציפי של <i>A. parasiticus</i> בדוגמאות תירס מאולחות בשיטת
46 ה-ELISA
	3.3 בדיקת מוטנט <i>Aspergillus flavus</i> NRRL649 שאינו אפלטוקסיגני (ת.649) ע"י
47 שימוש משולב בטכניקות הגילוי השונות
47 3.3.1 בדיקת יצירת אפלטוקסין בתבדיד <i>A. flavus</i> NRRL649 שאינו אפלטוקסיגני
48 3.3.2 בדיקת התבדיד <i>A. flavus</i> NRRL649 בשיטת ה-PCR
49 3.3.3 זיהוי התבדיד <i>A. flavus</i> NRRL649 בשיטת ה-RT-PCR
50 3.3.4 זיהוי התבדיד <i>A. flavus</i> NRRL649 בשיטת ה-ACP-ELISA
	3.4 בדיקת התבדיד <i>Aspergillus tamaris</i> NRRL649 ע"י שימוש בטכניקות הגילוי
50 השונות
50 3.4.1 בדיקת התבדיד <i>A. tamaris</i> NRRL649 בשיטת ה-PCR
51 3.4.2 זיהוי התבדיד <i>A. tamaris</i> NRRL649 בשיטת ה-ACP-ELISA

52 4. דיון
62 5. תקציר
64 6. רשימת ספרות

1. מבוא

1.1 פטריות עובש בגרעינים מאוסמים

פטריות משמשות בהתססת מזון, ביצירת מזון לבע"ח, בהכנת גבינות, משקאות אלכוהוליים ולחם, בייצור אנזימים, חומצות אורגניות, ויטמינים, אנטיביוטיקות וסטרואידים. פטריות קרקע שונות חיות על שורשי צמחים וחלקן יוצר סימביוזה (micorrhiza) בה יש חילוף חומרים (פחמימות, מלחים) בין הפטריה לבין הצמח. פטריות אלה חשובות לחקלאות כיוון שהן גורמות, פעמים רבות, להגדלת כמות היבול בגלל אספקת חומרי מזון לצמח (Harley, 1989). מאידך מחלות רבות נגרמות לצמחים, בעלי חיים ולאדם על ידי פטריות או חומרים הנוצרים על ידן. פטריות עובש המתפתחות בגרעינים גורמות הפסדים כלכליים ניכרים ששיעורם נאמד ב-1-2% מכלל יבול הגרעינים בעולם (Christensen and Kaufman, 1969). בנוסף, נגרמים נזקים עקיפים למשק החי (ירידה בתנובת חלב, פחיתה בהטלה, עליית הרגישות למחלות ולירידה במשקל הגוף) כתוצאה מצריכת מזון מזוהם ברעלנים. רעלני הפטריות ידועים כגורמי נזק ישיר לבע"ח. הרעלות המוניות של חיות משק שהסתיימו בשיעורי תמותה גבוהים יוחסו ישירות לנוכחות רעלנים במזון (Bullerman, 1979; Coker, 1979). אין כיום הערכה מדויקת לשיעור הנזק הישיר והעקיף הנגרם על ידי רעלנים, אולם נזק זה המתווסף לנזקים ישירים לגרעינים עצמם, מגביר את ההכרה בחשיבותן של פטריות עובש כגורמי סיכון בריאותי וקלקול של גרעינים ומזון מעובד. פטריות עלולות לזהם גרעינים בשלבי הבשלתם השונים עוד בהיותם בשדה. על קבוצת פטריות זו המכונה "פטריות השדה" (field fungi) נמנים בעיקר מינים השייכים לסוגים: *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Cladosporium*, *Alternaria*. להתפתחותן של פטריות השדה דרושה לחות גבוהה והן אינן מתפתחות בתנאי יובש השוררים באסם. לעומתן קיימים מינים המתפתחים אף ברמות לחות נמוכות, ואלה עלולים לתקוף גרעינים במהלך האיסוס. קבוצה זו מכונה "פטריות מחסן" (storage fungi) ועליה נמנים בעיקר מינים של הסוגים *Aspergillus* ו-*Penicillium*. בתנאים מסוימים עלולים להתפתח, בין היתר, מיני *Fusarium* (Paster, 1990; Lacey et al., 1980).

1.1.1 הגורמים המשפיעים על התפתחות פטריות עובש בגרעינים מאוסמים

תנאי סביבה, ובעיקר לחות וטמפרטורה, הם הגורמים החשובים ביותר המשפיעים על התפתחות פטריות (Moreau and Moss, 1979). הפטריות מחולקות לשלוש קבוצות בהתאם לדרישות הלחות שלהן:

קסרופיטים (Xerophytes) - מתפתחים בלחות של 65-80% (מינים מהקבוצות *Aspergillus restrictus* ו-*Aspergillus glaucus*); מזופיטים (Mesophytes) - מתפתחים בלחות של 80-90% (מיני *Penicillium* כמו *P. citrinum* ומינים רבים של *Aspergillus* כמו *A. niger*, *A. flavus* ו-*A. ochraceus*); הידרופיטים (Hydrophytes) - זקוקים ללחות יחסית גבוהה מ-90% (שמרים ומיני *Fusarium*, הנמנים גם על פטריות השדה). תהליך העיפוש עלול להתחיל בגרעינים

מאוסמים כתוצאה מפעילותן של פטריות קסרופיטיות היוצרות לחות ותנאים נוחים להתפתחות מינים מזופיטים, ומאוחר יותר - גם הידרופיטים.

ניתן לחלק את פטריות המחסן לקבוצות גם לפי דרישות הטמפרטורה שלהן:

פסיכרופילים (Psychophyles) - מתפתחים בטמפרטורה של $0-5^{\circ}\text{C}$ (מיני *Penicillium*);
מזופילים (Mesophyles) - העשויים להתפתח בטמפרטורות של $5-10^{\circ}\text{C}$, אך הטמפרטורה המיטבית להתפתחותם היא $20-30^{\circ}\text{C}$ (רוב מיני ה-*Aspergillus*); תרמופילים (Thermophyles) - מתפתחים בטמפרטורות גבוהות כגון $50-60^{\circ}\text{C}$ (כמו *A. fumigatus*).

גורמים נוספים המשפיעים על התפתחות פטריות המחסן הם: הרכב האווירה הבין-גרגרית באסם; נוכחות חרקים - תורמת להתפתחות פטריות הן בגלל נזקים מכניים הנגרמים לגרעינים ומאפשרים חדירת הפטריות, והן בגלל הלחות הנוצרת כתוצאה מפעילותם המטבולית. בנוסף, חרקים מעבירים אינוקולום ממקום למקום ומגבירים את תפוצת הפטריות; זמינות חומרי המזון והרכב הגרעין - בגרעינים פגומים ובאלה בהם חומרי מזון החיוניים לפטריה זמינים; רמת הפסולת בצובר - לחות נקלטת על ידי הפסולת בקצב מהיר מאשר על ידי הגרעינים ומהווה מצע נוח להתפתחות הפטריות; תחרות בין מינים ונוכחות אנטגוניסטים (כגון חיידקים, שמרים או עובשים אחרים) - התחרות יכולה להתבטא בתחרות על מקור מזון, בכושר אכלוס מהיר של מין אחד, יצירת תנאי pH או חומרים מעכבים, היפרפרזיטיזם, או שילוב מספר מנגנונים. לעתים עשויה נוכחותם של מיני מיקרואורגניזמים נוספים על הגרעין לתרום להתפתחות הפטריה ולא לעכבה. התפתחות הפטריות מושפעת בעיקר מפעילות גומלין בין כל הגורמים. לדוגמא, בתנאים של לחות מיטבית לגידול תתאפשר התפתחות מינים רבים גם כאשר תנאי הטמפרטורה שונים מאלה המקובלים כמיטביים. בכל מקרה, מאחר שלחות של 65% נחשבת כמגבילה את התפתחותם של המינים הקסרופיטים, היא מוגדרת כלחות הסף הנדרשת לאיסוס בטוח (Moreau and Moss, 1979; Clarke, 1968).

1.1.2 נזקים הנגרמים על ידי פטריות

סוגי הנזק העיקריים הנגרמים על ידי פטריות העובש נסקרו בהרחבה על ידי Moreau and

Moss (1979) ו-Clarke (1968):

התחממות: פעילותן המטבולית של פטריות העובש מלווה בשחרור חום. החום המצטבר במוקדי ההתפתחות של הפטריות וטמפרטורת הצובר עולה. תהליך ההתחממות הנובע מפעילות הפטריות מכונה "התחממות ביולוגית", ובשיאו מגיעה הטמפרטורה בצובר עד ל- 80°C . בשלב הבא מתחילים תהליכים כימיים אקסותרמיים בגרעינים המביאים לעליית הטמפרטורה עד ל- 100°C ויותר ("התחממות כימית"). החום מביא להתחממות הגרעינים, לפגיעה בערכם התזונתי וביכולתם לשמש כחומר גלם למזון עקב איבוד תכונות טכנולוגיות ולפגיעה בעובר הזרע ולכן לפגיעה בכושר הנביטה שלו.

עיפוש - התפתחות פטריות בכמות גדולה בצובר גרעינים גורמת נזקים שונים בעצם נוכחותן של פטריות והפעולות המטבוליות שלהן. נשימת הפטריות מלווה בעליית לחות ועקב כך נדבקים הגרעינים זה לזה ויוצרים גושים גדולים. גרעינים נגועים בעובשים מאבדים את צבעם הבהיר, הופכים כהים וחסרי ברק אופייני. בעיקר נפוצה תופעה של השחמת עוברי הגרעינים (embryo discoloration) המתרחשת בעת התפתחות הפטריות, אולם מנגנון השחמה זה טרם הוברר במדויק. המצאות גרעינים כהים בעת הטחינה מורידה את איכות הקמח. ליפאזות הנוצרות ע"י פטריות מפרקות את הגליצרידים בגרעינים לחומצות שומן חופשיות (FFA - free fatty acids). שמן המופק מגרעינים בהם רמת ה-FFA גבוהה הוא ברמה ירודה. ערכם התזונתי והיכולת להשתמש בגרעינים מעופשים כחומרי גלם בתעשיית המזון יורדים בגלל ניצול חומרי המזון בגרעין על ידי הפטריות. העיפוש מלווה ריח חריף בגלל המצאות חומצות שומן חופשיות וחמצון. כושר הנביטה של גרעינים המיועדים לשמש כזרעים נפגע בגלל ניצול חומרי התשמורת ופגיעה בעובר על ידי הפטריות.

יצירת רעלנים: פטריות עובש רבות מייצרות רעלנים המסוכנים ביותר לאדם ולבע"ח. פגיעתם של הרעלנים חמורה אף בכמויות זעירות, ורבים מהם נוצרים בגרעינים גם בשדה וגם בעת האיסוס. הרעלנים הנחשבים כיום כמסוכנים ביותר הם אלה הנמנים על קבוצת האפלטוקסינים (aflatoxins), ובעיקר AFB_1 , אשר הוכחו כגורמים לסרטן כבד בבע"ח ובבני אדם.

1.1.3 דרכים למניעת התפתחותן של פטריות בגרעינים

ניתן לסווג את האמצעים המקובלים למניעת התפתחות פטריות לשלש קטגוריות: אמצעים כימיים, אמצעים פיזיקליים ואמצעים ביולוגיים.

אמצעים כימיים: אמצעים כימיים הם הנפוצים ביותר בשימור גרעינים. החומרים המקובלים ביותר הם חומצות אורגניות בעלות משקל מולקולרי נמוך ומלחיהן (חומצה פרופיונית וחומצה אצטית, פרופיונט הסידן ופרופיונט הנתרן). חומרים אלה נחשבים בטוחים, אך מגבלותיהם רבות: הם פונגיסטטים ולא פונגיצידים, קורוזיביים - גורמים לאיכול תאי המתכת בהם מאוסמים הגרעינים והם מסוכנים למשתמשים בהם. ומחייבים אמצעי מיגון מיוחדים (Christensen and Sauer, 1982; Park and Liang, 1993).

אמצעים פיזיקליים: השיטות הפיזיקליות כוללות ייבוש גרעינים; אוורור להורדת לחות הסביבה עד מתחת ללחות הקריטית; הורדת טמפרטורת הצובר; שימוש באווירה מבוקרת (Modified Atmosphere) - שיטה המתבססת על נשימתן הארובית של הפטריות. באווירה דלת חמצן ועתירת פחמן דו-חמצני גדילת הפטריות נמנעת או מתעכבת (Cuero *et al.*, 1988; Paster, 1990); שימוש בקרינת גמא - קרינת גמא קוטלת מקורות מידבק בגרעינים בגלל האנרגיה הגבוהה של הקרינה הפוגעת בתאים חיים, אולם הרמות הדרושות לכך (עד 12 kGy) גבוהות בהרבה מאלה המותרות לשימוש במזון המיועד לאדם על ידי רשויות הבריאות (עד 3 kGy) (Cuero *et al.*, 1988) ולכן השימוש בקרינה להדברת פטריות בגרעינים אינו מקובל כיום.

הדברה ביולוגית: שימוש באנטגוניסטים (בעיקר שמרים וחידקים) להדברת פטריות מחסן בגרעינים. האפקט האנטגוניסטי תלוי בתנאים הסביבתיים, בעיקר בכמות המים. השמר *Pichia guilliermondii* נתגלה כיעיל בעיכוב הפטריה *A. flavus* (Paster et al, 1993) והשמר *Pichia anomala* עיכב ביעילות את העובשים *Aspergillus candidus* ו-*Penicillium roqueforti* (Bjornberg and Schnurer, 1993). מנגנון הפעולה של השמרים אינו ברור דיו, אם כי על סמך תצפיות במיקרוסקופ אלקטרוני סורק ומתוך דינמיקת הגידול של השמר, ניתן היה להסיק כי הוא מתחרה טוב יותר על מקורות מזון לפחות ב-3 הימים הראשונים לאחר האילוח. שימוש באנטגוניסטים הוא בעייתי בגלל קלקול שעלול להיגרם על יד האנטגוניסט עצמו, בגלל צורת יישום המיקרואורגניזמים - ריסוס - המעלה את לחות הגרעינים לרמות בילתי רצויות, ובגלל סכנת יצירת מטבוליטים רעילים ע"י מספר אורגניזמים אשר הוכחו כאנטגוניסטים (Cuero et al, 1988).

שימוש במיצויים מצמחים: חומרים רבים שמוצו מצמחי רפואה, תבלין, בושם ונוי מעכבים גידול של פטריות עובש. דוגמאות לצמחים מהם הופקו תרכובות בעלות אפקט פונגיסטטי או פונגיצידי: אורגנו, קורנית, ציפורן, חרדל, פלפל לבן, קינמון, זנגביל, מנטה, שום, אניס, מרווה, קליפות הדרים, בצל, גזר, קיקיון. מנגנון הפעולה של מיצוי צמחים אינו ברור לחלוטין, אולם מספר מחקרים הציעו כי אתר הפעולה של חומרים אלה הוא ממברנת תא הפטריה. פגיעה כזו מובילה לפגיעה בתהליכים המתרחשים בתא עצמו (Moleyar and Narasimham, 1986; פסטר ועמיתיו, 1993).

שילוב-מספר אמצעים: מטרתה של שיטת ההדברה המשולבת היא מניעת גידול הפטריות תוך שימוש מינימלי. בחומרי הדברה כימיים. שיטה זו מנצלת את תכונותיהם של מעכבי פטריות מקטגוריות שונות (אנטגוניסטים, מיצוי צמחים, אוריה מבוקרת) ואת האפקט הסינרגיסטי הקיים ביניהם כאשר כל אחד ניתן ברמה מופחתת.

דוגמאות לשילוב שיטות: צירוף בין מיצוי שהופק מציפורן לבין אשלגן סורבט (Azzouz and Bullerman 1982), חומצה פרופיונית + קרינת גמא + אוריה מבוקרת (Paster et al., 1992). נראה כי קיים אפקט סינרגיסטי בין מספר חומרים שהופקו מצמחים, כך שצירוף החומרים היה יעיל יותר מאשר פעילותו של כל חומר בנפרד. חסרונה של השיטה המשולבת הוא שיעילותה מותנית באפקט הסינרגיסטי, שאינו קיים תמיד, בין המרכיבים (Pater et al. 1992; פסטר, 1994).

1.2 מיקוטוקסינים - רעלני פטריות

רעלני פטריות הם מטבוליטים משניים הנוצרים בתנאים מסויימים של גידול פטריות, ובעיקר פטריות עובש. יצירת רעלנים אופיינית בעיקר למינים השייכים לסוגים *Fusarium*, *Aspergillus* ו-*Penicillium*. רובם ככולם תוקפים תוצרת חקלאית טרייה ומאוסמת. כיום ידועים מעל 100 מיקוטוקסינים שונים אשר מרביתם נפוצים בטבע במגוון רב של סוגי תוצרת חקלאית גולמית

ובמזון מוגמר. דוגמא להתפרצות מחלה שנגרמה כתוצאה מהרעלת מיקוטוקסינים היא המחלה (ATA) Alimentary Toxic Aleukia. מחלה זו פרצה בשנים 1942-1947 באזורים הסמוכים לסיביר. מליוני בני אדם נפגעו לאחר אכילת גרגרי שעורה וחיטה שלוקטו לאחר שנשמרו במהלך המלחמה מתחת למעטה השלג. סימני המחלה היו: הקאות ושלשולים, דלקות עור, לויקופניה (ירידה במספר כדוריות הדם הלבנות), שטפי דם רבים ופגיעה במח העצמות. הגורמים למחלה היו טריכותזנים, רעלנים המופרשים על ידי פטריות מהסוג *Fusarium* והכוללים בין היתר את הרעלנים Diace toxyscirpenol (DAS), Vomitoxin (DON), Deoxynivalenol (T-2) ו-Nivalenol (NIV) (Betina, 1989). מיקוטוקסינים נפוצים אחרים, הנוצרים ע"י מיני *Fusarium*, הם זארלנון (Zearalenone) הגורם לפגיעה במערכות המין ולהפלות, ופיומוניזינים (Fumonisin) הגורמים לנזק במוח (Mirocha et al., 1977). מיקוטוקסינים נפוצים הנוצרים ע"י מיני *Penicillium* הם: ציטרינין (citrinin), אוכראטוקסין A (ochratoxin A), פטולין (patulin), חומצה פניצילית (penicillic acid) וחומצה ציקלופיזאזונית (cyclopiazonic acid). בין המיקוטוקסינים החשובים הנוצרים ע"י מיני *Aspergillus* מונים את האפלטוקסינים, סטריגמטוציסטין ואוכרטוקסין (Betina, 1989; Newberne, 1987; Krog, 1987; Paterson and Kozakiewicz, 1997).

מיקוטוקסינים תוקפים מגוון אברים ורקמות בגוף. הנזקים יכולים להיות כרוניים או אקוטיים. הפגיעה יכולה להיות במערכת מסוימת בגוף, באיבר או ברמת התא. רעלנים רבים פוגעים בכבד. אחרים פוגעים בכליות, במערכת העיכול, ברייה, דם, עצבים וכו'. רעלנים רבים אף משרים התפתחות של גידולים סרטניים במערכות שונות בגוף. מבין המיקוטוקסינים הנפוצים בטבע - אלה הנמנים על קבוצת האפלטוקסינים הם המסוכנים ביותר מחמת היותם מסרטיני כבד. עדויות נסיבתיות רבות מצביעות על מעורבותם של מיקוטוקסינים כגורמי תחלואה בבני אדם ובעיקר תועדו מקרים המצביעים על קשר ישיר ברור בין צריכת מזון מאולח באפלטוקסינים ושיעור מקרי סרטן כבד באוכלוסייה (Gourama and Bullerman, 1995).

1.3 אפלטוקסינים

1.3.1 פטריות אפלטוקסיגניות

אפלטוקסינים מיוצרים על ידי מיני פטריות השייכות לקבוצת ה-*A. flavus*: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* וגורמים נזקים לכבד ואף להופעת גידולים סרטניים (Betina, 1989; Bressac et al., 1991; Bullerman, 1979; Zhang et al., 1997). לאחרונה בודדו גזעים אפלטוקסיגניים של הפטריה *A. tamaritii* משדות תה ביפן. מבין המינים יוצרי האפלטוקסינים, *A. parasiticus* ו-*A. nomius* יוצרים ארבעה אפלטוקסינים G_1 , B_1 , B_2 ו- G_2 ואילו *A. flavus* ו-*A. tamaritii* יוצרים AFB_1 ו- AFB_2 . הפטריות הנ"ל יוצרות מיקוטוקסינים נוספים מלבד אפלטוקסינים (Goto et al., 1996, 1997). *A. flavus* ו-*A. parasiticus* נפוצים

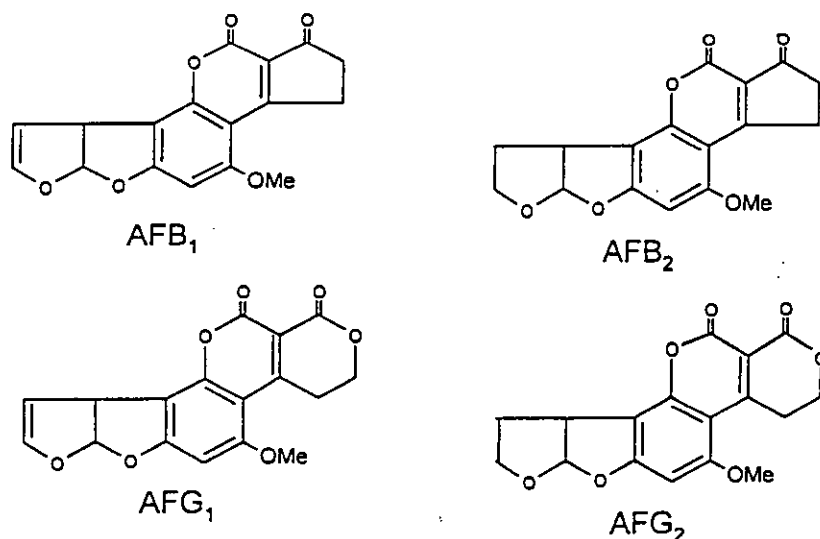
ביותר בטבע בסוגים שונים של גרעינים: תירס, אגוזי אדמה, חיטה, סויה, סורגום ועוד ובמוצרי מזון מוגמרים.

כל המוצרים עליהם מתפתחות פטריות אפלטוקסיגניות הוכחו כמצעים נוחים ליצירת אפלטוקסינים ולפיכך תפוצתם בטבע של האפלטוקסינים היא רבה ביותר. ראוי לציין כי אפלטוקסינים נמצאו גם בפירות ותאנים יבשות, צימוקים ומוצרים שהוכנו מהם ריבות ומיצי פרי הדר.

1.3.2 אפלטוקסינים

אפלטוקסינים התגלו לראשונה בשנת 1960 לאחר התפרצות מגיפה באנגליה שנודעה בשם "Turkey-X-disease". במגיפה זו מתו אלפי תרנגולי הודו לאחר שצרכו במזונם בוטנים מזהמים בפטריה *Aspergillus flavus* באנליזה כימית של הגרעינים גילו סדרת תרכובות טוקסיות. תרכובות אלה נקראו אפלטוקסינים (aflatoxins) - *Aspergillus flavus toxins* (Gourama and Bullerman, 1995).

האפלטוקסינים הם קבוצה של תרכובות הטרוציקליות מחומצנות (איור 1.3.2) אותה ניתן לחלק לשתי תת קבוצות עיקריות: B ו-G. בחלב של יונקים שצרכו מזון נגוע באפלטוקסין B₁ ניתן למצוא אפלטוקסין נוסף - M₁ (Pohland and Wood, 1987). החלוקה לקבוצות נעשתה על פי הצבע הפלואורסנטי בו הם זוהרים באור U.V.: אפלטוקסינים מקבוצה B זוהרים באור כחול ואילו אפלטוקסינים מקבוצה G בירוק. קיימים ארבעה אפלטוקסינים עיקריים: B₁, B₂, G₁ ו-G₂.



איור 1.3.2: המבנה הכימי של האפלטוקסינים B₁, B₂, G₁ ו-G₂ (מתוך: Gourama and Bullerman, 1995).

1.3.3 גורמים המשפיעים על יצירת אפלטוקסינים

יצירת אפלטוקסינים נגרמת כתוצאה משילוב של מין הפטריה, הסובסטרט והסביבה. הגורמים המשפיעים על ייצור הרעלן נחלקים לשלוש קטגוריות: פיזיקליים, תזונתיים וביולוגיים. גורם נוסף הוא משך גידול הפטריה. גורמים פיזיקליים כוללים טמפרטורה, pH, לחות יחסית, אור, אווירה ורמת גזים אטמוספריים. כך לדוגמה במצע מזון נוזלי טמפרטורת האופטימום ליצירת אפלטוקסין ב-*A. flavus* היא 25°C , בעוד שב-*A. parasiticus* טמפרטורת האופטימום נעה בין $25-35^{\circ}\text{C}$, ותנאי pH נמוכים מ-6 גורמים ליצירה מוגברת של AFB_1 ו- AFB_2 , בעוד שב- $\text{pH} > 6$ מיוצרים יותר AFG_1 ו- AFG_2 (Gourama and Bulleman, 1995). חשוב לזכור כי לא כל תבדידי המינים המוזכרים יוצרים אפלטוקסינים, וגם אלה היוצאים אפלטוקסינים לא עושים זאת בכל תנאי הגידול. לעומת זאת יתכן מצב בו נמצאים רעלנים גם זמן רב לאחר העלמות הפטריה (Lacey and Magan, 1991).

1.3.4 השפעות טוקסיות של אפלטוקסינים

אפלטוקסינים גורמים לפגיעות באיברים שונים בבע"ח. חומרת הפגיעה משתנה בהתאם לבע"ח, רמת הטוקסין שנצרכה וזמן החשיפה. מעלי גירה עמידים לאפלטוקסינים יחסית לחיות משק אחרות, אך גם בהם מופיעים הנזקים הנפוצים הנגרמים מהרעלת אפלטוקסינים: שטפי דם בצינורות המרה ופגיעה בכליות, בריאות, בבלוטות הפרשה פנימיות ובעור (Bulleman, 1979; Moreau and Moss, 1979). אתר הפגיעה העיקרי הוא הכבד: אכילת כמויות גדולות של אפלטוקסינים גורמת לשטפי דם, נרקוזות, ירידה בכמות ויטמין A, הצטברות שומן בכבד והגדלתו. צריכה ממושכת של כמויות קטנות של אפלטוקסינים גורמת ליצירת גידולים סרטניים. הכמויות הדרושות לגרימת סרטן קטנות ביותר לדוגמה 0.1 ppm/kg body בעכברים (Moreau and Moss, 1979).

1.3.5 אפלטוקסינים כגורמי תחלואה באדם

במקרים רבים יוחסו הרעלות בבני אדם לאכילת מזון נגוע באפלטוקסינים או לשתיית חלב המכיל אפלטוקסין M_1 . הסימפטומים המאפיינים הרעלות אלה: הקאה, היפוגליקמיה, עוויתות, תרדמת ומוות. נתיחות שלאחר המוות גילו פגיעות בכבד, בכליות ובלב. שחמת הכבד היא מחלה הנגרמת לעתים קרובות כתוצאה מחשיפה לאפלטוקסינים. הסימפטומים המופיעים במחלות החשודות כנגרמות על ידי אפלטוקסינים באדם דומים מאוד לסימפטומים המופיעים בבע"ח שחלו במחלות כתוצאה מצריכת הרעלנים.

מבין המיקוטוקסינים, אלה הנמנים על קבוצת האפלטוקסינים הם המסוכנים ביותר, בשל רעילותם הגבוהה ונוכחותם הרבה בטבע. צריכה קבועה של הרעלנים עלולה לגרום להופעת חזות סרטן הכבד בבע"ח שונים. הוכחות נסיבתיות מוצקות מעידות על מעורבותם של אפלטוקסינים במקרי תחלואה בבני אדם, ובעיקר היותו מעורר סרטן כבד בבני אדם. בעבודות רבות הוכחו כי קיים קשר ישיר בין שכיחות סרטן הכבד באוכלוסיות (בעיקר במדינות מתפתחות) ושיעור

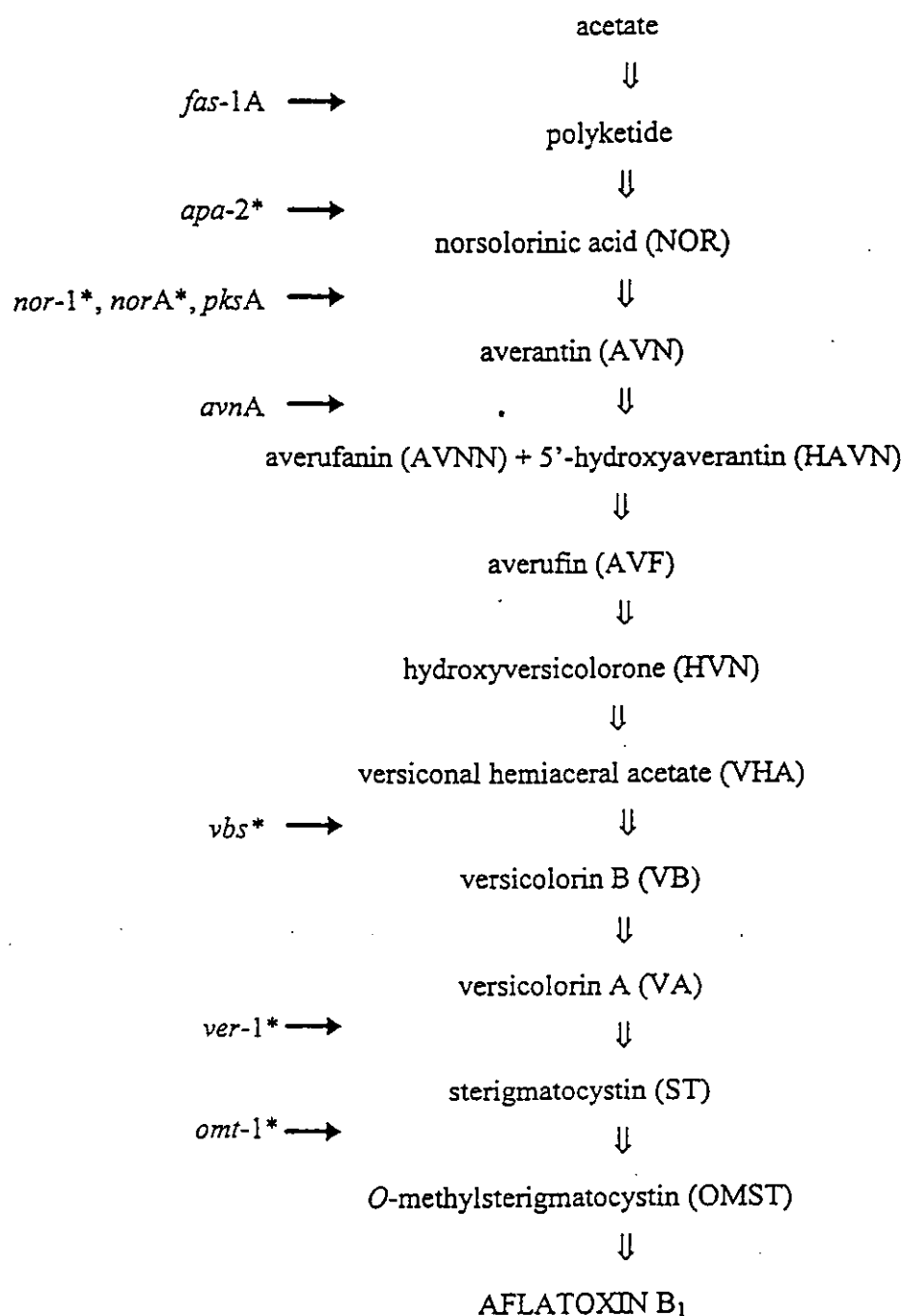
נוכחותם של אפלטוקסינים במזונות אשר נצרכו ע"י אוכלוסיות אלו (Sun and Chu, 1984; Kew, 1986). הכבד הוא אתר הפגיעה העיקרי של האפלטוקסינים כיוון שבכבד הרעלן עובר אקטיבציה על ידי אנזימי החמצון שבו (MFO-mixed function oxidase), ההופכים את התרכובות לאלקטרופיליות ולפעילות יותר, כך שהן מסוגלות להיקשר למקרומוולקולות (Palmgren and Hayes, 1987).

סרטן הנגרם בגלל צריכת אפלטוקסינים יכול להיגרם בגלל מספר סיבות: אפלטוקסינים גורמים למוטציות שונות החל בפגיעות בכרומוזומים שלמים וכלה במוטציות נקודתיות (בעיקר החלפת Guanine ל-Thymine ו-Guanine ל-Cytosine). נמצאה השפעה על גנים מבקרי גדילה כ-RAS ו-P53 (Bressac *et al.*, 1991; Hsu *et al.*, 1991). אפלטוקסינים גורמים לעיכוב שילוב חומצת האמינו ליזין בפוליפפטידים ומפחיתים משמעותית שילוב אצטט בתרכובות שומניות בכבד. קשירה קוולנטית של AFB₁ ל-DNA מונעת מתילציה וגורמת להפעלת אונקוגנים, לשינוי בדיפרנציאציה, ולשינוי בביטוי גנים. תאים בהם חלה קשירת AFB₁ ל-DNA עוברים טרנספורמציה והם בעלי פוטנציאל גבוה להפוך לתאים סרטניים (Kew, 1986).

לאחר מטבוליזם של אפלטוקסינים על ידי מערכת אנזימי החמצון בכבד נוצרים מטבוליטים רבים של אפלטוקסינים: O-demethylation של אפלטוקסין B₁ הופכת אותו ל-AFP₁ המצוי בשתן, חיזור של הטבעת המחומשת הטרמינלית הופכת את אפלטוקסין B₁ ל-aflatoxinol (AFL), aflatoxinol H₁ (AFHL₁) הוא מטבוליט נוסף של אפלטוקסין B₁ וכן גם dihydrodiol-AFB₁ ו-AFQ₁ (Palmgren and Hayes, 1987). מטבוליטים אלה מסוגלים לעכב תקשורת בין תאית ובכך לחסום אותות המבקרים גידול ודיפרנציאציה. תאים בהם נחסמו אותות אלה עלולים לשגשג ולהיות עמידים להרס ולמוות מתוכנן (apoptosis), המביאים ליצירת גידול סרטני (Sun and Chu, 1984; Kew, 1986).

1.3.6 ביוסינתזה של אפלטוקסינים

אפלטוקסינים הם מטבוליטים משניים המיוצרים במסלול הפוליקטידים (polyketide) (Bhatnagar *et al.*, 1993; Keller *et al.*, 1991; Cleveland and Bhatnagar, 1992; Yu *et al.*, 1993, 1995, 1997). בדומה לסינתזה של פוליקטידים אחרים, ביוסינתזה של אפלטוקסינים מתחילה בראקציה דחיסה של יחידות אצטט במנגנון אנלוגי לזה של יצירת חומצות שומן (Woloshuk *et al.*, 1995). מסלול הביוסינתזה של אפלטוקסין B₁ כפי שסוכם על ידי Yu *et al.* (1993, 1995, 1997) מפורט באיור 1.3.6.1.

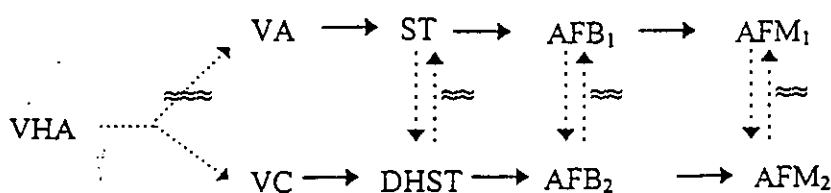


איור 1.3.6.1: מסלול הביוסיתזה של אפלטוקסין B₁ בפטריה *Aspergillus parasiticus* הגנים המקודדים לחלבונים המשתתפים במסלול מצויינים באותיות מוטות ובחץ המציין את השלב במסלול בו פועל החלבון המקודד על ידי הגן.

* גנים שבודדו ואופיינו גם בפטריה *A. flavus*

במסלול ביוסינתזה AFB₁ והבקרה עליו בפטריה *A. parasiticus* מעורבים לפחות 17 גנים המאורגנים בגנום כקבוצת גנים (gene cluster) בפרגמנט באורך של 75kb (Yu et al., 1997). מיקום הגנים וכיוון שיעתוקם זהה לזה של *A. flavus* קיים שוני בין שתי הפטריות במרחק בין הגנים השונים (Yu et al., 1995). חלק מהגנים בודדו ואופיינו: *fas-1A* (Mahanti et al., 1996) שמשותף בסינתזה של הפוליקטיד, *apa-2* (המכונה גם *aflR*) (Chang et al., 1993) האחראי למעבר מפוליקטיד ל-NOR ועל בקרת מסלול הביוסינתזה כולו, הגנים *nor-1* ו-*norA* המזרזים מעבר מ-NOR ל-AVN (Chang et al., 1992; Yu et al., 1997), הגן *pksA* שמאקטב יצירת השרשת הצדדים של NOR (Chang et al., 1995b), הגן *avnA* (המכונה גם *ord-1*) (Yu et al., 1997) המעורב במעבר מ-AVN ל-AVF, הגן *vbs* (Silva and Craig, 1996) המקטל מעבר מ-VHA ל-VB, הגן *ver-1* המזרז מעבר מ-VA ל-ST (Skory et al., 1992), הגן *omt-1* (המכונה גם *omt-A*) המזרז מעבר מ-ST ל-OMST (Yu et al., 1993).

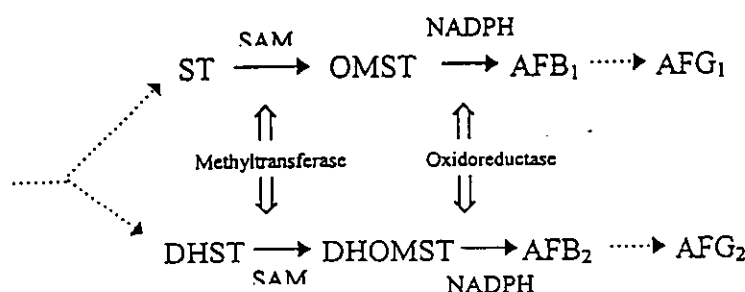
בפטריה *A. flavus* זוהה הגן *afl-2* האחראי על המעבר מפוליקטיד ל-NOR (Payne et al., 1993). ההומולוגיה בינו לבין הגן *apa-2* בפטריה *A. parasiticus* גדולה (מעל 96%), כך שהוחלט להתייחס לשני הגנים כאל גן יחיד ולכנותו *aflR* (Woloshuk et al., 1994; Chang et al., 1995a). הקשר בין מסלול הביוסינתזה של קבוצות AFG ו-AFB₁ שנוי במחלוקת. Maggon et al. (1977) דיווחו כי AFB₁ ו-AFB₂ יכולים להיווצר במסלולי ביוסינתזה בילתי תלויים. הם הציעו כי AFB₁ נוצר דרך VA ו-ST, ואילו חומרי הביניים בסיום מסלול יצירת AFB₂ הם versicolorin C (VC) ו-dihydrosterigmatocystin (DHST). מאוחר יותר Dutton et al. (1985) ראו תוצאות דומות במוטנט *A. flavus* SRRC141, המייצר AFB₂ בלבד. לטענתם למוטנט חסר אנזים המקטל את ראקציות המעבר מ-VHA ל-VA ומ-AFB₁ ל-AFB₂. מסקנותיהם מסוכמות באיור 3.1.6.2:



איור 3.1.6.2: השלבים האחרונים במסלול ביוסינתזה אפלטוקסין (Dutton et al., 1985; Maggon et al., 1977). החצים יכולים לייצג יותר משלב אחד במסלול; קווים מלאים מייצגים תגובות מוכחות; קווים מקווקים מייצגים תגובות משוערות; קווים גליים סומנו במקומות בהם קיים מחסום מטבולי במוטנט SRRC141 *A. flavus*.

בהמשך Cleveland et al. (1987) זיהו בפטריה *A. parasiticus* חומר ביניים ייחודי למסלול ביוסינתזה AFB₂ שאינו קיים במסלול יצירת AFB₁, HOMST. חומר זה דומה מאוד במבנהו

הכימי לחומר הביניים OMST הממוקם בין ST ל- AFB_1 במסלול הביוסינתזה, ומשערים כי תפקידו במסלול יצירת AFB_2 מקביל לזה של OMST במסלול יצירת AFB_1 . Yabe *et al.* (1988) בדומה לקודמיהם לא ראו מעבר בין AFB_1 ל- AFB_2 או בין AFG_1 ל- AFG_2 . לדעתם הפרקורסורים ליצירת AFB_2 הם DHST ו-dihydro-O-methyl-sterigmatocystin (DHOMST). חומרים אלה, שבודדו מ-*A. flavus*, הם נגזרות דיהידרו של ST ו-OMST. לטענתם ראקציות המעבר בין DHST ל- AFB_2 - AFG_2 מקוטלזות על ידי אותה מערכת אנזימתית שמקטלזת את המעבר מ-ST ל- AFG_1 - AFB_1 באופן בילתי תלוי כמתואר באיור 1.3.6.3. הקשר הביוסינתטי בין HOMST ל-DHST ול-DHOMST תרם הובר.



איור 1.3.6.3: השלבים האחרונים במסלול ביוסינתזה אפלטוקסין על פי Yabe *et al.* (1988). קווים מלאים מייצגים תגובות מוכחות; קווים מקוקקים מייצגים תגובות משוערות. במרכז האיור חצים המציינים את הראקציות אותן מקטלזים האנזימים ethyltransferase ו-Oxidoreductase.

בניגוד לנאמר עד כה, Biollaz *et al.* (1970) Maggon ו-Venkitasubramanian (1973) ו-Heathcote *et al.* (1976) דיווחו על הפיכת AFB_1 מסומן ל- AFB_2 ולאפלטוקסינים מקבוצת G. בכל אופן, הדעה הרווחת כיום בין מרבית החוקרים היא שאפלטוקסינים שונים נגזרים מ- AFB_1 (Gourama and Bullerman, 1995).

1.3.7 תבדיר *Aspergillus flavus* NRRL649 שאינו אפלטוקסיגני (ת.649) התבדיר *Aspergillus flavus* NRRL649 (להלן ת.649) חסר מקטע DNA בגודל של לפחות 120kb, המכיל את קבוצת הגנים (gene cluster) המשתתפים במסלול הביוסינתזה של אפלטוקסין. בתבדיר זה, בשונה ממוטנטים אחרים במסלול ביוסינתזה אפלטוקסין, המוטציה דומיננטית; דיפלואידים שמקורם בהכלאת תבדירים יוצרי אפלטוקסין עם התבדיר *A. flavus* NRRL649 אינם אפלטוקסיגניים. המנגנון שגורם למוטציה להיות דומיננטית אינו ידוע. ניתן בעזרת תבדיר זה לזהות ולבודד גנים מעורבים בביוסינתזה אפלטוקסינים תוך שימוש בטכניקת ה-"genetic complementation" (Prieto *et al.*, 1996; Woloshuk *et al.*, 1995).

1.4 שיטות לאבחון אפלטוקסינים במזון

הנזקים הרבים והסכנות הטמונות בצריכת אפלטוקסינים גרמו להטלת הגבלות חמורות בעולם בכל הקשור לרמה המקסימלית המותרת במזון (Pohland and Wood, 1987). השיטות לזיהוי מיקוטוקסינים נחלקות לשלוש קבוצות:

- שיטות כימיות
- שיטות ביולוגיות
- שיטות אימונולוגיות

שיטות כימיות: הזיהוי נעשה בעזרת שיטות כרומטוגרפיה שונות המבוססות על ניקוי הדוגמא מחומרים נלווים והפרדת המיקוטוקסין (Moreau and Moss, 1979). שיטות כרומטוגרפיה המקובלות כיום: גז כרומטוגרפיה (GC), כרומטוגרפיה נוזלית בלחץ גבוה (HPLC), גז כרומטוגרפיה עם ספקטרוגרף מסות (MS-GC) וכרומטוגרפיה על רובד דק (TLC). שיטות ביולוגיות: בשיטות אלה משתמשים באורגניזמים, ברקמות או בבע"ח רגישים לאפלטוקסינים (Moreau and Moss, 1979; Betina, 1989):

א. מיקרואורגניזמים: *Bacillus subtilis*, חיידקי חומצת חלב (Burnmeister and Hesseltime, 1966).

ב. צמחים - האצה החד תאית *Chlorella*, חרדל ותירס (Schoental and White, 1965).

ג. תרביות רקמה: תאי כליה או כבד של עגל (Juhász and Gréczi, 1964).

ד. חסרי חוליות: חרקים, ביצי רכיכות וסרטניות (Harwig and Scott, 1971).

ה. בעלי חוליות: ראשנים וברוזונים.

שיטות אימונולוגיות: כיום מיוצרות ערכות גילוי למיקוטוקסינים המבוססות על נוגדנים מונוקלונליים אשר הושרו כנגד מיקוטוקסינים ספציפיים. את שיטות הבדיקה ניתן לחלק לשתיים: ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ועמודת זיקה (affinity chromatography).

שיטות אלה מאפשרות בדיקה של דוגמאות רבות ומספקות מענה לשאלות 'האם קיימים מיקוטוקסינים בדוגמת המזון?' ואם כן, 'כמה?' (Lee and Morgan, 1993).

השוואה בין השיטות השונות מלמדת כי לכל תחום שיטות היתרונות והחסרונות שלו בקטגוריות של מהירות המבחן, המיומנות הדרושה מהאדם המבצע את הבדיקה, דיוק הבדיקה והדיוק בבדיקות חוזרות, ספציפיות הבדיקה וכמובן עלותה והכרת הגורמים הרשמיים כגון משרדי בריאות וחקלאות. כיום מוכרות בכל העולם השיטות הכימיות לבדיקת מיקוטוקסינים במזון והשיטות האימונולוגיות צוברות הכרה. השיטות הביולוגיות אינן מוכרות על ידי גורמים רשמיים בגלל חוסר הדיוק שלהן וחוסר היכולת לחזור על התוצאות במדויק. לשיטות האימונולוגיות יתרונות על פני השיטות הכימיות - עלותן נמוכה בהרבה מעלות הבדיקות הכימיות וגם המיומנות הנדרשת בהפעלת הבדיקה קטנה בהרבה.

1.5 שיטות לגילוי וזיהוי עובשים בגרעינים ובמזון

ברחבי העולם הולכת ומתעצמת כיום הדרישה להגביר את הפיקוח על איכות תוצרת חקלאית ומזון. הסטנדרטים המוצבים כוללים דרישה לספירת עובשים בחלק מהמוצרים, אולם עקב העדר שיטה אמינה, זולה ומהירה לא ניתן לעמוד כיום בדרישות אלה. ניתן לבדוק את המזון או את חומרי הגלם, הידועים כנתקפים על ידי עובשים יוצרי מיקוטוקסינים מסוימים, לנוכחות אותם מיקוטוקסינים, אך העובשים *Penicillium*, *Fusarium* ו-*Aspergillus* נפוצים מאוד ויוצרים מיקוטוקסינים רבים. זיהוי מדויק של כל התרכובות הרעילות המופרשות על ידי הפטריות אינו בר בצוע ועלות הבדיקות גבוהה ביותר. לעומת זאת, שיטות המאפשרות את זיהוי העובשים במזון עשויות לתרום להערכת הסכנה האפשרית של זיהום ברעלנים, ולתרום להפחתת מספר הבדיקות הדרוש לגילוי נוכחות המיקוטוקסינים הנוצרים על ידי אותו מין שנתגלה בדוגמת המזון המאולחת (De Ruiter *et al*, 1993). קיימות שיטות שונות לבחינת נוכחות עובשים במזון ואלה מחולקות לארבע קטגוריות עיקריות:

- שיטות ישירות
- שיטות עקיפות
- שיטות אימונולוגיות
- שיטות מולקולריות

שיטות ישירות: שיטות אלה כוללות זריעה ישירה של גרעינים על מצע מזון או זריעת בידוד (מיהולים) יתרונות: קלות הבצוע וקבלת אינדיקציה ראשונית על סוגי הפטריות בדוגמא (זריעה ישירה), בידוד מושבות בודדות לשם הגדרת המינים והערכה כמותית של כל מין (זריעת בידוד). חסרונות: (1) אינן מדויקות; מינים תחרותיים עלולים לעכב מינים אחרים, מינים "מהירים" עלולים להתפתח לפני מינים "איטיים" יותר כך שחתך אוכלוסיית הפטריות המתקבל לא משקף את האוכלוסייה האמיתית המצויה בגרעינים, טעויות הנובעות משלבי העבודה השונים. בנוסף, לא ניתן לדעת האם התבדד יוצר מיקוטוקסינים ויש צורך בבדיקות נוספות. (2) ביצוע הבדיקה אורך מספר ימים. (3) עלות גבוהה. (4) נדרשת מיומנות גבוהה לביצוע הבדיקות (Jarvis *et al*, 1983; Clarke, 1968; Lacey and Magan, 1991).

שיטות עקיפות: שיטות המתבססות על מדד הקשור להתפתחות הפטריה או לנוכחותה. בין השיטות העקיפות נמנות מדידת קצב פליטת CO_2 , זיהוי מטבוליטים נדיפים או כאלה המצויים במצע הגידול, מדידת ATP וקביעת כמות כיטין וארגוסטרול (שניהם מרכיבי דופן פטריות). חסרונות: (1) חוסר ספציפיות לפטריות בלבד (כיטין, לדוגמא, נמצא בשלד חרקים). (2) אינן מאפשרות זיהוי איכותי - סווג עד לרמת המין הבודד (3) אינן יכולות לשמש כמדד כמותי. (4) עלולות להעיד על ביומסה כללית של הפטריה לעומת אינוקולום וגסטיבי בלבד. (5) חלקן מתבסס על חילוף חומרים של הפטריה כך שבשלב בה כמותה בצובר נמוכה או כאשר האינוקולום צעיר, אין פעילות. (6) המכשור יקר. (7) נדרשת מיומנות גבוהה לביצוע הבדיקות (Jarvis *et al*, 1983; Lacey *et al*, 1980; Lacey and Magan, 1991; Gourama and Bullerman, 1995).

1.6 גישות חדשות להערכת אוכלוסיית פטריות בגרעינים מאוסמים ובמזון

1.6.1 שיטות אימונולוגיות

בשל החסרונות הרבים של השיטות הקונבנציונליות לזיהוי עובשים במזון (השיטות הישירות והעקיפות), קיים חיפוש מתמיד אחר שיטות חדשות, אמינות, מהירות וזולות יותר. שיטות אימונולוגיות העושות שימוש בנוגדנים פותחו והפכו מקובלות מאוד בעשרים השנים האחרונות (Joisson *et al.*, 1992). שיטת ה-ELISA ושיטות אימונולוגיות נוספות פותחו כך שתתאמה לבדיקת נוכחות פטריות פתוגניות במזון (Clarke *et al.*, 1986). הנוגדנים, המהווים את הבסיס לשיטות האימונולוגיות השונות, מושרים כנגד התפטיר או כנגד מטבוליטים הנוצרים במהלך גידול הפטריה (Notermans and Kamphuis, 1992; Kamphuis and Notermans, 1992; Banks *et al.*, 1992; De Ruiter *et al.*, 1992). ממצאיהם של מחקרים רבים הראו התאמה טובה בין התוצאות המתקבלות בשיטות האימונולוגיות לבין התוצאות שנצפו בשיטות הקונבנציונליות (Dewey *et al.*, 1989; Karman and Samson, 1992; Shapira *et al.*, 1997; Notermans and Kamphuis, 1992).

1.6.2 שיטות מולקולריות

למרות היתרונות הרבים של השיטות האימונולוגיות, הן עדיין לוקות בחסרון גדול - על מנת לגלות נוכחות פטריה כלשהי, על הפטריה להגיע לשלב התפתחות מסוים (בד"כ קורים). חלק מהשיטות אף מבוסס על מטבוליטים של הפטריה, כאשר לא ידוע אם הם מופרשים בכל מצע ובכל תנאי גידול. שיטות מולקולריות המנצלות חומצות גרעין כגלאים מתגברות על בעיה זו כיוון ש-DNA ימצא בכל שלב משלבי התפתחות הפטריה. כיום נעשה שימוש בשיטות מולקולריות במחקר, ברפואה (זיהוי מוקדם של מחלות תורשתיות) ובחקירות משטרתיות (Walsh *et al.*, 1991). רצפי DNA (probes) משמשים לגילוי רצף מסוים של DNA, וכך לזיהוי נוכחות אורגניזם מסוים המכיל רצף זה. הזיהוי מתבסס על היברידיזציה רצף ה-DNA הנתון לקטעי DNA או RNA של הפתוגן. השיטות הנפוצות לזיהוי פתוגנים הן colony hybridization (Romick *et al.*, 1989; Notermans *et al.*, 1988) RFLP-restriction fragment length polymorphism (Mes *et al.*, 1994; Coddington *et al.*, 1994) dot blot (Fitts, 1985) ו-Klinger *et al.*, 1988). השיטות המולקולריות מדויקות ומהירות מהשיטות הקונבנציונליות ומשמשות גם לזיהוי איכותי ולקביעת כמות פתוגנים הומניים שמקורם במזון כגון: *Staphylococcus* spp. (Notermans *et al.*, 1988) *Vibrio cholerae* (Koch *et al.*, 1993) *Listeria* spp. (Klinger *et al.*, 1988) בשיטת ה-PCR (Polymerase Chain Reaction) מסונתז קטע DNA ספציפי מתוך כלל ה-DNA המצוי בדוגמא ומוגבר במאות אלפי מונים, בעזרת סינתזה אנזימטית המתרחשת במבחנה (Amheim and Erlich, 1992; Erlich *et al.*, 1991; Saiki *et al.*, 1988). ל-PCR יתרונות לעומת השיטות הקונבנציונליות: ברוב המקרים אין צורך

בהעשרה של האורגניזם ובגידולו בתרבית לפני האבחון בשיטה כיוון ששיטה זו רגישה ביותר ומסוגלת לזהות, תאורטית, גם מולקולה יחידה של DNA הנמצאת בתערובת עם מולקולות רבות שונות (Henson and French, 1993). PCR היא שיטה מהירה ויעילה. השימוש בשיטה אינו מצריך הפקה מסובכת של DNA וניקיון. ניתן ליצור תחלים ספציפיים ולזהות את קטע ה-DNA הרצוי גם בתוך דוגמא. במקרים רבים אף אין צורך למצות את ה-DNA מהתא ולנקותו, וניתן להשתמש בליזאט גולמי של תאים כדוגמא ל-PCR (Henson and Arnheim and Erlich, 1992; French, 1993; Steffan and Atlas, 1991; Shapira *et al.*, 1996). חסרונותיה של השיטה הם רגישות לזיהומים ותגובה חיובית גם בנוכחות פטריות שאיבדו את חיותן. למרות זאת, המצאות שרידי הפטריות במזון עלולה לרמז על המצאות נבגים או על נוכחות רעלנים שיוצרו על ידי הפטריה. בהשוואה לשיטות המקובלות להערכת עובשים במזון האורכות מספר ימים, דרוש יום אחד בלבד לגילוי העובשים בשיטת ה-PCR. כיום משמשת שיטת ה-PCR לבדיקת נוכחות פתוגנים בצמחים ובקביעת הבדלים בין פתוגנים קרובים כגון: *Fusarium poae* (Perry *et al.*, 1996), *F. moniliforme* (Blakemore *et al.*, 1994). לאחרונה דווח על שימוש ב-PCR לזיהוי נוכחות פטריות אפלטוקסיגניות במודלים של מערכות מזון כגון תאנים (Geisen, 1997) וגרעיני תירס (Shapira *et al.*, 1996).

בשנים האחרונות פותחו דרכים להגברת רגישותה של שיטת ה-PCR. אחת הדרכים היא immuno-PCR בה תצמיד כימרי בין streptavidin ו-protein A בעל זיקה לביוטין ולאיימונוגלובולין G משמש לקישור ה-DNA המסומן בביוטין באופן ספציפי לתצמיד אנטיגן-נוגדן מונוקלונלי ספציפי שקובע לבארות צלחת microtiter. קטע מה-DNA המוכפל בעזרת מחזורי PCR מסומן תוך שימוש בתחלים שבקצוותיהם ביוטין הנקשר לתצמיד (Sano *et al.*, 1992). דרך נוספת להגברת רגישות ה-PCR היא שימוש בתחלים פנימיים (nested primers). תחלים אלה משלימים רצפים הנמצאים בתוך הקטע המוגדר על ידי התחלים הראשונים, כך רק גדילים המכילים מקטע זה, ישוכפלו ובכך ספציפיות הראקציה תוגבר ותמנע הופעת תוצרים שגויים (Kapperud *et al.*, 1993). Bio-PCR גם היא דרך להגברת רגישות ה-PCR ולמניעת קבלת תוצרי לוואי. בשיטה זו מבוצעת תחילה "הגברה ביולוגית" של ה-DNA על ידי הדגרת התא (חיידק) על מצע מזון המעודד התפתחות, ורק אחר כך מבוצע PCR על DNA שמוצה מתרבית התאים. שיטת Bio-PCR מגדילה את הסיכוי לזהות פתוגן בדוגמא שהודגרה ומקטינה את הסיכוי לזהות תאים מתים או DNA חופשי (Schaad *et al.*, 1995). בהשוואה לשיטות המקובלות להערכת עובשים במזון האורכות מספר ימים, דרושים יום או במקרים מיוחדים יומיים בשיטת ה-PCR.

2. שיטות וחומרים

2.1 חומרים

2.1.1 רשימת קיצורים

Ac.A - Acetic acid
ACP - Antigen coated plate
AF - aflatoxin
Bis - N,N'-methylene-bis-acrylamide
bp - Base pairs
BSA - Bovine serum albumine
cDNA - complementary DNA strand
DAS - Double antibody sandwich
ddH₂O - Double distilled water
DNA - Deoxyribonucleic acid
dNTPs - deoxy-nucleotides-tri-phosphate
DEPC - diethylpyrocarbonate
EDTA - Ethylenediamine tetra acetic acid
ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay
IPTG - Isopropylthio- β -D-galactoside
GST - Glutathione-S-transferase
kb - Kilobase
LB - Luria-Bertani
LBA - Luria-Bertani agar
mAb - monoclonal antibodies
MeOH - Methanol
O.D. - Optical density
pAb - Polyclonal antibodies
PBS - Phosphate buffered saline
PCR - Polymerase chain reaction
PDA - Potato dextrose agar
PDB - Potato dextrose broth
PEG - Polyethylene glycol
ppm - Parts per million
RNA - Ribonucleic acid
rpm - Rounds per minute
RT-PCR - Reverse transcription - Polymerase chain reaction

SDS - Sodium deodecyl sulfate
TAE - Tris-Acetic acid-EDTA buffer
TE - Tris-EDTA buffer
TEMED - N, N, N', N' - Tetramethylenediamine
TLC - Thin layer chromatography
TLE - Tris-LiCl-EDTA buffer
Tris - (hydroxymethyl) aminomethane
U.V. - Ultraviolet

2.1.2 כתובות החברות:

חברת ביוטכנולוגיה - פארק תעשיות המדע, נס-ציונה, ישראל.

Anilab - Anilab, Rehovot, Israel.
BDH - BDH Chemicals Ltd. Poole, England.
Bio-Rad - Bio-Rad Laboratories. Hercules, CA, USA.
Boehringer - Boehringer Mannheim Biochemica. Mannheim, Germany.
Difco - Difco laboratories. Detroit, USA.
DuPont - DuPont. MA, USA.
Frutarom - Frutarom Ltd. Haifa, Israel.
Genomed - Genomed. NC, USA.
Hettich - Hettich. Tuttlingen, Germany.
Heto - Heto. Allerod, Denmark.
IBI - IBI/Kodak. New Haven, CT, USA.
Kinematica - Kinematica. Littau, Switzerland.
Merck - E. Merck. Darmstadt, Denmark.
Pharmacia - Pharmacia. Piscataway, NJ, USA.
Promega - Promega. Madison, WI, USA.
Qiagen - Qiagen. Chatsworh, CA, USA.
* Sigma - Sigma chemical Crop. USA.
Stratagene - Stratagene, LA Jolla, CA, USA.

* חומרים בהם שם היצרן אינו מצויין נקנו מ-Sigma.

אבקות ותמיסות אורגניותBDH

SDS

Bio-Lab

Phenol

Bio-Rad

Acrylamide

Ammonium persulfate

Bis

TEMED

Triton x-100

Tween 80

Difco

Bacto agar

Bacto peptone

Bacto tryptone

PDB (24 gr/l)

Yeast extract

Frutarom

Acetic acid

Chloroform

Hydrochloric acid

Methyl alcohol

IBI

Agarose

Tris base

Merck

TLC plates (art. 5554)

2-propanol

Ethyl alcohol

Glycine

Isoamyl alcohol

אנזימים ויצרנים:.Promega - אנזימי רסטריקציה.האנזימים AMV Reverse transcriptase ו-T7 DNA Polymerase - משמשים ב-RT-PCR,

.Promega

תצמיד של האנזים alkaline phsphatase עם נוגדן goat anti rabbit - מוסף לתמיסת הראקציה

של Sigma, ELISA.

.Boehringer - Taq DNA polymerase.Boehringer - Proteinase K.Promega - Rnase ONE™.Promega - RQ1 Rnase-free Dnase.Boehringer - T4 ligase

בופרים:

בופר ליזיס להפקת DNA - 150 mM EDTA, 50 mM Tris, 1% N-Lauroyl-sarkosine
בופר ל-PCR - 10 mM Tris-HCl pH 9, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$,
0.1% Triton x-100, 0.2 mg/ml BSA or gelatin
בופר ל-RT-PCR - סופק ע"י חברת Promega
בופר TA לחיתוך DNA - 33 mM Tris-acetate, 65 mM K-acetate, 10 mM Mg-acetate,
0.5 mM DTT, 4 mM spermadine
40 mM Tris-acetate, - 1x TAE (Tris-acetate-EDTA) pH 8 להפרדת DNA בג'ל אגרוז -
1 mM EDTA pH 8
בופר TE (Tris-EDTA) להמסת DNA - 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8
בופר קרבונט (coating buffer 0.03M pH 9.6) לראקצית ELISA - 1.59 gr $NaCO_3$,
2.3 gr $NaHCO_3$, 0.2 gr NaN_3 הומסו בליטר ddH₂O. התמיסה טוטה ל-pH 9.6 ב-HCl.
50% Glycerol in H₂O, 0.42% Xylene cyanole - ("Blue juice") 10x DNA sample buffer
0.42% Bromophenol blue
0.4 ml 2- β -mercaptoethanol, - 5x Protein sample buffer להמסה והטענת חלבונים על ג'ל -
1 ml 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.8 ml Glycerol, 1.6 ml 10% (w/v) SDS, 4 ml H₂O,
0.2 ml 0.05% (w/v) Bromophenol blue
ddH₂O. PBS - 8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 1.44 gr Na_2HPO_4 , 0.24 gr KH_2PO_4 הומסו בליטר
התמיסה טוטה ל-pH 7.2 ב-HCl ועוקרה באוטוקלאב.
50% Glycerol in H₂O, 0.42% Bromophenol blue, 0.42% - 10x RNA sample buffer
Xylene cyanole
0.18 M Tris, 0.09 M LiCl, 4.5 mM EDTA, - RNA grinding buffer להפקת RNA -
1% (w/v) SDS
0.18 M Tris, 0.09 M LiCl, 4.5 mM EDTA - TLE
Promega - AmV/T/I 5x reaction buffer
10 mM MgCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0 : 10x Dnase buffer

תמיסות

אתר יבש - לאחר הוסף $CaCl_2$ בעודף.
מים מטופלים ב-DEPC לעבודה עם RNA - 0.1% (w/v) DEPC הוסף ל-ddH₂O. התמיסה
הודגרה במשך 16 שעות ב-37°C ולאחר מכן עוקרה באוטוקלאב.
תמיסת אבקת חלב-PBS - 10 ml PBS 10x, 1 gr אבקת חלב רזה, 90 ml מים.

תמיסת blocking לאנליזה western blot - תמיסת אבקת חלב-PBS + Tween 0.5%.
תמיסת אמפיצילין - ampicillin הומס במים לריכוז 50 mg/ml ועוקר במסנן סטרילי μ 0.22.
פנול לעבודה עם DNA - הכנה: הפנול הותך ב-65°C והובא לשיווי משקל עם בופר 100mM Tris-HCl pH 8. לפנול הוסף 8-hydroxyquinoline בריכוז סופי של 0.1%.
פנול לעבודה עם RNA - הכנה: הפנול הותך ב-65°C והובא לשיווי משקל עם בופר TLE.
פנול-כלורופורם-איזואמיל אלכוהול - התערובת הוכנה ביחסים 1:24:24.
תמיסת ראקציה ל-ELISA - 6.6 mg paranitrophenol, diethyl amine pH 9.8 11 ml.
תמיסת המסה לאפלטוקסין - בנזן + 2% אצטוניטריל.
תמיסת הרצה לאפלטוקסין - 90% כלורופורם + 10% מתנול.
Coomassie blue stain לצביעת חלבונים - 0.1% coomassie blue R-250, 40% MeOH, 10% Ac.A.
destaining solution להורדת עודפי צבע מג'ל אקרילאמיד צבוע - 40% MeOH, 10% Ac.A.
 * תמיסות לעבודה עם RNA הוכנו עם ddH₂O שטופלו ב-DEPC.

שוניות:

תחלים - סונתזו לפי רצף נתון בחברת ביוטכנולוגיה כללית.
dNTP's - כל אחד בריכוז 10 mM, Promega.
100 mM IPTG - הכנה: 2 gr אבקת IPTG הומסה ב-8 ml ddH₂O והנפח הושלם ל-10 ml עם ddH₂O, Boehringer.
Jetsorb - ערכה למיצוי DNA מג'ל אגרוז, Genomed.
Plasmid maxi kit - להפקת DNA פלסמידי בכמות גדולה, Qiagen.
QIAprep-spin - להפקת DNA פלסמידי בכמות קטנה, Qiagen.
Incomplete Freund's adjuvant - לשימוש בהזרקת אימונוגן לארנבות, Difco.
[¹²⁵I]-protein A - לזיהוי באנליזה ה-western blot (100 μ ci), Sigma.

מצעי גידול לחיידקים ולפטטריות:

PDB - potato dextrose broth 2.4% PDB במים, Difco.
PDA - potato dextrose agar. בנוסף למרכיבי ה-PDB מכיל 2% אגר, Difco.
LB - Luria Bertani. 1% NaCl, 0.5% Bacto yeast extract, 1% Bacto tryptone, Difco.
LBA - Luria Bertani agar. בנוסף למרכיבי ה-LB מכיל 2% אגר, Difco.

מצע מינימלי מוגדר [ע"פ Adve ו-Mateles (1964)] - 1 ליטר מצע מכיל: 50 gr גלוקוז, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.7 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 gr, $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 10 gr, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 gr, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.3 mg, $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0.5 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 17.6 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.11 mg.

מצע תירס - 1 ליטר מצע מכיל: 200 gr תירס גרוס מעוקר בקרינת גמא, 20 gr אגר.

2.1.4 חומר ביולוגי

<i>Escherichia coli</i> JM109	Promega
<i>Aspergillus parasiticus</i>	NRRL 5862
<i>A. flavus</i>	CBS 121.62
<i>A. flavus</i>	NRRL 649
<i>A. tamarii</i>	NRRL 25517

2.2 שיטות

2.2.1 הפקת DNA

2.2.1.1 שיטות להפקת DNA

הפטירות גודלו במצע PDB נוזלי במשך 5 ימים, נאספו על ידי סינון דרך מספר שכבות בד גאזה והוקפאו ב- -20°C . 1 gr תפטיר קפוא נכתש בעלי ומכתש בחנקן נוזלי עד קבלת אבקה דקה. האבקה הועברה למבחנת פוליסטירן בנפח 50 ml. 7 ml בופר ליזיס ו- $10 \mu\text{l}$ Rnase ONETM (90 units) הוספו, והתערובת הודגרה ב- 37°C למשך 30 דקות תוך טילטול עדין בכל 10 דקות במהלך ההדגרה. לאחר ההדגרה הוספו לתערובת (40 units) 2 mg proteinase K והדגרה נוספת נערכה ב- 50°C למשך שעה אחת באינקובטור מטלטל אופקי 14 maxi (Hybaid). תערובת פנוול-כלורופורם הוספה בנפח זהה לנפח הנוזל וסורכזה בצנטריפוגה שולחנית swinging bucket (Hettich), במשך 15 דקות במהירות 3,500 rpm. הפאזה העליונה נאספה, עברה מיצוי נוסף בתערובת פנוול-כלורופורם והנוזל העליון הועבר למבחנת זכוכית (Corex) בנפח 30 ml. השקעת DNA בוצעה על ידי הוספת עשירית מנפח הנוזל pH 5 Na acetate, ונפח זהה של איזופרופנוול. המבחנה כוסתה בפרפילם, הנוזל עורבב על ידי הפיכתה והודגר בקרח למשך שעה. המבחנה סורכזה בצנטריפוגה (DuPont) Sorvall במהירות 10,000 rpm במשך 20 דקות. הנוזל העליון נשפה והמשקע יובש באויר. ה-DNA נשטף על ידי הוספת 5 ml אתנול 70% וסירכוז המבחנה במהירות 10,000 rpm במשך 10 דקות. הנוזל העליון נשפה והמשקע יובש באויר ולאחר מכן ב-Heto speedvac. המשקע הומס ב- $200 \mu\text{l}$ ddH₂O וכמות ה-DNA נקבעה באורך גל תמ 260 (סעיף 1.2)

2.2.1.2 קביעה כמותית של DNA

כמות ה-DNA נקבעה בספקטרופוטומטר (Pharmacia) GeneQuant לפי עוצמת הבליעה באורך גל 260nm. בליעה של $O.D.=1$ מייצגת ריכוז DNA של $50\mu\text{g}/\mu\text{l}$. הבדיקה אומתה על ידי הרצת דוגמת DNA בגל אגרוז מול סטנדרט במשקל ידוע. עוצמת הפלורסנציה השווהה לאחר הארה במנורת U.V.

2.2.2 הכנת תחלים לראקציית PCR

תחלים לראקציית PCR הוכנו בחברת ביוטכנולוגיה כללית לפי הרצפים של הגנים *apa-2*, *ver-1*, *nor-A* ו-*omt-1* שפורסמו על ידי Cary *et al.*, 1994, Skory *et al.*, 1992, Chang *et al.*, 1993 ו-Yu *et al.*, 1993. בהתאמה. רצפי התחלים מפורטים בטבלה 2.2.2.

2.2.3 אמפליפיקציה של קטע הגן בשיטת ה-PCR

מרכיבי הראקציה: DNA המשמש כתבנית $0.1-1\mu\text{g}$, $1\mu\text{g}$ מכל אחד מהתחלים, $10\mu\text{g}$ בופר Taq DNA Polymerase, נוקלאוטידים חופשיים (dNTP's) 1.25 mM מכל אחד והאנזים Taq DNA Polymerase (5 units). נפח הראקציה הושלם ב- ddH_2O ל- $100\mu\text{l}$. לכל ראקציה הוספו $50\mu\text{l}$ שמן מינרלי למניעת אידוי. תנאי הראקציה:

1. 10 דקות ב- 94°C לאחריון הוסף האנזים Taq DNA Polymerase.

2. 90 שניות ב- 94°C , 90 שניות ב- 65°C , 2 דקות ב- 72°C (40 מחזורי אמפליפיקציה).

3. 5 דקות ב- 72°C .

תוצרי הראקציה נבדקו בגל אגרוז (סעיף 2.2.4).

2.4 ג'ל אגרוז להפרדת מקטעי DNA

אגרוז בריכוז 1% (לבדיקת תוצרי PCR) או בריכוז 0.8% (להפרדת מקטעי DNA לשיבוט) הומס בבופר $1\times$ TAE על ידי הרתחה במיקרוגל. לאחר קירור התמיסה, אך לפני קרישתה, הוסף ethidium bromide בריכוז $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sambrook *et al.*, 1989). דגימות נמהלו ב-DNA sample buffer והדוגמאות הורצו במתח $80-100\text{ V}$.

טבלה 2.2.2: תחלים ששימשו ב-PCR.

שם התחל, הגן לפיו הוכן וכיוון הסינתזה, רצף התחל, מיקום הקטע בגן
וטמפרטורת ההתכה (T_m) מצויינים. אתרי חיתוך של אנזימי רסטריקציה
(מסומנים באות מעובה):

GGA TTC-EcoRI, *GGA TCC-BamHI*, *AGA TCT-BglIII**

כיווני התחלים מסומנים בחצים מתחת לשם הגן: → - forward, ← - reverse.

תחל	גן	רצף	מיקום בגן	T_m (°C)
1	<i>ver-1</i> →	5' AAC TGC AGA TCT ATG TCG GAT ATT CAC CGT TTA GAT GGC	496-522	74
2	<i>ver-1</i> ←	5' ATA TTG AAT TCG AAA AGC GCC ACC ATC CAC CCC	1369-1388	76
3	<i>omt-1</i> →	5' GGC CCG GTT CCT TGG CTC CTA AGC	208-231	80
4	<i>omt-1</i> ←	5' CGC CCC AGT GAG ACC CTT CCT CG	1209-1232	78
5	<i>nor-A</i> →	5' ATG GTT CTC CCT ACT GCT CCA GAG	831-854	61
6	<i>nor-A</i> ←	5' TTT TGA GGC AGA ACC AAA GTA CTT CGC	2027-2053	66
7	<i>apa-2</i> →	5' AAT TTT GGA TCC CTG AAT TCC TTC CTC ACC	413-437	73
8	<i>apa-2</i> ←	5' CTA TCA GAA TTC TCA GAA CAA GCT GTC GCG CAC TCG	1531-1567	74

* *BglIII* חותך כך שנשארים קצוות זהים לחיתוך ע"י *BamHI*.

2.2.5 הפקת RNA

2.2.5.1 הפקת RNA מפטריות

הפטריות גודלו על מצע PDB נוזלי או מצע מינימלי נוזלי מוגדר. משך הגידול היה 48, 60 או 72 שעות. בתום תקופת ההדגרה סונן התפטיר דרך מספר שכבות בד גאזה, הוקפא בחנקן נוזלי ונשמר ב- -80°C . 4 gr תפטיר קפוא נכתש בעלי ומכתש בחנקן נוזלי עד קבלת אבקה דקה. האבקה הועברה לכוס כימית בנפח 250 ml, שהכילה 38 ml RNA grinding buffer ו-12 ml פנול שעבר אקויליברציה עם TLE. התערובת הומגנה במכשיר polytron (Kinematica) במשך 3 דקות במהירות מקסימלית, הוספו 12 ml כלורופורם ושוב התערובת הומגנה. לאחר מכן הדוגמא חולקה לשתי מבחנות פוליסטירן 50 ml והודגרה ב- 50°C למשך 30 דקות תוך ערבוב במכשיר וורטקס בכל 10 דקות במהלך ההדגרה. לאחר ההדגרה הדוגמאות סורכזו בצנטריפוגה שולחנית swinging bucket (Hettich) במשך 20 דקות במהירות 4,900 rpm. הפאזה העליונה נאספה, עברה מיצוי בפנול שעבר אקויליברציה עם TLE, לאחריו מיצוי בכלורופורם, ושוב מיצוי בפנול עד אשר לא נראתה פאזה ביניים. הנוזל העליון הועבר למבחנת זכוכית (Corex) בנפח 30 ml. התמיסה הובאה לריכוז 2M LiCl. המבחנה כוסתה בפרפילם, הנוזל עורבב על ידי הפיכתה והודגר ב- 4°C למשך 16 שעות. המבחנה סורכזה בצנטריפוגה Sorvall (DuPont) במהירות 10,000 rpm במשך 20 דקות. המשקע הורחף בתמיסת 2M LiCl והודגר ב- 4°C למשך 3 שעות. לאחר ההדגרה הדוגמאות סורכזו בצנטריפוגה שולחנית swinging bucket (Hettich), במשך 20 דקות במהירות 4,900 rpm. המשקע נשטף ב-2M LiCl והורחף עם 0.5 ml מים מזוקקים פעמיים והועבר למבחנות אפנדורף. למבחנה הוספו RQ1 Rnase-free DNase $2\ \mu\text{l}$ (2units) והבופר שלו והיא הודגרה ב- 37°C למשך שעה. תערובת פנול-כלורופורם הוספה בנפח זהה לנפח הנוזל וסורכזה במיקרוצנטריפוגה (Hettich) במשך 2 דקות. הפאזה העליונה נאספה, וה-RNA הושקע על ידי הוספת עשירית מנפח הנוזל 5 pH Na acetate, ו-2.5 נפחי אתנול 100%. המבחנה הודגרה ב- -70°C למשך 12 שעות. המבחנה סורכזה במיקרוצנטריפוגה (Hettich) במשך 15 דקות. הנוזל העליון נשפה והמשקע יובש באויר. ה-RNA נשטף על ידי הוספת נפח אתנול 70% וסירכוז המבחנה במיקרוצנטריפוגה (Hettich) במשך 10 דקות במהירות מקסימלית. הנוזל העליון נשפה והמשקע יובש באויר ולאחר מכן ב-Heto speedvac. המשקע הומס ב- $200\ \mu\text{l}$ ddH₂O וכמות ה-RNA נקבעה באורך גל 260 nm (סעיף 2.2.5.2).

2.2.5.2 קביעה כמותית של RNA

כמות ה-RNA נקבעה בספקטרופוטומטר GeneQuant (Pharmacia) לפי עוצמת הבליעה באורך גל 260 nm. בליעה של O.D.=1 מייצגת ריכוז RNA של $40 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. הבדיקה אומתה על ידי הרצת דוגמת RNA בג'ל אגרוז מול סטנדרט במשקל ידוע. עוצמת הפלורסנציה השווהה לאחר הארה במנורת U.V.

2.2.6 ג'ל אגרוז להפרדת מקטעי RNA

אגרוז בריכוז 0.8% הומס בבופר 1x TAE על ידי הרתחה במיקרוגל. לאחר קירור התמיסה, אך לפני קרישתה, הוסף ethidium bromide בריכוז $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ (Sambrook *et al.*, 1989). דינמות נמחו ב-RNA sample buffer והדוגמאות הורצו במתח 80-100 V.

2.2.7 הכנת תחלים לראקציית RT-PCR

תחלים לראקציית RT-PCR הוכנו בחברת ביוטכנולוגיה כללית לפי הרצפים של הגנים *apa-2* ו-*ver-1* שפורסמו על ידי Chang *et al.*, 1993 ו-Skory *et al.*, 1992, בהתאמה. רצפי התחלים מפורטים בטבלה 2.2.7.

2.2.8 אמפליפיקציה של קטע הגן בשיטת ה-RT-PCR

מרכיבי הראקציה: RNA המשמש כתבנית $0.1-1 \mu\text{g}$, $1 \mu\text{g}$ מכל אחד מהתחלים, $20 \mu\text{l}$ בופר 5x AMV/Tfl, נוקלאוטידים חופשיים (dNTP's) 0.2 mM מכל אחד, 25 mM MgSO_4 , האנזים AMV Reverse Transcriptase (10 u) והאנזים Tfl DNA Polymerase (10 u). נפח הראקציה הושלם ב- $100 \mu\text{l}$ ddH_2O . לכל ראקציה הוספו $50 \mu\text{l}$ שמן מינרלי למניעת אידוי. תנאי הראקציה:

1. שעה ב- 48°C . (פעילות האנזים AMV R.T.).
2. דקות ב- 94°C . (אינאקטיבציה של האנזים AMV R.T. ודנטורציה של גדילי RNA-DNA).
3. 30 שניות ב- 94°C , דקה ב- 50°C , 2 דקות ב- 68°C . (50 מחזורי אימפליקציה).
4. 7 דקות ב- 68°C . (הארכה מקסימלית של תוצרי ה-RT-PCR).
5. תוצרי הראקציה נבדקו בג'ל אגרוז (סעיף 2.2.4).

טבלה 2.2.7: תחלים ששימשו ב-RT-PCR.

שם התחל, הגן לפיו הוכן וכיוון הסינתזה, רצף התחל, מיקום הקטע בגן
וטמפרטורת ההתכה (T_m) מצויינים. אתרי חיתוך של אנזימי רסטריקציה (מסומנים
באות מעובה):

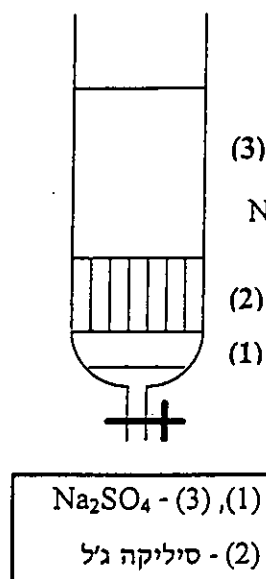
.GGA TTC-*EcoRI*, CAA TTG-*MunI**, GGA TCC-*BamHI*, AGA TCT-*BglIII**

כיווני התחלים מסומנים בחצים מתחת לשם הגן: → - forward, ← - reverse.

תחל	גן	רצף	מיקום בגן	T_m (°C)
1	<i>ver-1</i> →	5' AAC TGC AGA TCT ATG TCG GAT ATT CAC CGT TTA GAT GGC	496-522	74
2	<i>ver-1</i> ←	5' ATA TTG AAT TCG AAA AGC GCC ACC ATC CAC CCC	1369-1388	76
3	<i>omt-1</i> →	5' GGC CCG GTT CCT TGG CTC CTA AGC	208-231	80
4	<i>omt-1</i> ←	5' CGC CCC AGT GAG ACC CTT CCT CG	1209-1232	78
5	<i>nor-A</i> →	5' ATG GTT CTC CCT ACT GCT CCA GAG	831-854	61
6	<i>nor-A</i> ←	5' TTT TGA GGC AGA ACC AAA GTA CTT CGC	2027-2053	66
7	<i>apa-2</i> →	5' AAT TTT GGA TCC CTG AAT TCC TTC CTC ACC	413-437	73
9	<i>apa-2</i> ←	5' CAT TCA CAA TTG TTT TTT TTT TTT TTT TTT	אזור סיום השעתוק	64

* האנזימים *BglIII* ו-*MunI* חותכים כך שנשארים קצוות זהים לחיתוך ע"י *BamHI* ו-*EcoRI*,
בהתאמה.

איור 2.2.9.1: קולונת סיליקה ג'ל



2.2.9 בדיקת יצירת אפלטוקסין

2.2.9.1 הכנת קולונת סיליקה ג'ל

1. שטיפה - העברת נפח כלורופורם בקולונה
2. מילוי הקולונה (איור 9.1) - 5 gr Na₂SO₄, 10 gr סיליקה ג'ל, 15 gr Na₂SO₄
3. שטיפה - העברת נפח כלורופורם בקולונה
4. העמסת הדוגמא על הקולונה

2.2.9.2 הכנת הדוגמא לבדיקת יצירת אפלטוקסין (Anon, 1995)

תבדיד פטריה גודל במצע תירס או במצע PDA במשך 3, 5 ו-7 ימים. 250 ml כלורופורם הוספו ל-50 gr דוגמא והתערובת עורבלה בבלנדר מסחרי. התערובת הועברה לתוך ארלנמייר בנפח 500 ml המכיל 25 ml מים מזוקקים ו-25 gr celite. לאחר עירבוב הוספו 250 ml כלורופורם והכלי טולטל למשך 30 דקות בטמפרטורת החדר. הדוגמא סוננה דרך נייר סיגון לתוך ארלנמייר בנפח 500 ml. התקבל כ-100 ml תסנין. 50 ml מהתסנין הועמס על קולונת סיליקה ג'ל (סעיף 2.2.9.1).

2.2.9.3 הפרדת הדוגמא ע"ג קולונה

50 ml מהדוגמא הועמסו על הקולונה. הפרקציות שאינן מכילות את האפלטוקסין הוצאו ע"י שטיפה ב-150 ml הקסן ולאחריו 150 ml אתר יבש. הפרקציה שמכילה את הרעלן נשטפה מהקולונה ע"י הזרמת 150 ml כלורופורם המכיל 3% מתנול ונאספה לתוך כלי נידוף (קולבה) בנפח 500 ml. הדוגמא נודפה תחילה עד לנפח 2 ml, הועברה לבקבוקונים בנפח 5 ml ושוב נודפה בחנקן עד יובש. המיצוי הומס ב-0.5 ml תמיסת המסת אפלטוקסין והועמס על פלטת TLC. הפלטה הורצה בתוך מיכל הרצה שהכיל נוזל הרצה בתוך מנדף. לאחר ההרצה הפלטה יובשה באויר.

2.2.10 קביעה כמותית של אפלטוקסין

כמות האפלטוקסין נקבעה לפי הרצת הדוגמא מול סטנדרט בריכוז ידוע. עוצמת הפלורסנציה השווהה לאחר הארה במנורת U.V. החישוב נעשה על ידי הנוסחה הבאה:

נוסחה 2.2.10: נוסחת חישוב כמות אפלטוקסין (AF) (ppb):

$$AF \text{ (ppb)} = \frac{S * Y * V}{W * Z}$$

S = נפח סטנדרט (μ l) השווה בעוצמתו לחומר הנבדק - ספציפי לכל דוגמא

Y = ריכוז סטנדרט (μ g/ml) - 0.5μ g/ml

W = משקל הדוגמא (gr) האורגנלית שהגיעה למיצוי הסופי - 25 gr

Z = נפח הדוגמא (μ l) שהורץ בפלטה (מוכפל בפקטור המיהול) - ספציפי לכל דוגמא

V = נפח הממס (μ l) שבו נמהל המיצוי הסופי - 0.5 ml (בנזן-אטצוניטריל)

2.2.11 מדדים לבדיקת גידול פטריות

2.2.11.1 קוטר המושבה

הפטריות גודלו במצע מוצק (PDA או תירס) בצלחת פטרי. קוטר המושבה נמדד לאחר 3, 5 ו-7 ימים. כל דוגמא נבדקה בשתי חזרות (שתי צלחות שונות של אותו תבדיל). כל חזרה נדגמה 3 פעמים. התוצאות מייצגות ממוצע של 6 הדגימות.

2.2.11.2 משקל יבש

הפטריות גודלו על גבי מצע מוצק (PDA או תירס) בצלחת פטרי במשך 3, 5 ו-7 ימים. המצע ועליו התפטיר הותכו והופרדו במים רותחים בתוך כוס כימית בנפח 500 ml. התפטיר הוצא עם מלקחיים ויובש בתנור בתוך כורית אלומיניום ב- 60°C למשך 16 שעות. משקל יבש חושב על ידי החסרת משקל הכורית לפני הוספת התפטיר ממשקל הכורית לאחר הוספת התפטיר וייבושו.

2.2.12 שיבוט מקטעי DNA לפלסמיד והחדרתם לחיידקים

2.2.12.1 הפקת DNA פלסמידי מחיידקי *Escherichia coli* מגזע JM109 נושאי פלסמיד

2.2.12.1.1 הפקת DNA פלסמידי בכמות גדולה

DNA פלסמידי בכמות גדולה הופק מתרבית חיידקי *E. coli* JM109 נושאי פלסמיד pGEX-2T, שגדלה ממושבה בודדת במשך לילה ב-100 ml מצע LB המכיל אמפיצילין בריכוז $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. החיידקים שוקעו בצנטריפוגת Sorvall ב-7,000 rpm במשך 10 דקות וה-DNA הופק מהם בעזרת QIAGEN Plasmid maxi kit. כמות ה-DNA נקבעה כמתואר בסעיף 2.2.1.2 ובאנליזה בג'ל אגרוז (סעיף 2.2.4).

2.2.12.1.2 הפקת DNA פלסמידי בכמות קטנה

DNA פלסמידי בכמות קטנה הופק מ-1.5 ml תרבית חיידקים נושאי פלסמיד שגדלה ממושבה בודדת במשך 16 שעות ב-2 ml מצע LB המכיל אמפיצילין בריכוז $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. החיידקים שוקעו במבחנת אפנדורף במיקרוצנטריפוגה (Hettich). ה-DNA מוצה מהם בעזרת ערכת QIAGEN QIAprep-spin ושימש לאנליזה של תוצרי השיבוט (סעיף טרנספורמציה).

2.2.12.2 הפלסמיד pGEX-2T

הפלסמיד ששימש לביטוי חלבונים בחיידקי *E. coli* היה pGEX-2T (Pharmacia). פלסמיד זה מכיל גן לעמידות לאמפיצילין, פרומוטור חזק (p^{lac}) שהרפרסור שלו מצוי על הפלסמיד ופעילותו מוסרת על ידי IPTG. על הפלסמיד מצוי הגן לאנזים glutathione-S-transferase (GST) שבחלק ה-C טרמינלי שלו מצוי אתר שיבוט המאפשר ביטוי תוצר הגן המשובט באותה מסגרת קריאה. אתר השיבוט מכיל רצפים לאנזימי רסטריקציה *Bam*HI, *Sma*I ו-*Eco*RI.

2.2.12.3 חיתוך המחדר והפלסמיד

תוצרי ה-PCR וה-RT-PCR המיועדים לשיבוט עברו מיצוי בתמיסת פנול-כלורופורם והשקעה אתנולית. לאחר הניקוי נחתך תוצר ה-PCR והפלסמיד pGEX-2T באנזימי הרסטריקציה *Eco*RI ו-*Bam*HI בבופר TA. המחדר VER-RT, תוצר RT-PCR, נחתך באנזימים *Eco*RI ו-*Bgl*II. תוצר ה-RT-PCR של הגן *apa-2*, *APA*-RT, נחתך באנזימי הרסטריקציה *Mun*I ו-*Bam*HI. האנזים *Bgl*II קומפטבילי לאנזים *Bam*HI, ואילו אנזים החיתוך *Mun*I קומפטבילי ל-*Eco*RI. ראקציות החיתוך הונבעו ב-37°C במשך 3 שעות. תוצרי הראקציות הורצו על ג'ל אגרוז (סעיף 2.2.4) ונחתכו ממנו לאחר שנצפו במנורת U.V. באורך גל 365 nm (Sambrook et al., 1989).

2.2.12.4 ליגציה של מקטעי DNA

הפלסמיד והמחדר החתוכים מוצו מג'ל האגרוז בערכת Jetsoorb וחוברו בעזרת האנזים T4 Ligase. מרכיבי הראקציה: DNA (וקטור ומחדר), בופר ליגציה והאנזים בנפח ראקציה $10\ \mu\text{l}$ במשך 16 שעות ב- 14°C (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.12.5 טרנספורמציה

תאי *E. coli* קומפטנטים מגזע JM109 שימשו לקליטת ה-DNA. $100\ \mu\text{l}$ תאים הופשרו על קרח והוספו להם $5\ \mu\text{l}$ מתמיסת הליגציה. המבחנה הודגרה על קרח במשך 30 דקות, הועברה לאמבט מים בטמפרטורה 42°C למשך 45 שניות והוחזרה לקרח למשך 2 דקות. התערובת הועברה למבחנה בנפח $10\ \text{ml}$ המכילה $1\ \text{ml}$ LB וטולטלה ב- 37°C במשך שעה. $100\ \mu\text{l}$ מתרבית החיידקים נזרעו על צלחת LBA עם אמפיצילין בריכוז $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$. שארית התרבית סורכה בצנטריפוגת swinging bucket (Hettich) ב- $3,500\ \text{rpm}$ במשך 5 דקות המשקע הורחף ב- $100\ \mu\text{l}$ LB ונזרע על מצע LBA עם אמפיצילין בריכוז $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$. הצלחות הודגרו ב- 37°C למשך לילה (Sambrook *et al.*, 1989). DNA פלסמי מוצה ממושבות נבחרות ועבר אנליזה בג'ל אגרוז (סעיפים 2.2.12.1.1 ו-2.2.4).

2.2.13 הפקת חלבונים רקומביננטים להשראת נוגדנים בארנבות

2.2.13.1 גידול חיידקי *Escherichia coli* והפקת חלבון בכמות קטנה

מושבת *E. coli* המכילה וקטור רקומביננטי (pGEX-2T-APA-2, pGEX-2T-VER-RT או pGEX-2T-APA-RT) גדלה תוך כדי טלטול במשך 16 שעות ב- $2\ \text{ml}$ מצע LB המכיל אמפיצילין בריכוז $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ב- 37°C . $100\ \mu\text{l}$ מהתרבית הוספו ל- $2.5\ \text{ml}$ LB נוזלי המכיל אמפיצילין בריכוז $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ והחיידקים גודלו ב- 37°C עד שהעכירות עלתה ל- $\text{O.D.}_{(600)}=0.6$ (פאזה לוגריתמית). תמיסת IPTG הוספה לריכוז סופי $0.1\ \text{mM}$ לשם אינדוקציה והחיידקים גודלו 2.5 שעות נוספות ב- 37°C . $1.5\ \text{ml}$ מהתרבית הועברו למבחנת אפנדורף וסורכו במיקרוצנטריפוגה (Hettich) במשך דקה. הנחל העליון הורחק והמשקע הורחף ב- $25\ \mu\text{l}$ בופר TE בעזרת ערבול במכשיר Vortex. לתרחיף הוספו $175\ \mu\text{l}$ 1x protein sample buffer (בופר המסת חלבונים) והוא עורבל בחזקה באותו מכשיר. לאחר מכן הורתח התרחיף במשך 5 דקות, סורכו והנוזל העליון הועבר למבחנה נוספת ושימש לאנליזת חלבונים (סעיף 2.2.13.4).

2.2.13.2 גידול חיידקים והפקת חלבון בכמות גדולה

מושבה של חיידקי *E. coli* המכילה את אחד הפלסמידים הרקומביננטים (pGEX-2T-APA-2, pGEX-2T-VER-RT או pGEX-2T-APA-RT) נזרעה לתוך $50\ \text{ml}$ מצע LB נוזלי המכיל

אמפיצילין בריכוז $100 \mu\text{g/ml}$. החיידקים גודלו תוך כדי טלטול ב- 37°C במשך 16 שעות. תרבית החיידקים הוספה ל-500 ml מצע LB המכיל אמפיצילין בריכוז $100 \mu\text{g/ml}$ בארלנמייר בנפח 2 l וטולטלה במשך שעה. IPTG הוסף לריכוז סופי של 0.1 mM להשראת ייצור החלבון הרקומביננטי. החיידקים טולטלו ב- 37°C במשך 4 שעות ושוקעו בצנטריפוגת sorvall במהירות 7,000 rpm במשך 15 דקות. הנזל העליון נשפה. המשקע הורחף ב-10 ml PBS קר.

2.2.13.3 הפקת חלבונים ובידודם על SDS-PAGE - חומרים

30% acrylamide:Bis - 29:1

lower Tris - 1.5M Tris HCl pH 8.8, 0.4% SDS

upper Tris - 0.5 Tris HCl pH 6.8, 0.4% SDS

ammonium persulfate - 100 mg/ml

TEMED

running buffer - glycine 187 mM, Tris base 25 mM, SDS 4 mM

staining solution - 0.1% coomassie blue R-250, 40% MeOH, 10% Ac.A

destaining solution - 40% MeOH, 10% Ac.A

5x sample buffer (8 ml):

ddH ₂ O	4 ml
upper Tris	1 ml
glycerol	0.8 ml
10% (w/v) SDS	1.6 ml
2-β-mercaptoethanol	0.4 ml
0.05% (w/v) bromophenol blue	0.2 ml

הכנת ג'ל הפרדת חלבונים במערכת mini:

running gel (10%) 7 ml

Bis:acrylamide 29:1	2.33 ml
lower Tris	1.75 ml
H ₂ O	2.92 ml
ammonium persulfate	50 μl
TEMED	10 μl

stacking gel

Bis:acrylamide 29:1	415 μl
upper Tris	625 μl
H ₂ O	1.46 ml
ammonium persulfate	20 μl
TEMED	5 μl

2.2.13.4 הפקת חלבונים לשימוש בצורה דנטורסיבית להשראת נוגדנים

4 ml בופר המסת חלבונים (5x) הוסף לתרחיף התאים ב-PBS. הנוזל הורתח במשך 10 דקות, הועבר למבחנות אפנדורף, סורכו במיקרוצנטריפוגה (Hettich) במשך 5 דקות והתסנין נאסף.

2.2.13.5 SDS-PAGE על החלבונים

גל אקרילאמיד בריכוז 10% נוצק למערכת mini (Bio-Rad). המיצוי החלבוני (סעיפים 2.2.13.1 ו-2.2.13.2) הורתח במשך 5 דקות, סורכו במיקרוצנטריפוגה (Hettich) במשך 3 דקות ו-15 μ l מהנוזל העליון הוטען לבארות. ההפרדה בוצעה במתח קבוע של 200 V במשך כשעה וחצי. הג'ל נצבע בתמיסת צבע coomassie במשך 30 דקות ולאחר מכן הוסר עודף הצבע במים במשך שעות. גלים שהכילו חלבונים המיועדים להזרקה לארנבות נצבעו בתמיסת צבע coomassie שלא הכילה מתנול.

2.2.13.6 מיצוי חלבונים והכנתם להזרקה

פס הג'ל החתוך נשטף ב-25 ml מים מזוקקים פעמיים במשך 4 שעות. המים הוחלפו כל 30 דקות. לאחר השטיפות עבר הפס המגון וכתישה ב-PBS 1 ml ונאסף למזרק. הנוזל עורבב עם 1 ml incomplete Freund's adjuvant במזרק נוסף כהכנתו להזרקה לארנבות.

2.2.13.7 הזרקת הפוליפפטיד לארנבות להשראת נוגדנים

הפוליפפטיד הדנטורסיבי שנחתך מהג'ל הוזרק לארנבות (אשר סופקו ע"י חברת Anilab). הכמויות שהוזרקו הן: 20-30 μ g ב-1 ml. הארנבות היו בנות 8 שבועות בעת ההזרקה הראשונה. ההזרקות היו תוך שריריות בשתי שוקי הארנבת ונערכו פעם בשבוע במשך 5-7 שבועות. בכל שבוע נלקח מהארנבת דם ששימש להפקת הנוגדנים.

2.2.13.8 הפקת הנוגדנים

דם נאסף מהארנבות 5-7 פעמים. הדם סורכו בצנטריפוגת Sorvall במהירות 5,000 rpm במשך 10 דקות ב-4°C. הסרום נאסף, נשמר ב-20°C ושימש בראקציות ה-ELISA.

2.2.14 ACP-ELISA

2.2.14.1.1 הכנת הפטריות כאנטיגן לראקציית ELISA

הכנת האנטיגן נעשתה כפי שתואר על ידי Paster et al., (1994). צלחות המכילות מצע תירס כוסו בממברנת צלופן. פטריות שגדלו על מצע סינתטי נשטפו מנבגיהן ודיסקיות תפטיר בקוטר 3 mm נחתכו מהצלחות והונחו על ממברנת הצלופן. הצלחות הודגרו בטמפרטורה של $27 \pm 1^\circ\text{C}$ במשך 3 ימים והנבגים נשטפו מהן במים מזוקקים. דיסקית התפטיר הישן נזרקה, התפטיר החדש

קולף מהצלופן, הוקפא בחנקן נוזלי, נכתש בעלי ובמכתש, הורחף בבופר קרבונט 0.05 M, pH 9.6 ביחס 1:1 (w/v). התמיסה הומגנה במכשיר ultra-turax וסורכזה בצנטריפוגת Sorvall במהירות 10,000 rpm במשך 10 דקות. הנוזל העליון נאסף, נמהל לריכוז של 1 µg/µl והוקפא ב-80°C. מקטע זה שימש כאנטיגן בראקציות ה-ELISA.

2.2.14.1.2 הכנת הפטריות כאנטיגן לראקציית ELISA בניסויי אילוח

תירס גרוס ומוקרן אולח ברמות שונות של נביג *A. parasiticus* והודגר ב-1°C ± 27 בטלטול לפרקי זמן שונים בתוך ארלנמייר בנפח 250 ml. לאחר ההדגרה, התירס המאולח הוקפא בחנקן נוזלי, נכתש בעלי ובמכתש, הורחף בבופר קרבונט 0.05 M, pH 9.6 ביחס 1:1 (w/v). התמיסה הומגנה במכשיר ultra-turax וסורכזה בצנטריפוגת Sorvall במהירות 10,000 rpm במשך 10 דקות. הנוזל העליון נאסף, והוקפא ב-80°C. מקטע זה שימש כאנטיגן בראקציות ה-ELISA בניסויי האילוח.

2.2.14.2 ראקציית ACP-ELISA

100 µg מהאנטיגן הודגרו בבארות של פלטת ELISA במשך 24 שעות בטמפרטורה של 24°C. הפלטה נשטפה במים מזוקקים ובבופר PBS-tween. לכל באר הוספו 100 µl תמיסת נוגדן המהול 1:1000 בתמיסת 1% חלב רזה ב-PBS. הפלטה הודגרה למשך 24 שעות ב-37°C. לאחר שטיפת הבארות הוסף תצמיד של האנזים alkaline phosphatase לנוגדן goat anti rabbit במיהול 1:2000 והפלטה הודגרה ב-37°C במשך 3 שעות. בתום ההדגרה הוספו 100 µl מתמיסת הראקציה ופלטת ה-ELISA נקראה במכשיר ELISA reader (Biotech, USA) באורך גל 405nm מדי 10 דקות במשך שעה אחת.

2.2.15 אנליזת Western blot

2.2.15.1 הכנת מיצוי חלבוני מפטריות לאנליזת ה-Western blot

צלחות המכילות מצע תירס גרוס מעוקר בקרינת גמא עם 2% אגר כוסו בממברנת צלופן. פטריות שגדלו על מצע סינתטי נשטפו מנגיניהן ודיסקיות תפטיר בקוטר 3 mm נחתכו מהצלחות והונחו על ממברנת הצלופן. הצלחות הודגרו בטמפרטורה של 1°C ± 26 במשך 7 ימים והנבגים נשטפו מהן במים מזוקקים. דיסקית התפטיר הישן נזרקה, התפטיר החדש קולף מהצלופן והוקפא בחנקן נוזלי, נכתש בעלי ובמכתש והורחף ב-protein sample buffer. התמיסה חוממה ל-95°C למשך 10 דקות. שאריות תפטיר שוקעו ע"י סירכוז הדוגמאות למשך 10 דקות במיקרוצנטריפוגה (Hettich). הפאזה המימית נאספה ושימשה באנליזת Western blot.

2.2.15.2 הכנת הנוגדנים לאנליזת western blot

ראה סעיף 2.2.13.7.

2.2.15.3 Western blot אנליזת

ג'ל אקרילאמיד בריכוז 10% נוצק למערכת mini (Bio-Rad). המיצוי החלבוני (סעיף 2.2.15.2) הורתח במשך 5 דקות, סורכו במיקרוצנטריפוגה (Hettich) במשך 3 דקות ו- $15\text{ }\mu\text{l}$ מהנוזל העליון הוטען לבארות. ההפרדה בוצעה במתח קבוע של 200 V במשך כשעה וחצי. לאחר הרצה הועברו החלבונים לממברנת ניטרוצלולוז ע"י electroblotting במתקן Transblot (Bio-Rad) Apparatus. הספיחה התרחשה בתוך transfer buffer, בזרם קבוע של 80 mA למשך כ-40 דקות.

הנוגדנים נמהלו בתמיסת blocking. נוגדנים כנגד החלבון APA-2 נמהלו פי 500. הנוגדנים עברו אינקובציה עם הממברנה במשך שעתיים ב- 37°C . לאחר מכן הממברנה נשטפה בהשרייה 3 פעמים (15 דקות בכל פעם) בתמיסת PBS המכילה 0.5% Tween בטמפרטורת החדר. הממברנה השטופה הודגרה עם 10 ml תמיסת ^{125}I -protein A ($100\mu\text{Ci}$) מהול בתמיסת blocking למשך שעתיים ב- 37°C . בגמר ההדגרה הממברנה נשטפה 3 פעמים למשך 15 דקות בכל פעם בטמפרטורת החדר ע"י טלטול בתמיסת PBS המכילה 0.5% Tween. לאחר ייבוש, הממברנה נחשפה לפילם ב- 70°C .

3. תוצאות

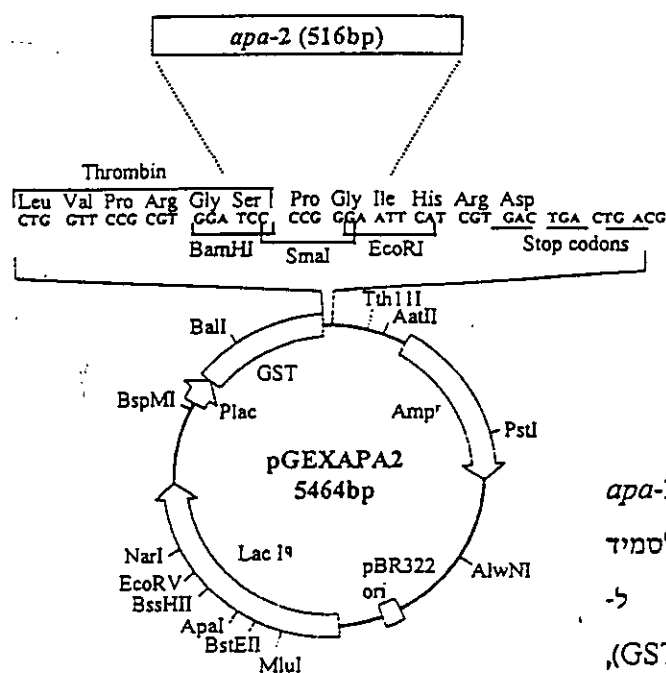
3.1 שיבוט מקטעי DNA לפלסמיד והחדרתם לחיידקי *Escherichia coli*

זיהוי ספציפי של אורגניזמים בעזרת נוגדנים מבוסס על קיומם של חלבונים ייחודיים לאורגניזם. חלבונים שונים במסלול הביוסינתזה של אפלטוקסין B₁, הייחודיים לפטריות אפלטוקסיגניות יכולים על כן לשמש למטרה זו. הגנים המקודדים לחלבונים ספציפיים ששימשו בעבודה זו: קטע מהגן *apa-2*, הגן *apa-2*, והגן *ver-1*.

3.1.1 שיבוט מקטע הגן *apa-2* לפלסמיד והחדרתו לחיידקי *Escherichia coli*

3.1.1.1 הכנת המחדר והפלסמיד וחיתוכם

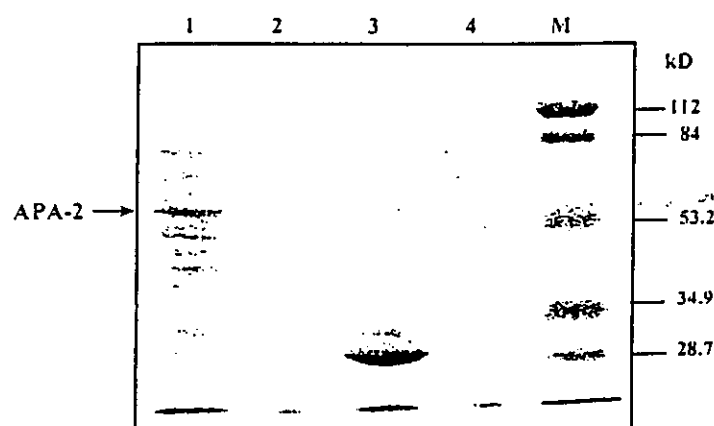
תחלים 7 ו-8 שימשו בראקציית PCR לשכפול קטע מהגן *apa-2* המקודד לחלבון APA-2 (סעיף 2.2.2). תוצר ה-PCR ווקטור השיבוט, הפלסמיד pGEX-2T, נחתכו באנזימי הרסטריקציה *Bam*HI ו-*Eco*RI. התקבלו שני תוצרי חיתוך של תוצר ה-PCR - פרגמנט בגודל 0.6kb בעל קצוות *Eco*RI-*Eco*RI ופרגמנט נוסף בגודל 0.6kb בעל קצוות *Bam*HI-*Eco*RI, שעבר ליגציה עם הפלסמיד. תוצר ה-PCR נחתך במרכזו כיוון שבאמצע רצף הגן *apa-2* קיים אתר חיתוך לאנזים *Eco*RI (נוקלאוטידים 974-980). הפלסמיד הכימרי pGEX-APA-2 שגודלו כ-5.5kb (איור 3.1.1.1) הוחדר לחיידקי *E. coli* לשם ביטוי יתר של החלבון הכימרי GST-APA-2.



איור 3.1.1.1: שיבוט קטע הגן *apa-2* לוקטור השיבוט pGEX-2T. בפלסמיד pGEX-2T מצוין מיקום הגן ל-glutathione-S-transferase (GST), אתר השיבוט, אתר החיתוך של אנזימי הרסטריקציה ואתר הגן לעמידות ל-ampicillin.

3.1.1.2 ביטוי החלבון הכימרי GST-APA-2 בחיידקי *Escherichia coli* JM109

הפלסמיד pGEX-APA-2 הוחדר לחיידקי *E. coli* JM109 (סעיף 2.2.12.5). מושבות נושאות פלסמיד בודדו וגודלו. לאחר אינדוקציה לביטוי יתר הופק החלבון הכימרי GST-APA-2 מהחיידקים ושימש להשראת נוגדנים בארנבות (סעיף 2.2.13.4). כלל חלבוני החיידקים הופקו והחלבון הכימרי בודד על ידי הפרדתו בג'ל דנטורטיבי (סעיפים 2.2.13.2, 2.2.13.3). בהפרדת חלבוני *E. coli*, הנושאים את אחד הפלסמידים pGEX-2T או pGEX-APA-2 ללא אינדוקציה, לא ניתן לראות חלבון דומיננטי (ערוצים 2 ו-4 תמונה 3.1.1.2). לאחר אינדוקציה של חיידקים הנושאים את הוקטור ללא המחדר נוסף חלבון בגודל 27.5kb, המתאים בגודלו ל-GST (ערוץ 3). באינדוקציה לחיידקים נושאים וקטור והמחדר *apa-2* נוסף חלבון הנודד לאט יותר GST-APA-2, וגודלו מוערך בכ-50 kD (ערוץ 1). כיוון שהמחדר הכיל רק כמחצית מרצף הגן, התקבלה תוספת של כ-22 kD בלבד (מהקצה ה-N' טרמינלי של החלבון).

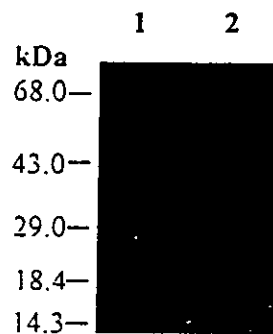


תמונה 3.1.1.2: ביטוי יתר של החלבון הכימרי GST-APA-2 בחיידקי *E. coli*

M - סמני גודל, 1 - ביטוי יתר של GST-APA-2, 2 - חלבוני חיידק המכיל את הפלסמיד pGEX-APA-2 ללא אינדוקציה, 3 - ביטוי יתר של GST, 4 - חלבוני חיידק המכיל את הפלסמיד pGEX ללא אינדוקציה.

3.1.1.3 אנליזת Western blot עם נוגדני APA-2

נוגדנים הושרו בשתי ארנבות נגד הפפטיד הכימרי GST-APA-2 בצורתו הדנטורטיבית. סרום הארנבות נמהל 1:1000 בתמיסת אבקת חלב ושימש לאנליזת Western blot (סעיף 2.2.15.3). באנליזה עם הנוגדן APA-2 התקבלה תגובה ספציפית עם חלבון בגודל של כ-50 kD כשנעשה שימוש במיצוי חלבוני מהפטריה *A. parasiticus*, ואילו עם מיצוי חלבוני מגרעיני תירס גרוס לא התקבלה תגובה (תמונה 3.1.1.3).



תמונה 3.1.1.3: אנליזת Western blot עם הנוגדן APA-2. 1 - מיצוי שהופק מהפטריה

A. parasiticus. 2 - מיצוי שהופק מגרעיני תירס גרוס.

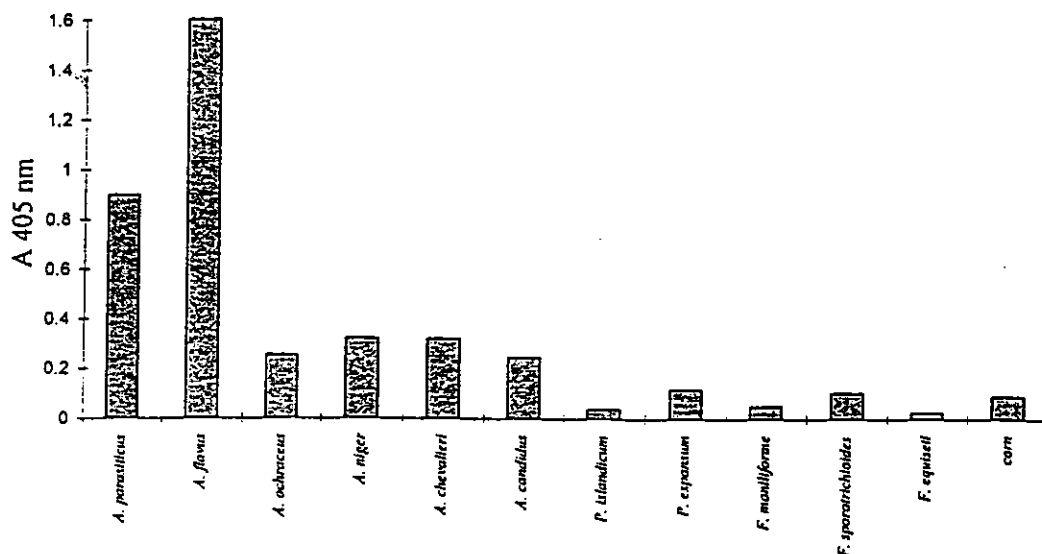
3.1.1.4 זיהוי פטריות אפלטוקסיגניות בעזרת נוגדנים למקטע הגן *apa-2*

הנוגדן ששימש באנליזת ה-Western blot שימש גם בראקציית ELISA (סעיף 2.2.14.2) כנגד אנטיגנים שונים: פטריות מחסן מהסוגים *Penicillium*, *Aspergillus* ו-*Fusarium* ותירס שנבחר לשמש כמערכת מודל לזיהוי פטריות אפלטוקסיגניות בשל היותו רגיש לתקיפת פטריות אלה. הנוגדן הגיב עם נוגדני הארנבת שהיו קשורים למיצוי הפטריות *A. parasiticus* ו-*A. flavus*. עוצמת התגובה האימונית נמדדה בקורלציה לפעילות האנזים, כפי שהתבטאה ביחידות בליעה אופטית באורך גל 405nm (סעיף 2.2.14.2).

איור 3.1.1.4 מתאר את הבליעה האופטית של תמיסת הראקציה לאחר הדגרה למשך שעה. כמויות החלבון מהאורגניזמים השונים היו זהות (100µg). תגובה חזקה התקבלה בפטריה האפלטוקסיגנית *A. parasiticus* ממנה נלקח הגן להשראת הנוגדנים ($O.D_{405} = 0.9$). הפטריה האפלטוקסיגנית *A. flavus* נתנה תגובה חזקה אף יותר ($O.D_{405} = 1.6$). בשאר הפטריות ובתירס התקבלה בליעה נמוכה מאוד הנחשבת לבליעת רקע. ההבדל בעוצמות הבליעה בין הפטריות

האפלטוקסיגניות לאלה שאינן הוא גדול ומאפשר לזהות בוודאות נוכחות הפטריות האפלטוקסיגניות.

תגובה ניגודית של נוגדני APA-2 עם מיצוי חלבוני של מיני פטריות מהסוגים *Aspergillus*, *Fusarium* ו- *Penicillium*

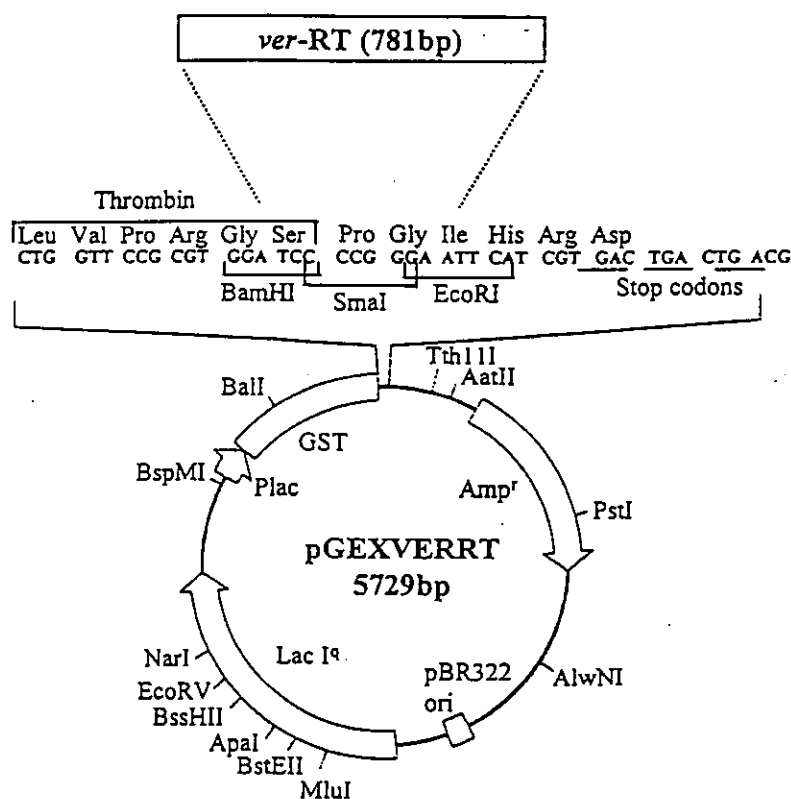


איור 3.1.1.4: תגובה ניגודית (המבוטאת כבליעה אופטית ב-405nm) של נוגדנים פוליקלונליים, שהושרו נגד חלק הגן *apa-2*, עם מיצויים מתפטירי הפטריות מהסוגים *Aspergillus*, *Fusarium* ו- *Penicillium* ומתירס במבחן ACP-ELISA.

3.1.2 שיבוט הגן *ver-1* לפלסמיד והחדרתו לחיידקי *Escherichia coli*

3.1.2.1 הכנת המחדר והפלסמיד וחיתוכם

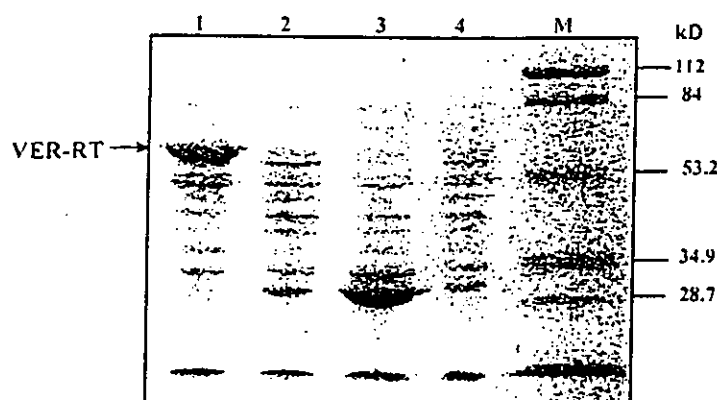
מיצוי RNA מהפטריה *A. parasiticus* שגודלה על גבי מצע מינימלי נוזלי מוגדר למשך 60 שעות שימש בראקצית RT-PCR עם תחלים 1 ו-2 לשיכפול הגן *ver-1* המקודד לחלבון VER-1 (להלן VER-RT) (סעיפים 2.2.2, 2.2.5.1). תוצר ה-RT-PCR נחתך באנזימים *EcoRI* ו-*BglII*. *BglII* חותך כך שנשארים קצוות זהים לחיתוך ע"י *BamHI*. נעשה שימוש באנזים זה כיוון שלאנזים *BamHI* יש אתרי חיתוך נוספים ברצף הגן. וקטור השיבוט, הפלסמיד pGEX-2T, נחתך באנזימי הרסטריקציה *BamHI* ו-*EcoRI*. לאחר ליגציה הוחדר הפלסמיד הכימרי pGEX-VER-RT שגודלו כ-5.7kb (איור 3.1.2.1) לחיידקי *E. coli* לשם ביטוי יתר של החלבון הכימרי GST-VER-RT.



איור 3.1.2.1: שיבוט הגן *ver-1* לוקטור השיבוט pGEX-2T. בפלסמיד pGEX-2T מצוין מיקום הגן ל-glutathione-S-transferase (GST), אתר השיבוט, אתרי חיתוך של אנזימי הרסטריקציה ואתר הגן לעמידות ל-ampicillin.

3.1.2.2 ביטוי החלבון הכימרי GST-VER-RT בחיידקי *Escherichia coli* JM109

הפלסמיד pGEX-2T-VER-RT הוחדר לחיידקי *E. coli* JM109 (סעיף 2.2.12.5). מושבות נושאות פלסמיד בודדו וגודלו. לאחר אינדוקציה לביטוי יתר, הופק החלבון הכימרי GST-VER-RT מהחיידקים ושימש להשראת נוגדנים בארנבות (סעיף 2.2.13.4). כלל חלבוני החיידקים הופקו והחלבון הכימרי בודד על ידי הפרדתו בג'ל דנטורטיבי (סעיפים 2.2.13.2 ו-2.2.13.3). בהפרדת חלבוני *E. coli*, הנושאים את אחד הפלסמידים pGEX-2T או pGEX-2T-VER-RT, לא נראה חלבון דומיננטי (ערוצים 4 ו-2 תמונה 3.1.2.2). לאחר אינדוקציה של חיידקים הנושאים את הוקטור ללא המחזר נוסף חלבון בגודל 27.5kb, GST (ערוץ 3). באינדוקציה לחיידקים נושאים וקטור והמחזר *apa-2* נוסף חלבון הנודד לאט יותר GST-APA-2, וגודלו מוערך בכ-60kDa (ערוץ 1).



תמונה 3.1.2.2: ביטוי יתר של החלבון הכימרי GST-VER-RT בחיידקי *E. coli*

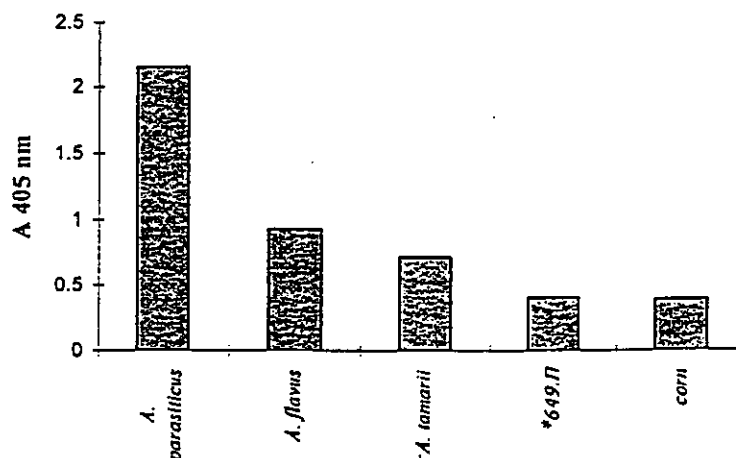
M - סמני גודל, 1 - חלבוני חיידק בו GST-VER-RT מבוטא בעודף 2 - חלבוני חיידק המכיל את הפלסמיד pGEX-VER-RT ללא אינדוקציה, 3 - חלבוני חיידק בו GST מבוטא בעודף, 4 - חלבוני חיידק המכיל את הפלסמיד pGEX ללא אינדוקציה.

3.1.2.3 זיהוי פטריות אפלטוקסיגניות בעזרת נוגדני VER-RT

נוגדנים הושרו בשתי ארנבות נגד הפפטיד הכימרי GST-VER-RT בצורתו הדנטורטיבית. סרום הארנבות נמהל 1:1000 בתמיסת אבקת חלב ושימש בראקציית ELISA (סעיף 2.2.14.2). כנגד האנטיגנים הבאים: *A. flavus*, *A. parasiticus*, התבדיל *A. flavus* NRRL649 שאינו אפלטוקסיגני, תבדיל *A. tamarii* NRRL 25517 אפלטוקסיגני ותירס שנבחר לשמש כמערכת מודל לזיהוי פטריות אפלטוקסיגניות בשל היותו רגיש לתקיפת פטריות אלה. הנוגדן הגיב עם נוגדני הארנבת שהיו קשורים למיצוי הפטריות *A. parasiticus* ו-*A. flavus*. עוצמת התגובה האימונית נמדדה בקורלציה לפעילות האנזים, כפי שהתבטאה ביחידות בליעה אופטית באורך גל 405nm.

איור 3.1.2.3 מתאר את בליעת תמיסת הראקציה לאחר הדגרה למשך שעה בכל אחד ממיצויי האורגניזמים השונים. כמויות החלבון הממוצה מהאורגניזמים השונים היו זהות ($100\mu\text{g}$). תגובה חזקה במיוחד התקבלה בפטריה האפלטוקסיגנית *A. parasiticus* ממנה נלקח הגן להשראת הנוגדנים ($\text{O.D.}_{405}=2.151$). התבדילים האפלטוקסיגניים *A. flavus* ו-*A. tamarii* ($\text{O.D.}_{405}=0.93$) ו- $\text{O.D.}_{405}=0.715$ (בהתאמה) נתנו אף הם תגובה חזקה, אך בעוצמה נמוכה יחסית ל-*A. parasiticus*. לעומתם, התבדיל המוטנט הגיב בצורה חלשה ($\text{O.D.}_{405}=0.406$), בדומה לתירס ששימש כביקורת שלילית בניסוי ($\text{O.D.}_{405}=0.387$). ההבדל בעוצמות הבליעה בין הפטריות האפלטוקסיגניות לתבדיל המוטנט הוא גדול ומאפשר לזהות בוודאות נוכחות הפטריות האפלטוקסיגניות.

תגובה ניגודית של נוגדני VER-RT עם מיצוי חלבוני של מיני פטריות מהסוג *Aspergillus*

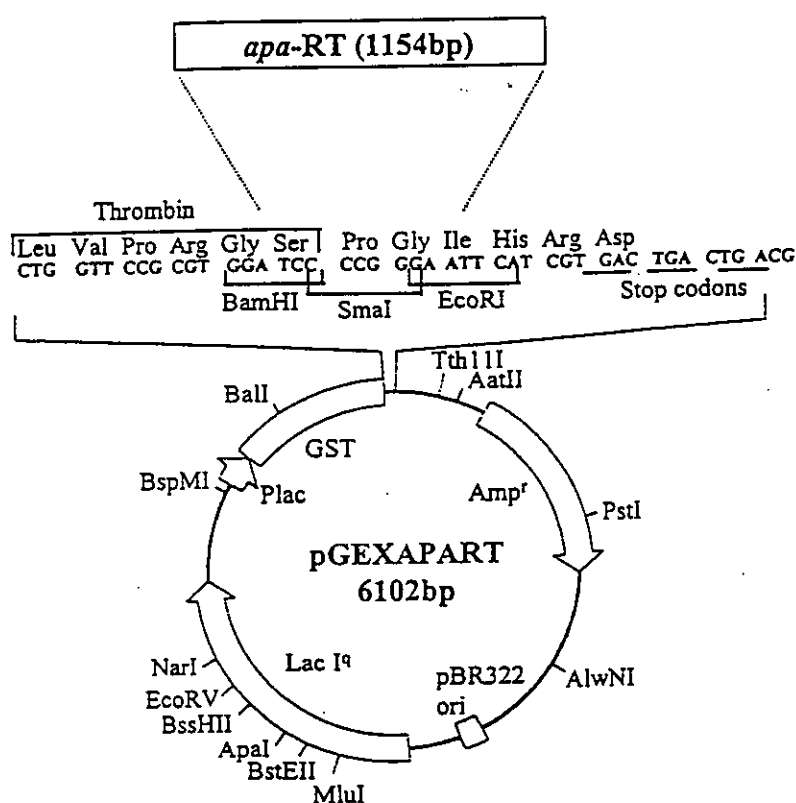


איור 3.1.2.3: תגובה ניגודית (המבוטאת כבליעה אופטית ב-405nm) של נוגדנים פוליקלונליים, שהושרו נגד הגן *ver-1*, עם מיצוי שהופק מתפטירי הפטריות מהסוג *Aspergillus* ומתירס במבחן ACP-ELISA. (* ת.649 = *A. flavus* NRRL649 אשר אינו יוצר אפלטוקסין).

3.1.3 שיבוט הגן *apa-2* לפלסמיד והחדרתו לחיידקי *Escherichia coli*

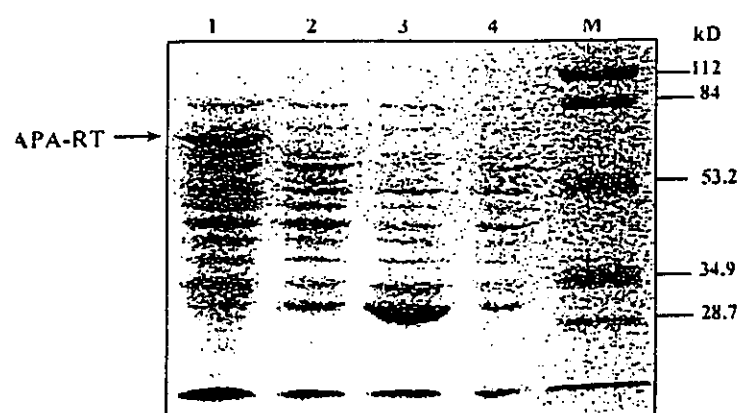
3.1.3.1 הכנת המחזר והפלסמיד וחיתוכם

מיצוי RNA מהפטריה *A. parasiticus* שגודלה על גבי מצע מינימלי נוזלי מוגדר למשך 60 שעות שימש בראקציית RT-PCR עם תחלים תחלים 7 ו-9 לשכפול הגן *apa-RT* המקודד לחלבון APA (סעיפים 2.2.2, 2.2.5.1). תוצר ה-RT-PCR (להלן *apa-RT*) נחתך ע"י האנזימים *Bam*HI ו-*Mun*I חותך כך ששארים קצוות זהים לחיתוך ע"י *Eco*RI נעשה שימוש באנזים זה כיוון שלאנזים *Eco*RI יש אתר חיתוך נוסף ברצף הגן. וקטור השיבוט, הפלסמיד pGEX-2T, נחתך באנזימי הרסטריקציה *Bam*HI ו-*Eco*RI. לאחר ליגציה הוחדר הפלסמיד הכימרי pGEX-APA-RT שגודלו כ-6.1kb (איור 3.1.3.1) לחיידקי *E. coli* לביטוי יתר של החלבון הכימרי GST-APA-RT.



איור 3.1.3.1: שיבוט הגן *apa-2* לוקטור השיבוט pGEX-2T. בפלסמיד pGEX-2T מצויין מיקום הגן ל-glutathione-S-transferase (GST), אתר השיבוט, אתר חיתוך של אנזימי הרסטריקציה ואתר הגן לעמידות ל-ampicillin.

3.1.3.2 ביטוי החלבון הכימרי GST-APA-RT בחיידקי *Escherichia coli* JM109
הפלסמיד pGEX-2T-APA-RT הוחדר לחיידקי *E. coli* JM109 (סעיף 2.2.12.5). מושבות
נושאות פלסמיד בודדו וגודלו. לאחר אינדוקציה לביטוי יתר, הופק החלבון הכימרי GST-APA-
RT מהחיידקים ושימש להשראת נוגדנים בארנבות (סעיף 2.2.13.4). כלל חלבוני החיידקים
הופקו והחלבון הכימרי בודד על ידי הפרדתו בג'ל דנטורטיבי (סעיפים 2.2.13.2 ו-2.2.13.3).
בהפרדת חלבוני *E. coli*, הנושאים את אחד הפלסמידים pGEX-2T או pGEX-2T-APA-RT
ללא אינדוקציה, לא ניתן לראות חלבון דומיננטי (ערוצים 1 ו-3 תמונה 3.1.3.2). לאחר
אינדוקציה של חיידקים הנושאים את הוקטור ללא המחדר נוסף חלבון בגודל 27.5kb, GST
(ערוץ 2). באינדוקציה לחיידקים נושאים וקטור והמחדר *apa-2* נוסף חלבון הנודד לאט יותר
GST-APA-RT, וגודלו מוערך בכ-70kDa (ערוץ 4). בעתיד יערכו ניסויים בהם ישמש החלבון
GST-APA-RT כנוגדן לזיהוי פטריות אפלטוקסיגניות.



תמונה 3.1.3.2: ביטוי יתר של החלבון הכימרי GST-APA-RT בחיידקי *E. coli*
M - סמני גודל, 1 - חלבוני חיידק המכיל את הפלסמיד pGEX ללא אינדוקציה, 2 - חלבוני חיידק
בו GST מבוטא בעודף, 3 - חלבוני חיידק המכיל את הפלסמיד pGEX-APA-RT ללא
אינדוקציה, 4 - חלבוני חיידק בו GST-APA-RT מבוטא בעודף.

3.2 זיהוי ספציפי של הפטריה *Aspergillus parasiticus* בדוגמאות תירס ברמות

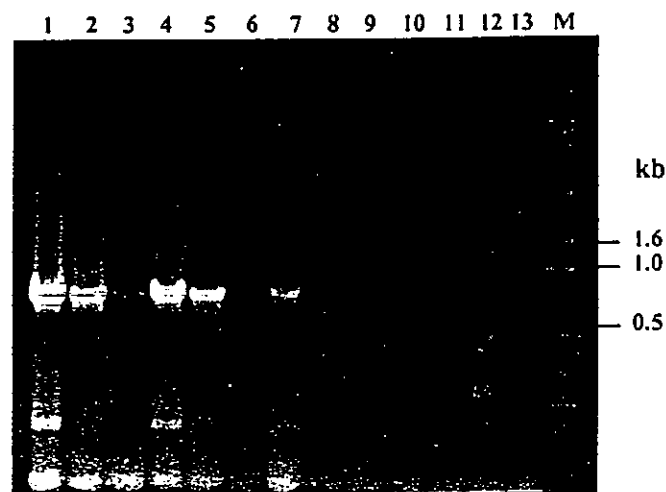
אילוח שונות

מספר הנבגים של פטריות אפלטוקסיגניות המאלחים גרעינים בצובר נמוך בדרך כלל. בכדי לפתח מערך גילוי מתאים למצב הקיים בצובר הגרעינים, 1 גר' תירס גרוס ומעוקר בהקרנה אולח ברמות שונות של נבגי *A. parasiticus* (0, 1-5, 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^6 נבגים/גר' תירס) והודגרו ב- $27 \pm 1^\circ\text{C}$ בטלטול, בכדי לאפשר התפתחות תפטיר. דוגמאות נלקחו לאחר פרקי זמן שונים (0, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 168 שעות). הדוגמאות נבדקו ברמת ה-DNA - ע"י שימוש בטכניקת ה-PCR (סעיף 2.2.3) וברמת החלבון - ע"י שימוש בטכניקת ה-ACP-ELISA (סעיף 2.2.14.2). בעבודה קודמת ראו כי הדגרת התירס המאולח עם מצע העשרה מקצרת את משך ההדגרה הנדרש לקבלת תוצר PCR, אך אינה תורמת בבדיקת התגובה הניגודית בטכניקת ה-ELISA (אייל, 1995), לכן לדוגמאות ששימשו לזיהוי ברמת ה-DNA הוסף מצע העשרה (PDB), בעוד שלדוגמאות ששימשו לזיהוי ברמת החלבון לא הוסף מצע העשרה.

3.2.1 שימוש בשיטת ה-PCR לזיהוי ספציפי של *A. parasiticus* בדוגמאות תירס מאולחות.

לאחר הדגרת הדוגמאות, כמתואר לעיל (סעיף 3.2), הופק DNA ושימש כתבנית בראקציית PCR (סעיף 2.2.3). בניסיונות קודמים תחלים 3 ו-4, המשלימים את קצוות 5' ו-3' של הגן *omt-1*, הראו ספציפיות לזיהוי גנום שתי הפטריות; *A. parasiticus* ו-*A. flavus* ולכן נבחרו לשמש בראקציית ה-PCR בעבודה זו (אייל, 1995). תוצרי ה-PCR הופרדו על ג'ל אגרוז 1% (סעיף 2.2.4). לא נצפה תוצר PCR ממיצוי DNA שנדגם מיד עם אילוח התירס בנבגי *A. parasiticus* גם ברמת אילוח גבוהה של 10^2 נבגים/גר' (תמונה 3.2.1 ערוץ 11), וכן לא התקבל תוצר PCR מדוגמאות שלא אולחו והודגרו במצע העשרה למשך 96 שעות (ערוץ 10). תוצר PCR בגודל של כ-1.2kb התקבל לאחר 12 שעות ברמת אילוח של 10^2 נבגים/גר' (ערוץ 7), לאחר 48 שעות ב- 10^2 נבגים/גר' (ערוץ 5) ולאחר 96 שעות ברמת אילוח של נבגים בודדים לגר' תירס (ערוץ 1).

עוצמת הפס, המעידה על כמות תוצר ה-PCR, התחזקה כפונקציה של משך ההדגרה; הפס שהתקבל בדוגמא שאולחה ב- 10^2 נבגים/גר' לאחר 48 שעות היה בעל עוצמה חזקה מזו של הדוגמא שהודגרה למשך 12 שעות ואולחה באותה רמה. דפוס דומה ניתן לראות גם בשאר רמות האילוח ובשאר זמני ההדגרה.



תמונה 3.2.1: תוצרי PCR עם DNA שהופק מתירס מאולח ברמות שונות של נבגים ובזמני הדגרה שונים במצע העשרה.

בראקציה שימשו תחלים המשלימים את קצוות 5' ו-3' של הגן *omt-1*.

M - סמני גודל, 96 שעות: 1 - 10^2 נבגים/גר', 2 - 10 נבגים/גר', 3 - 1 נבגים/גר',

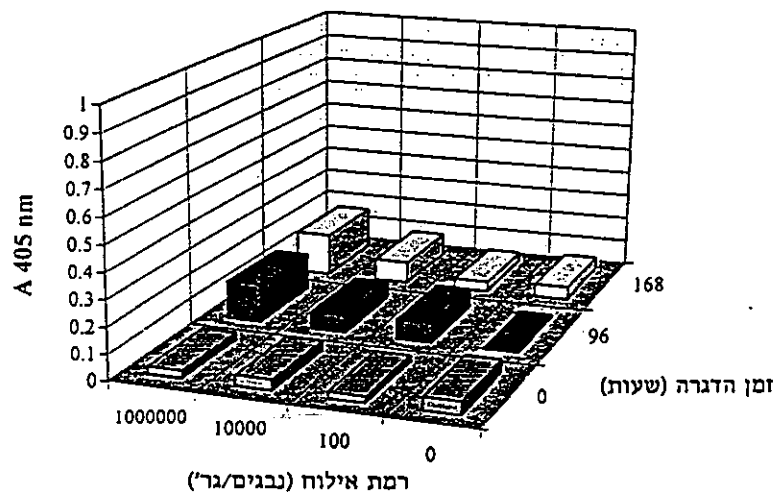
48 שעות: 4 - 10^2 נבגים/גר', 5 - 10 נבגים/גר', 6 - 1 נבגים/גר',

12 שעות: 7 - 10^2 נבגים/גר', 8 - 10 נבגים/גר', 9 - 1 נבגים/גר',

ביקורות: 10 - 96 שעות, 0 נבגים/גר', 11 - 0 שעות, 10^2 נבגים/גר', 12 - 0 שעות, 0 נבגים/גר',

13 - ביקורת שלילית לניסוי (מבחנה ללא DNA).

3.2.2 זהו ספציפי של *A. parasiticus* בדוגמאות תירס מאולחות בשיטת ה-ELISA. מוצו חלבונים מדוגמאות התירס המאולחות בנבגי *A. parasiticus* (סעיף 2.2.14.1). הפרקציה החלבנית שימשה בראקציית ACP-ELISA עם נוגדנים פוליקלונליים שהושרו נגד החלבון הכימרי GST-APA-2. באיור 3.2.2 ניתן לראות את עוצמת הבליעה (405nm) כפונקציה של רמת האילוח וזמן ההדגרה. הנתונים בגרף חושבו כממוצע של 6 חזרות בכל רמת אילוח ובכל זמן הדגרה. ניתן לראות כי השיטה אינה רגישה מספיק ולא ניתן לזהות באמצעותה דוגמאות מאולחות ברמות אילוח נמוכות ובזמני הדגרה קצרים. גם ברמות אילוח גבוהות (10^6 נבגים/גר') לאחר 96 שעות הדגרה רמת הבליעה אינה מאפשרת זיהוי תגובה חיובית עם הנוגדן, ונחשבת לבליעת רקע ($O.D_{405} = 0.166$).



איור 3.2.2: בליעה אופטית של נוגדנים פוליקלונליים, שהושרו נגד מקטע הגן *ver-1*, עם מיצויים מגרעיני תירס מאולחים בנבגי *A. parasiticus* (רמות אילוח שונות וזמני הדגרה שונים) במבחן ACP-ELISA.

3.3 בדיקת התבדיד *Aspergillus flavus* NRRL649 שאינו אפלטוקסיגני

(ת.649) ע"י שימוש בטכניקות הגילוי השונות

נערכו בדיקות יצירת אפלטוקסין, PCR, RT-PCR, ו-ELISA לתבדיד *A. flavus* NRRL649 שאינו אפלטוקסיגני (להלן ת.649), במטרה לאפינו ובמטרה לבדוק את ספציפיות טכניקות הגילוי השונות. כביקורת חיובית שימש תבדיד *A. flavus* אפלטוקסיגני.

3.3.1 בדיקת יצירת אפלטוקסין בתבדיד *A. flavus* NRRL649 שאינו אפלטוקסיגני (ת.649)

הפטירות גודלו ע"ג מצע תירס ו-PDA ב- $27 \pm 1^\circ\text{C}$, תנאים המעודדים בד"כ את יצירת הרעלן בתבדידים אפלטוקסיגנים. נבדקה יצירת אפלטוקסין לאחר 3, 5, ו-7 ימים בשיטה הסטנדרטית (Anon, 1995) (סעיפים 2.2.9 ו-2.2.10). בנוסף, נבדקו מדדים המלמדים על גידול הפטריה; קוטר המושבה ומשקל יבש המופיעים בטבלה 3.3.1 (סעיפים 2.2.11.1, 2.2.11.2). ת.649 לא יצר אפלטוקסין באף אחד ממצעי הגידול גם לאחר 7 ימים, בניגוד לתבדיד האפלטוקסיגני שיצר את הרעלן לאחר 3 ימים על שני מצעי הגידול. רמת יצור הרעלן בתבדיד האפלטוקסיגני עלתה כפונקציה של הזמן. גידול התבדיד האפלטוקסיגני ע"ג PDA (2500 ppm) עודד את יצירת הרעלן יותר מאשר גידולו ע"ג מצע תירס (1500 ppm) לאחר 7 ימים. מטבלה 3.3.1 ניתן לראות בבירור כי שיעור גידול התבדידים היה כמעט זהה על פי שני המדדים שנבדקו (משקל יבש וקוטר המושבה).

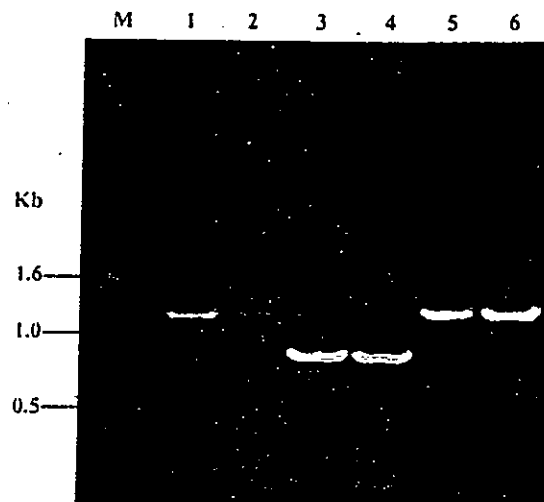
טבלה 3.3.1: מדדי גידול ויצירת אפלטוקסין כפונקציה של הזמן בשני תבדירי *A. flavus* שגודלו

ע"ג PDA ומצע תירס

קוטר המושבה (mm)			משקל יבש (גר/צלחת)			כמות אפלטוקסין (ppm)			זמן (ימים) \Leftarrow
7	5	3	7	5	3	7	5	3	
31.8	49.0	71.7	0.0197	0.0557	0.1490	2500	3750	25000	PDA <i>A. flavus</i>
26.2	47.0	64.2	0.0355	0.0448	0.1072	0	0	0	ת.649
30.0	52.0	74.3	0.0213	0.0791	0.1158	1000	1000	1500	תירס <i>A. flavus</i>
29.0	49.1	69.3	0.0129	0.0769	0.1812	0	0	0	ת.649

3.3.2 בדיקת התבדיר *A. flavus* NRRL649 בשיטת ה-PCR

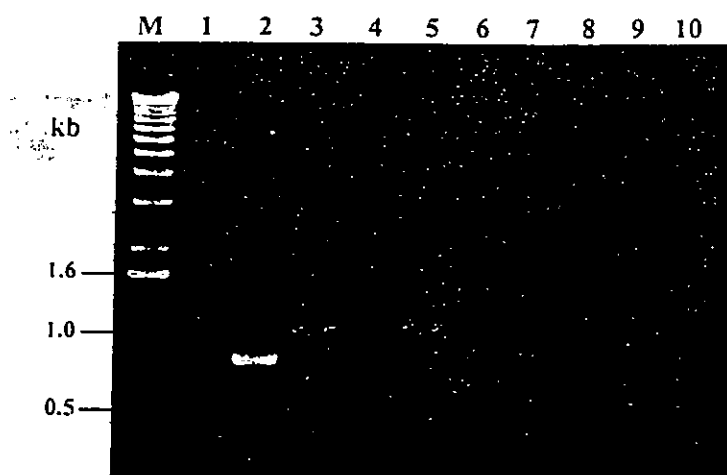
DNA מוצה מתבדיר *A. flavus* NRRL649 שאינו אפלטוקסיגני (ת.649) ושימש כתבנית בראקציית PCR (סעיפים 2.2.1.1, 2.2.3). זוגות התחלים 1 ו-2, 3 ו-4, 5 ו-6, ששימשו בראקציה משלימים את קצוות 5' ו-3' של הגנים *ver-1*, *omt-1*, ו-*nor-A*, בהתאמה. תוצרי ה-PCR הופרדו על גל אגרוז 1% (סעיף 2.2.4). כביקורת שימש DNA שמוצה מתבדיר *A. flavus* אפלטוקסיגני. שני התבדירים הראו דפוס דומה ב-PCR בשלושת הגנים שנבדקו (תמונה 3.3.2). התקבל תוצר PCR בגודל של כ-1.2kb עם תחלים לגן *omt-1* (ערוצים 1 ו-2), כ-1.0kb עם תחלים לגן *ver-1* (ערוצים 3 ו-4), וכ-1.2kb עם תחלים לגן *nor-A* (ערוצים 5 ו-6).



תמונה 3.3.2: תוצרי PCR שהתקבלו מתבנית DNA של תבדיר *A. flavus* NRRL649 (ת.649) ותבדיר *A. flavus* אפלטוקסיגני (w). בראקציה שימשו תחלים המשלימים לקצוות 5' ו-3' של הגנים *nor-A*, *ver-1*, *omt-1*.
M - סמני גודל, 1 - w, *omt-1*, ת.649, 2 - *omt-1*, w, 3 - *ver-1*, w, 4 - *ver-1*, ת.649, 5 - w, *nor-A*, 6 - *nor-A*, ת.649.

3.3.3 זיהוי התבדיר *A. flavus* NRRL649 בשיטת ה-RT-PCR

RNA מוצה מתבדיר *A. flavus* המפריש אפלטוקסין והתבדיר שאינו אפלטוקסיגני (ת.649) שגודלו במצע PDB למשך 48, ו-72 שעות (סעיף 2.2.5.1). זוגות התחלים 3'-ו-4, 1'-ו-2, ששימשו בראקציה ה-RT-PCR משלימים את קצוות 5' ו-3' של הגנים *omt-1*, ו-*ver-1*, בהתאמה (סעיף 2.2.8). תוצרי הראקציה הופרדו על ג'ל אגרוז 1% (סעיף 2.2.4). במבחנה שלא הכילה RNA, ושימשה כביקורת שלילית לראקציה, לא התקבל תוצר RT-PCR (תמונה 3.3.3 ערוץ 1). התקבל תוצר בגודל של כ-0.8kb במבחנה ששימשה כביקורת חיובית והכילה מיצוי RNA מתפטיר הפטריה *A. parasiticus* לאחר 48 שעות ותחלים המשלימים את הגן *ver-1* (ערוץ 2). באף אחת משש הראקציות שהכילו מיצוי RNA מת.649 לא התקבלו תוצרי RT-PCR (ערוצים 4, 6, 8, 10, 12, 14). כשנעשה שימוש במיצוי RNA מהתבדיר האפלטוקסיגני (48 ו-72 שעות) התקבל פס בגודל של כ-1kb ופס נוסף לא ספציפי בגודל של כ-0.5kb בראקציות עם תחלים לגן *omt-1* (ערוצים 3 ו-5). עוצמת הפסים לאחר 72 שעות היתה מעט חלשה יותר בהשוואה לפסים שהתקבלו לאחר 48 שעות. פס יחיד בגודל של כ-0.8kb התקבל בראקציה של מיצוי RNA מהתבדיר מפריש הרעלן ותחלים לגן *ver-1* (ערוצים 7 ו-9). עוצמת הפס לאחר 72 שעות היתה חלשה בהרבה בהשוואה לפס שהתקבל לאחר 48 שעות.



תמונה 3.3.3: תוצרי RT-PCR שהתקבלו מתבנית RNA של תבדיר *A. flavus* NRRL649 (ת.649) ותבדיר *A. flavus* אפלטוקסיגני (w). בראקציה שימשו תחלים המשלימים לקצוות 5' ו-3' של הגנים *omt-1*, ו-*ver-1*.

M - סמני גודל, 1 - ביקורת שלילית לניסוי (מבחנה ללא RNA), 2 - ביקורת חיובית לניסוי (RNA מהפטריה *A. parasiticus*), *omt-1*: 3 - w, 48 שעות, 4 - ת.649, 48 שעות, 5 - w, 72 שעות, 6 - ת.649, 72 שעות, *ver-1*: 7 - w, 48 שעות, 8 - ת.649, 48 שעות, 9 - w, 72 שעות, 10 - ת.649, 72 שעות.

3.3.4 זיהוי התבדיד *A. flavus* NRRL649 בשיטת ה-ACP-ELISA

תגובה אימונית חלשה ($O.D_{405}=0.406$), הנחשבת לבליעת רקע, התקבלה בהגבת מיצוי חלבוני מת-649 עם נוגדני GST-VER-RT, בדומה לתגובה שהתקבלה עם מיצוי חלבוני מתירס ($O.D_{405}=0.387$) (איור 3.1.2.3). במיצוי חלבוני מתבדידים אפלטוקסיגניים, לעומת זאת, התקבלה תגובה אימונית חזקה; $O.D_{405}=2.151$ - *A. parasiticus*, $O.D_{405}=0.930$ - *A. flavus*, ו- $O.D_{405}=0.710$ - *A. tamarii*. ההבדל בעוצמות הבליעה בין הפטריות האפלטוקסיגניות לת-649 ולתירס הוא גדול ומאפשר לזהות בוודאות נוכחות הפטריות האפלטוקסיגניות. התוצאות נדונות בפירוט בסעיף 3.1.2.3.

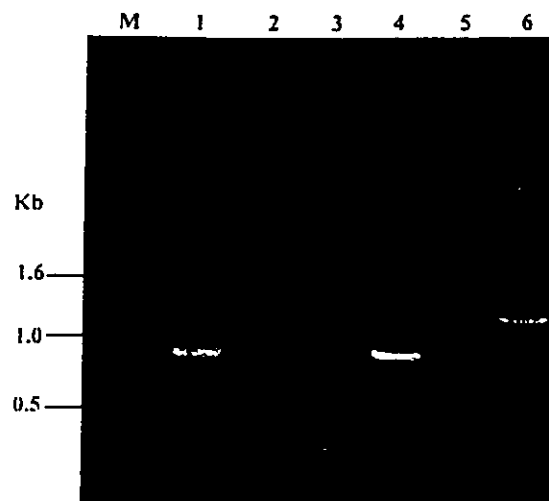
3.4 בדיקת התבדיד *Aspergillus tamarii* NRRL649 ע"י שימוש בטכניקות

הגילוי השונות

A. tamarii NRRL25517 דווח כתבדיד אפלטוקסיגני (Goto et al., 1996). בבדיקה שנערכה נראה ייצור אפלטוקסין לאחר שהפטריה גודלה במשך 7 ימים על גבי מצע תירס (סעיף 2.2.9). הוחלט לכן לבדוק את התבדיד בשיטות ה-PCR וה-ELISA. כביקורת חיובית בבדיקות שימש תבדיד *A. parasiticus* אפלטוקסיגני.

3.4.1 בדיקת התבדיד *A. tamarii* NRRL649 בשיטת ה-PCR

DNA מוצה מתבדיד *A. tamarii* NRRL25517 אפלטוקסיגני ושימש כתבנית בראקציית PCR (סעיפים 2.2.1.1, 2.2.3). זוגות התחלים 1 ו-2, 3 ו-4, 5 ו-6, ששימשו בראקציה משלימים את קצוות 5' ו-3' של הגנים *ver-1*, *omt-1* ו-*nor-A*, בהתאמה. תוצרי ה-PCR הופרדו על ג'ל אגרוז 1% (סעיף 2.2.4). שני התבדידים הראו דפוס דומה ב-PCR בשלושת הגנים הנבדקים (תמונה 3.4.1). התקבל תוצר PCR בגודל של כ-0.8kb עם תחלים לגן *ver-1* (ערוצים 1, 4), כ-1.2kb עם תחלים לגן *omt-1* (ערוצים 2, 5), וכ-1.2kb עם תחלים לגן *nor-A* (ערוצים 3, 6).



תמונה 3.4.1: תוצרי PCR שהתקבלו מתבנית DNA של תבדיר *A. tamaritii* NRRL25517 (t) ותבדיר *A. parasiticus* אפלטוקסיגני (w). בראקציה שימשו תחלים המשלימים לקצוות 5' ו-3' של הגנים *omt-1*, *ver-1*, ו-*nor-A*.

M - סמני גודל, 1 - *ver-1*, w - 2, *omt-1*, w - 3, *nor-A*, t - 4, *ver-1*, t - 5, *omt-1*, t - 6, *nor-A*.

3.4.2 זיהוי התבדיר *A. tamaritii* NRRL649 בשיטת ה-ACP-ELISA

תגובה אימונית חזקה ($O.D_{405}=0.710$), התקבלה בהגבת מיצוי חלבוני מהתבדיר *A. tamaritii* NRRL649 עם נוגדני GST-VER-RT, בדומה לתגובה שהתקבלה עם מיצוי חלבוני מהפטריה האפלטוקסיגנית *A. flavus* ($O.D_{405}=0.930$) (איור 3.1.2.3). במיצוי חלבוני מת-649 שאינו אפלטוקסיגני ותירס, לעומת זאת, התקבלה תגובה אימונית חלשה; $O.D_{405}=0.406$ ו- $O.D_{405}=0.387$, בהתאמה. ההבדל בעוצמות הבליעה בין הפטריות האפלטוקסיגניות, וביניהן תבדיר *A. tamaritii* NRRL649, לת-649 ולתירס מאפשר לזהות בוודאות נוכחות הפטריות האפלטוקסיגניות. התוצאות נדונות בפירוט בסעיף 3.1.2.3.

פטירות עובש המאלחות גרעינים מאוסמים ומזון יבש עלולות לגרום נזקים כבדים המתבטאים בירידה באיכות ובפגיעה בערכים תזונתיים. בנוסף יוצרות רבות מן הפטריות רעלנים - מיקוטוקסינים, הפוגעים במגוון מערכות ואיברים בגוף. מבין הרעלנים, אלה המשתייכים לקבוצת האפלטוקסינים נחשבים כיום כמסוכנים ביותר, בעיקר עקב פגיעתם בכבד, בו הם מעוררים, גם בכמויות קטנות, התפתחות גידולים סרטניים.

להערכת כמות האינקולום בגרעינים מאוסמים ובמוצרי מזון נודעת חשיבות רבה בקביעת משטר אחסון. מוצרים אשר רמת האינקולום בהם גבוהה מועדים להנגע מהר יותר ורמת הנזק בהם תהיה גבוהה. יתרה מזאת, קביעת רמת האוכלוסייה חייבת להיות מלווה גם בקביעת המינים השולטים. קביעת רמת האינקולום מכל סוג, סווג למינים וזיהוי קווים מיקוטוקסיניים עשויים להעיד על אפשרות זיהום הגרעינים במיקוטוקסינים ויותר מכל - להוות אמצעי התראה מפני היווצרות רעלנים כאלה בעת אחסון התוצרת ומוצרית. זיהוי מוקדם של הפטריות, עוד לפני יצירת הרעלנים, חשוב ביותר כיוון שהרעלנים הנוצרים על ידן אינם ניתנים להשמדה בתהליכי עיבוד שונים והם ממשיכים להוות סכנה בריאותית. בין השיטות המשמשות לגילוי פטריות, קיימות שיטות ישירות ושיטות עקיפות (Clarke, 1968; Jarvis et al., 1983; Lacey et al., 1980). בין השיטות הישירות ניתן למנות את שיטת הזריעה הישירה ואת שיטת המיהולים. על השיטות העקיפות נמנות שיטות המתבססות על פליטת CO_2 ועל זיהוי מרכיבי דופן כגון ארגוסטרול וכיטין. השיטה הנפוצה כיום להערכת רמת הנגיעות היא שיטת המיהולים. חסרונותיה העיקריים הם הזמן הרב הדרוש לביצוע הבדיקה והעדר אחידות בתוצאות המתקבלות בין המעבדות הבודקות, עקב שגיאות אפשריות במהלך הביצוע. חשיבות גילויין המוקדם של הפטריות בצובר ואבחנה בין מינים יוצרי מיקוטוקסינים לכאלה שאינם, מחייבת פיתוח שיטות חדשות, מהירות, רגישות ומדויקות יותר לזיהוי פטריות. עבודה זו עוסקת בפיתוח שיטות המיישמות טכניקות מתקדמות המשמשות למחקר ולאנליזת פתוגנים שונים במזון ובצמחים. השיטות כוללות בעיקר את טכניקת ה-Polymerase Chain Reaction (PCR), המתבססת על הימצאות גן ספציפי ומשמשת כיום לזיהוי פתוגנים בצמחים וביניהם: *Verticillium* spp. ו-*Fusarium moniliforme* (Blakemore et al., 1994; Ersek et al., 1994; Robb et al., 1994). גם תעשיית המזון מנצלת את שיטת ה-PCR לזיהוי מיני חיידקים פתוגנים כגון *Vibrio cholerae* (Koch et al., 1993; Van brunt, 1990). שיטה נוספת, המתבססת על הימצאות חלבון ספציפי, היא Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) המנוצלת אף היא לגילוי פתוגנים שונים; *Mucor racemosus* (Notermans and Parker, 1990; De Ruiter et al., 1994; Heuvelman, 1985).

יצירת אפלטוקסינים ספציפית לפטריות מקבוצת *Aspergillus flavus*: *A. flavus*, *A. nomius*, *A. parasiticus* ו-*A. tamarii*. מבין המינים המוזכרים *A. nomius* ו-*A. parasiticus* יוצרים ארבעה אפלטוקסינים G_1 , G_2 , B_1 , B_2 ואילו *A. flavus* ו-*A. tamarii* יוצרים AFB_1 ו-

AFB₂ (Goto *et al.*, 1996, 1997). בעבודה זו הושם דגש מיוחד על מסלול הביוסינתזה של AFB₁ כיוון שתרכובת זו היא השכיחה ביותר והקריצינוגנית ביותר מבין ארבעת האפלטוקסינים העיקריים (Bhatnagar *et al.*, 1993). בנוסף, מרבית החוקרים סוברים כי אפלטוקסינים שונים נגזרים מ-AFB₁ (Gourama and Bullerman, 1995). במסלול הביוסינתזה של AFB₁ והבקרה עליו בפטריה *A. parasiticus* מעורבים לפחות 17 גנים המאורגנים בגנום כ"קבוצת גנים" (gene cluster) בפרגמנט באורך של 75kb (Yu *et al.*, 1997). מיקום הגנים וכיוון שיעתוקם זהה לזה של *A. flavus* קיים שוני בין שתי הפטריות במרחק בין הגנים השונים (Yu *et al.*, 1995). בעבודות קודמות הוכח כי ארבעה גנים (*omt-1* ו-*ver-1*, *nor-A*, *apa-2*), המשתתפים במסלול הביוסינתזה של AFB₁, ספציפיים לזיהוי פטריות אפלטוקסיגניות מהסוגים *A. flavus* ו-*A. parasiticus* (Shapira *et al.*, 1996; Geisen, 1997). הגן *apa-2* (המכונה גם *affR*) (Chang *et al.*, 1993) אחראי למעבר מפוליקסיד ל-NOR ועל בקרת מסלול הביוסינתזה כולו, הגן *norA* מזרז מעבר מ-NOR ל-AVN (Chang *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1997), הגן *ver-1* מזרז מעבר מ-VA ל-ST (Skory *et al.*, 1992), והגן *omt-1* (המכונה גם *omt-A*) מזרז מעבר מ-ST ל-OMST (Yu *et al.*, 1993).

סינתזת קטע ב-PCR מבוססת על הגברת קטע DNA על ידי הגדרתו בשני צידיו בתחלים ספציפיים והארכת התחלים על ידי האנזים *Taq* DNA polymerase. ה-DNA המשמש כתבנית ל-PCR אינו צריך לעבור הפקה מסובכת וניקוי. ניתן להשתמש בתחלים ספציפיים לזיהוי קטע ה-DNA גם בדוגמא גולמית, כך שפעמים רבות אין צורך למצות את ה-DNA וניתן להשתמש במשקע תאים גולמי כתבנית ל-PCR (Steffan and Atlas, 1991; Arnheim and Erlich, 1992; Henson and French, 1993). תכונה זו של ה-PCR מאפשרת זיהוי של פטריות *micorrhiza*, חלדונות, קמחונות ופרזיטים אובליגטוריים נוספים. עד היום נעשה שימוש רב ב-PCR לחקר מחלות צמחים כמו: *Verticillium* (Carder *et al.*, 1994; Robb *et al.*, 1994), *Phytophthora* (Ersek *et al.*, 1994; Stammler and Seemuller, 1994), *Stemocarpella maydis* (Blakemore *et al.*, 1994), לאחרונה פורסמו מחקרים המיישמים שיטה זו לגילוי פטריות אפלטוקסיגניות במזון (Shapira *et al.*, 1996; Färber *et al.*, 1997; Geisen, 1997). בעבודה זו יושמה שיטת ה-PCR לגילוי וזיהוי פטריות מקבוצת ה-*A. flavus* המאלחות צוברי גרעינים ומייצרות, תוך כדי התפתחותן, אפלטוקסינים הפוגעים באדם ובבעלי חיים.

תבדיר NRRL649 *A. flavus* (להלן ת.649) דווח כגזע שאינו אפלטוקסיגני. תבדיר זה חסר מקטע DNA בגודל של לפחות 120kb, המכיל את קבוצת הגנים (gene cluster) המשתתפים במסלול הביוסינתזה של אפלטוקסין (Woloshuk *et al.*, 1995; Prieto *et al.*, 1996). ת.649 ותבדיר *A. flavus* אפלטוקסיגני גודלו בתנאים שמעודדים בד"כ את יצירת הרעלן בתבדירים אפלטוקסיגניים. למרות ששיעור גידול התבדירים היה כמעט זהה על פי שני המדדים שנבדקו

(משקל יבש וקוטר המושבה), נמצא כי ת.649 לא ייצר את הרעלן גם לאחר 7 ימים, בעוד שהתבדיד האפלטוקסיגני ייצר את הרעלן לאחר 3 ימים, ורמת ייצור הרעלן עלתה כפונקציה של הזמן (טבלה 3.3.1). כדי לבחון את רגישות השיטה, נבדק ת.649 ברמת ה-DNA על ידי שימוש בטכניקת ה-PCR עם תחלים המשלימים את קצוות 5' ו-3' של הגנים *nor-A*, *omt-1*, *ver-1*. שני התבדידים הראו דפוס דומה ב-PCR בשלושת הגנים שנבדקו (תמונה 3.3.2). תוצאות אלה סותרות את הטענה שת.649 אינו מכיל את קבוצת הגנים המשתתפים במסלול יצירת האפלטוקסין, כפי שדווח על ידי Woloshuk et al. (1995). האפשרות כי התוצרים שהתקבלו אינם ספציפיים עקב תנאי החמרה נמוכים בראקציות ה-PCR אינה סבירה, כיוון שהתקבלו תוצרים בגודל זהה לאלה שהתקבלו עם הגזע האפלטוקסיגני בשלושת הראקציות. הניסוי נערך בשתי חזרות והביקורות השליליות לא זוהמו, לכן סביר מאוד להניח כי בעת המשך העברתו ושימורו של ת.649 חל זיהום במערכת הגידול. בכל אופן, יש לבדוק את התבדיד ברמת ה-DNA בשיטת זיהוי נוספת. טרנספורמנטים שונים של ת.649, אליהם הוחדרו גנים שונים ממסלול יצירת האפלטוקסין; *nor-1*, *afIR*, *omt-1*, ומקטע DNA נוסף בקצה 3' של הגן *omt-1* נבדקו ברמת הגנום בטכניקת ה-Southern blot. כל אחד מהטרנספורמנטים הגיב רדיואקטיבית רק עם הגלאי לגן שהוחדר לתוכו תוך שימוש בגלאים ספציפיים לאותם מקטעי DNA (Prieto et al., 1996). יש לחזור על ניסוי ההיברידיזציה עם ת.649 כדי לוודא שאכן מדובר באותו תבדיד.

ת.649 נבדק ברמת ה-RNA על ידי שימוש בטכניקת ה-RT-PCR עם תחלים המשלימים את קצוות 5' ו-3' של הגנים *omt-1*, *ver-1* כדי לראות אם אותם גנים משועתקים. הגנים *ver-1* ו-*nor-1* משועתקים ברמה מקסימלית לאחר הדגרה של 60-72 שעות במצע מינימלי מוגדר בפטריה *A. parasiticus* (Skory et al., 1993). כיוון שנבגו התבדידים הודגרו במצע העשרה, בתנאים בהם חלבונים המשתתפים במסלול יצירת האפלטוקסין מתבטאים לאחר 72 שעות, נלקחו דגימות למיצוי RNA לאחר 48 ו-72 שעות. באף אחת מהראקציות שהכילו מיצוי RNA מת.649 (לאחר 48 ו-72 שעות) לא התקבלו תוצרי RT-PCR (תמונה 3.3.3), עובדה המלמדת כי לא חל שיעתוק של הגנים. לעומת זאת, כשנעשה שימוש במיצוי RNA מהתבדיד האפלטוקסיגני התקבל פס בגודל של כ-1kb ופס נוסף לא ספציפי בגודל של כ-0.5kb בראקציות עם תחלים לגן *omt-1*, ופס יחיד בגודל של כ-0.8kb התקבל בראקציה עם תחלים לגן *ver-1*. עוצמת הפסים לאחר 72 שעות הייתה מעט חלשה יותר בהשוואה לפסים שהתקבלו לאחר 48 שעות בראקציות. מתוצאות אלה ניתן להסיק כי במצע העשרה (PDB נוזלי) מסלול ביוסינתזת האפלטוקסין מעודד ומתרחש מוקדם יותר מאשר במצע מינימלי אודות להתפתחות מואצת של התפטר.

לאחרונה בודדו גזעים אפלטוקסיגניים של הפטריה *A. tamaraii* משדות תה ביפאן (Goto et al., 1996, 1997). בבדיקה שנערכה נראה ייצור אפלטוקסין לאחר שהפטריה גודלה במשך 7 ימים על גבי מצע תירס. הוחלט לכן להמשיך ולבדוק את התבדיד. בדיקת ה-PCR נערכה עם תחלים המשלימים את קצוות 5' ו-3' של הגנים *nor-A*, *omt-1*, *ver-1*. תבדיד ה-*A. tamaraii*

דפוס דומה לתבדיר *A. parasiticus* אפלטוקסיגני ששימש כביקורת חיובית; התקבל תוצר PCR בגודל של כ-0.8kb עם תחלים לגן *ver-1*, כ-1.2kb עם תחלים לגן *omt-1*, וכ-1.2kb עם תחלים לגן *nor-A* (תמונה 3.4.1). התבדיר האפלטוקסיגני של הפטריה *A. tamaritii* עדיין לא אופיין גנטית וטרם נקבע אם הוא מכיל את קבוצת הגנים המשתתפים במסלול ביוסינתזה האפלטוקסין. בהסתמך על תוצאות אלה, סביר להניח כי גנום התבדיר מכיל את קבוצת הגנים.

נוגדנים משמשים לזיהוי של חומרים רבים במזון כגון תרכובות בעלות משקל מולקולרי נמוך (אפלטוקסינים) ופתוגנים (*Salmonella* spp., *Listeria* spp.) (Lee and Morgan, 1993). נוגדנים פוליקלונליים הוכנו כנגד מבנים שונים של הפטריות: קורים ונבנים (Banks et al., 1992), או כנגד חומרים ומטבוליטים הנוצרים על ידן: הפרשת פוליסכרידים ספציפיים, מקורי הפטריה (Kamphuis and Notermans, 1992; Noterman and Kamphuis, 1992; De Ruiter et al., 1992, 1993) וחלבונים ספציפיים המופרשים במסלולי ביוסינתזה יחודיים לפטריה (Paster et al., 1994; Shapira et al., 1996). נוגדנים שהושרו נגד תפטיר הפטריה היו ספציפיים ברמת הסוג ולא ברמת המין, או שהיו טובים לגילוי תפטירים בלבד ולא זיהו נבנים של הפטריות שקוריהן שימשו כאנטיגן. הן הקורים והן המטבוליטים שנשטפו מהם מצויים בשלב מתקדם של התפתחות הפטריה ולכן נבנים אינם ניתנים לזיהוי על ידם. נוגדנים שהושרו כנגד מיצוי חלבוני מתפטירי הפטריה *A. parasiticus* התגלו כספציפיים לזיהוי הפטריות האפלטוקסיגניות *A. parasiticus* ו-*A. flavus* עם 1.5% "false negative" ו-3.3% "false positive" במערכת בה נבדקו 126 תבדירים שונים של פטריות (Tsai and Yu, 1997). לעומת זאת, נוגדנים פוליקלונליים שהושרו נגד גן ספציפי במסלול ביוסינתזה האפלטוקסין, *ver-1*, התגלו כבעלי ספציפיות לגזעים המפרישים את הרעלן (Shapira et al., 1996).

בעבודה זו שובט קטע מהגן *apa-2* לפלסמיד pGEX-GST בהמשך למסגרת הקריאה המקודדת לקצה הקרבווקסילי של החלבון Glutathione-S-transferase (GST). הפפטיד APA-2 הוא קטע מהאנזים האחראי למעבר מפוליקסיד ל-NOR ועל בקרת מסלול ביוסינתזה AFB₁ בפטריות *A. parasiticus* ו-*A. flavus* (Chang et al., 1993, 1995; Woloshuk et al., 1994), ולכן ימצא בפטריה כאשר תייצר את הרעלן. קטע הגן ששובט באורך 0.6kb מקודד לכ-200 חומצות אמינו ולכן משקל החלבון הכימרי מוערך בכ-50kD.

בהסתמך על עבודה קודמת, בה התקבלה תגובה ניגודית רגישה ביותר כאשר הנוגדנים הושרו כנגד צורתו הדנטורטיבית של מקטע החלבון GST-VER-1 (אייל, 1995), נוגדנים פוליקלונליים הושרו בארנבות נגד צורתו הדנטורטיבית של החלבון GST-APA-2. הנוגדנים הפוליקלונליים שהופקו מהארנבות שימשו בטכניקת Antigen Coated Plate (ACP), שיטות ה-ELISA, ACP ו-Double Antibody Sandwich (DAS), תוארו במחקרים רבים העוסקים בפתוגניות בצמחים (Clarke, 1981; Clarke et al., 1986; Notermans and Heuvelman, 1985; De Ruiter et al., 1992, 1993). השיטה נחשבת למהירה מהשיטות הקונבנציונליות. השיטה מדויקת בהרבה

מהשיטות הקונבנציונליות כיוון שהיא נותנת תשובה חד משמעית לגבי זהות הפטריה ואף ניתן לקבוע בעזרתה את כמות הפתוגן בדוגמא. ELISA היא שיטה אימונולוגית נפוצה ביותר כיוון שהיא מאפשרת לערוך מספר בדיקות רב תוך זמן קצר (Roitt *et al.*, 1985). ישנם מחקרים הקובעים כי שיטה זו יעילה לזיהוי פטריות בעזרת נוגדנים שהושרו כנגד פוליסכרידים שהופרשו מקורי הפטריה, אף יותר מזהווי חיידקים המתבסס על חומרים המצויים בדופן התא שלהם. סף גילוי הפטריות שדווח היה 1 ng פטריה למ"ל דוגמא (De Ruiter *et al.*, 1993).

בשיטת ה-ACP-ELISA נמדדה עוצמת התגובה האימונית לאנטיגנים השונים. נבדקה ספציפיות הזיהוי לפטריות האפלטוקסיגניות *A. parasiticus* ו-*A. flavus* מבין פטריות שנמצאות בדרך כלל בגרעינים ובמזונות. בנוסף נבדק תירס שנבחר לשמש כמערכת מודל לזיהוי פטריות אפלטוקסיגניות בשל היותו רגיש לתקיפת פטריות אלה. תגובה חזקה התקבלה בפטריה האפלטוקסיגנית *A. parasiticus* ממנה נלקח הגן להשראת הנוגדנים (תמונה 3.1.1.4). הפטריה האפלטוקסיגנית *A. flavus* נתנה תגובה חזקה אף יותר. בגנום הפטריה *A. flavus* נוכח הגן *afl-2* בעל הומולוגיות רבה (מעל 96%) לרצף הגן *apa-2*. יתכן כי ההבדל בעוצמת התגובה לנוגדן בראקציית ה-ELISA נובע מכך שביטוי הגן *afl-2* ב-*A. flavus* חזק יותר מאשר הגן *apa-2* בפטריה *A. parasiticus* בתנאי הניסוי. בנוסף, Chang *et al.* (1995a) הראו כי הגן *apa-2* מהפטריה *A. parasiticus* מסוגל להחזיר את פעילות המסלול הביסניטטי ליצירת אפלטוקסין במוטנט *A. flavus afl-2*, חסר הגן *afl-2*. מאחר ומסלול הפוליקטידים נפוץ בין פטריות, ניתן היה לצפות כי נוגדנים שהושרו כנגד החלבון GST-APA-2 יגיבו עם טווח רחב של פטריות כיוון שהגן *apa-2* מתפקד כגורם מווסת במסלול (Chang *et al.*, 1995a). למרות זאת, בפטריות שאינן מייצרות את הרעלן ובתירס התקבלה בליעה נמוכה מאוד הנחשבת לבליעת רקע. ההבדל בעוצמות הבליעה בין הפטריות האפלטוקסיגניות לאלה שאינן הוא גדול ומאפשר לזהות בוודאות נוכחות הפטריות האפלטוקסיגניות. תוצאות אנליזת Western blot הראו כי הנוגדנים שיוצרו כנגד החלבון APA-2 נתנו תגובה אימונית ספציפית עם החלבון הנטיבי של הפטריה. בהשוואת ספציפיות הנוגדנים הפוליקלונליים שיוצרו על ידי שימוש בתוצרי הגנים *ver-1* ו-*apa-2*, ניתן לראות כי pAb שהושרו נגד החלבון הכימרי GST-APA-2 היו ספציפיים יותר מאלה שהופקו כנגד החלבון הכימרי GST-VER-1 על ידי Shapira *et al.* (1997), דבר שבא לידי ביטוי בערכי בליעה גבוהים יותר בתגובה ניגודית עם נוגדני APA-2 לעומת VER-1 ; $O.D_{405} = 1$ עם נוגדני VER לעומת $O.D_{405} = 1.6$ עם נוגדני APA-2.

במטרה לקבל נוגדן רגיש יותר הוחלט להפיק נוגדנים המושרים כנגד רצף הגן כולו. בודד RNA מקורי הפטריה ושובטו רצפי ה-cDNA המקודדים לחלבונים השלמים VER-1 (להלן VER-RT) ו-APA-2 (להלן APA-RT) בהמשך למסגרת הקריאה המקודדת לקצה הקרובוקסילי של החלבון GST. לחלבון השלם יתרונות בקבלת נוגדנים על פני פפטיד המהווה קטע ממנו, בכך שהוא מציג אפיטופים רבים לקבלת מספר רב יותר של נוגדנים פוליקלונליים. הפפטיד עלול לא

לכלול את כל האפיטופים אפילו אם המבנה המרחבי שלו ידמה לזה של החלבון השלם. הגן *apa-2* באורך של כ-1.2 kb מקודד לכ-400 חומצות אמינו ולכן שוקל החלבון הכימרי GST-APA-RT כ-70kD. עוצמת התגובה האימונית של נוגדנים אלה נבדקת בימים אלה. בעתיד יערכו ניסויים בהם ישמש החלבון GST-APA-RT כנוגדן לזיהוי פטריות אפלטוקסיגניות.

הגן *ver-1* באורך של כ-0.8 kb מקודד ל-260 חומצות אמינו ולכן שוקל החלבון הכימרי GST-APA-RT כ-70kD. עוצמת התגובה האימונית של נוגדנים שהושרו נגד החלבון VER-RT נמדדה בשיטת ה-ACP-ELISA עם האנטיגנים הבאים: *A. flavus*, *A. parasiticus* ת.649 שאינו אפלטוקסיגני, תבדיל NRRL 25517 *A. tamaritii* אפלטוקסיגני ותירס. נבדקה ספציפיות הזיהוי לפטריות האפלטוקסיגניות. תגובה חזקה במיוחד התקבלה בפטריה האפלטוקסיגנית *A. parasiticus* ממנה נלקח הגן להשראת הנוגדנים ($O.D_{405}=2.151$) (גרף 3.1.2.3). התבדילים האפלטוקסיגניים *A. flavus* ו-*A. tamaritii* נתנו אף הם תגובה חזקה, אך בעוצמה נמוכה מ-*A. parasiticus* ($O.D_{405}=0.930$ ו- $O.D_{405}=0.715$, בהתאמה). לעומתם, בת.649 התקבלה תגובה נמוכה, בדומה לתירס ששימש כמערכת מודל גם בניסוי זה ($O.D_{405}=0.406$ ו- $O.D_{405}=0.387$, בהתאמה).

בהשוואת ספציפיות הנוגדנים הפוליקלונליים שיוצרו על ידי שימוש במקטע הגן *ver-1* לעומת הגן השלם *ver-1*, ניתן לראות כי pAb שהושרו נגד החלבון השלם, GST-VER-RT, היו ספציפיים יותר מאלה שהופקו כנגד הפפטיד GST-VER-1 על ידי Shapira et al. (1997), דבר שבא לידי ביטוי בערכי בליעה גבוהים יותר בתגובה ניגודית עם נוגדני VER-RT לעומת VER-1 ; $O.D_{405}=1$ עם נוגדני VER-1 לעומת $O.D_{405}=2.15$ עם נוגדני VER-RT בתגובה עם מיצוי מהפטריה *A. parasiticus*. מתוצאות ניסויי ה-ACP-ELISA ניתן לראות כי נוגדנים שהושרו כנגד חלבון ספציפי לפטריות אפלטוקסיגניות הם כלי יעיל וספציפי לזיהוי אותן פטריות, וכי נוגדנים שהושרו נגד תוצרי שיבוט של הגן השלם ספציפיים יותר מתוצרי שיבוט של מקטע הגן. מהתוצאות הנדונות ניתן לראות כי על ידי שימוש משולב בטכניקת ה-PCR ו-ACP-ELISA ניתן לזהות גזעים אפלטוקסיגניים בצורה ספציפית. התגובה החיובית של התבדיל האפלטוקסיגני מהפטריה *A. tamaritii* עם נוגדני VER-RT מלמדת כי גן זה לא רק נוכח בגנום, אלה כי הוא אף מתבטא.

מטרת המחקר הייתה פיתוח שיטות לגילוי מוקדם של פטריות אפלטוקסיגניות בגרעינים ובמזון יבש, לכן נערכו ניסויים שכללו בנוסף לפטריות גם גרעינים. הדוגמאות נבדקו ברמת ה-DNA - ע"י שימוש בטכניקת ה-PCR, וברמת החלבון - ע"י שימוש בטכניקת ה-ACP-ELISA. גם בניסוי זה גרעיני תירס שימשו כמערכת מודל לזיהוי פטריות אפלטוקסיגניות בשל היותם רגישים לתקיפת פטריות אלה. הפטריות מצויות לרב כנבגים בכמות קטנה על הגרעינים בצובר והפקת חומצות הגרעין מהם מסובכת. בנוסף, כיוון שהנבגים הינם גופי קיימא רדומים מסלול יצירת האפלטוקסין אינו פעיל בהם, ולכן אינם מפרשים חלבונים המשתתפים במסלול הביסנינתזה. תנאים מתאימים כרטיבות, חומרי מזון וטמפרטורה, מאפשרים נביטת נבגים

והתפתחות תפטיר הפטריה. Cleveland *et al.* (1987) דיווחו כי הגיל האופטימלי של תפטיר למיצוי אנזימים במסלול יצירת אפלטוקסין הוא בין 72-84 שעות. לכן, דרושה העשרה לפני שימוש ב-ELISA לזיהוי הספציפי של כל אחד מהגרעינים הנמצאים בדוגמא. בנוסף, נמצא כי הדגרה מוקדמת של הגרעינים מאפשרת זיהוי רמות אילוח נמוכות ביותר ב-ELISA, וב-PCR (Dewey *et al.*, 1989; Shapira *et al.*, 1996). יתרון נוסף של ההדגרה המוקדמת הוא הקטנת הסיכוי לזיהוי מדבקים שאינם חיוניים. בעבודה קודמת נמצא כי הדגרת התירס המאולח עם מצע העשרה מקצרת את משך ההדגרה הנדרש לקבלת תוצר PCR, אך אינה תורמת בבדיקת התגובה הניגודית בטכניקת ה-ELISA (אייל, 1995). לכן, לדוגמאות ששימשו לזיהוי ברמת ה-DNA הוסף מצע העשרה (PDB), בעוד שהדוגמאות ששימשו לזיהוי ברמת החלבון הודגרו ללא מצע העשרה. גרעיני התירס אולחו ברמות שונות של נבגי *A. parasiticus* (0, 1-5, 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^6 נבגים/גר' תירס), ודוגמאות נלקחו לאחר פרקי זמן שונים (0, 12, 24, 48, 72, 96, 168 שעות). בבדיקות ה-PCR נעשה שימוש בתחלים המשלימים את קצוות 5' ו-3' של הגן *omt-1*, המשתף במסלול הביסוינזה של AFB₁, והתגלה כספציפי לזיהוי פטריות אפלטוקסיגניות מהסוגים *A. flavus* ו-*A. parasiticus* (Geisen, 1997). בדגימות שנלקחו מיד לאחר אילוח התירס בנבגים לא נראה תוצר PCR גם ברמת אילוח גבוהה (תמונה 3.2.1), כיוון שלא נמצאה עדיין שיטה יעילה להפקת DNA מנבגים. לכן, על מנת שניתן יהיה לזהות את הפטריה בגרעינים המאולחים, יש להדגירם תחילה כדי לאפשר התפתחות קורים. עובדה זו אינה תואמת דיווחים ממחקרים המונים, בין יתרונותיו הרבים של ה-PCR, את אי הצורך בתרבות העשרה (Henson and French, 1993). נמצא כי הזמן הדרוש לקבלת תוצר PCR תלוי ברמת האילוח ההתחלתית; 12 שעות ברמת אילוח של 10^2 נבגים/גר', 48 שעות ברמת אילוח של 10 נבגים/גר' ו-96 שעות ברמת אילוח של נבגים בודדים לגר' תירס. עוצמת הפס, המעידה על כמות תוצר ה-PCR, התחזקה כפונקציה של משך ההדגרה בכל רמות האילוח שנבדקו, עובדה המעידה שככל שיש יותר תפטיר בדוגמא המאולחת, במקרה זה עקב הדגרה ארוכה יותר, מתקבל יותר תוצר PCR. בדיקה זו אינה בדיקה כמותית כיוון שמספר עותקי ה-DNA בתפטיר גדול בהרבה מאשר בנבגים המכילים גרעין יחיד. בעתיד ניתן יהיה להשתמש בתוצאות ניסוי זה על מנת לכייל את המערכת כך שיתקבל תוצר PCR לאחר הדגרה מינמלית שתאפשר זיהוי הפטריה בהתאם לדרישות. בגישה דומה נקטו Färber *et al.* (1997). פני השטח של תאנים אולח בתרחיף נבגי *A. flavus* אפלטוקסיגני והדוגמאות הודגרו למשך 72 ו-96 שעות ב-30°C. לאחר מכן מוצא DNA מפני השטח של התאנים ושימש כדגם בראקציות PCR עם פריימרים לגנים *nor-1*, *ver-1* ו-*omt-A*. בדוגמאות המאולחות התקבל דפוס דומה של פסים אך בעוצמה חלשה יותר מזה שהתקבל עם DNA שמוצא מתפטיר *A. flavus* נקי. סף הגילוי בראקציות היה כ- 0.7×10^5 יחידות גנום עם DNA שמוצא מתפטיר פטריה ללא תאנים, וכשהוסף DNA שמוצא מתאנים עלה סף הגילוי בסדר גודל. הסיבה, לטענתם, היא עיכוב פעילות האנזים *Taq polymerase* על ידי מרכיבי התאנה (שומנים,

חלבונים ובעיקר פחמימות). במערכת הניסוי שלנו, בכל אופן, בעיה זו אינה קיימת כיוון שחומרי המזון נמהלים בעת הדגרת הדוגמאות במצע ההעשרה. לא ניתן להשוות את סף הגילוי בין שני הניסויים כיוון שהבסיס לחישובים שונה; בניסוי המתואר החישובים נעשו לפי כמות DNA (pg) של פטריה שהוסף לראקציה חלקי אורך ממוצע של גנום הפטריה *A. flavus* (35 mb), ואילו בניסוי אילוח התירס החישובים מתבססים על DNA $1 \mu\text{g}$ שמוצא מתירס מאולח ברמות שונות של נבגי *A. parasiticus* לגר' תירס. בנוסף, בניסוי האילוח עם התאנים לא נבדקה השפעת זמן ההדגרה על סף הגילוי. בכל אופן, סביר להניח כי בתנאים מיטביים להתפתחות הפטריה, כמו אלה המתקיימים במצע העשרה, סף הגילוי נמוך יותר. בעבודה אחרת השתמשו ב-PCR לזיהוי פטריות מהסוג *Penicillium* בגבינות רכות (Pedersen et al., 1997). בכדי להקטין את השפעת מרכיבי הגבינה על פעילות האנזים *Taq polymerase* ועל היקשרות התחלים ל-DNA ננקטו שתי דרכים; האחת - טיפול מקדים באנזים *Proteinase K*, והשניה - הפרדת התפטיר מהגבינה על גבי פולימר. בניסוי זה לא נקבעה רמת המידבק המינימלית הניתנת לזיהוי. ראוי לציין כי עדיין לא נקבעו תקנים רשמיים העוסקים ברמת האינקולום המינימלית המותרת בגרעינים ובמזון. אחת הסיבות היא שאף אחת משיטות הבדיקה המוכרות על ידי הרשויות אינה עונה על הדרישות הבאות: הליך קצר, פשוט לביצוע, אמין וזול מההליך המקובל כיום (שיטת המיהולים). סיבה חשובה נוספת היא העדר שיטת דגימה אמינה ומייצגת מהגרעינים. בדיקת ה-PCR מספקת אינדיקציה לגבי האפשרות שהגרעינים זוהמו בעבר, מזהמים בהווה, או יזוהמו בעתיד ברעלן, כיוון ש-DNA ימצא בכל שלב משלבי התפתחות הפטריה, והראקציה מזהה גם פטריות שאיבדו את חיותן. לעומת זאת זיהוי חלבונים, המקטלזים אחד משלבי מסלול הביוסנינזה של יצירת הרעלן, מעידים על הפעלת מסלול הביוסנינזה ליצירת אפלטוקסין. לכן בדיקה המשלבת את שתי השיטות אמורה לספק אינדיקציה לגבי הסיכון העכשווי והעתידי לזיהום המזון על ידי הרעלן. דוגמאות התירס המאולחות נבדקו ברמת החלבון על ידי שימוש בטכניקת ה-ACP-ELISA (תמונה 3.2.2). הנוגדנים ששימשו בראקציה הושרו נגד מקטע הגן *apa-2* והוכחו כספציפיים לזיהוי פטריות אפלטוקסיגניות. למרות שידוע כי בתנאים אלה הפטריה מפרישה את הרעלן, השיטה התגלתה כבילתי רגישה לזיהוי רמות אילוח נמוכות, וגם ברמות אילוח גבוהות (10^6 נבגים/גר') לאחר הדגרת של 96 שעות התגובה האימונית הייתה נמוכה, ואינה מאפשרת זיהוי וודאי של הפטריה האפלטוקסיגנית. יתכן כי הסיבה לחוסר רגישות השיטה נובעת מכמות קטנה של החלבון APA-2 שנוצרה יחסית לכלל החלבונים בדוגמא, הכוללים, בנוסף לחלבוני הפטריה, גם את חלבוני התירס. לחילופין, יתכן כי החלבון נוצר במערכת ברמה שתאפשר זיהוי, אך זמן מחצית חייו קצר כך שהוא נוצר ומתפרק בטווח של פחות מ-12 שעות, פרק הזמן שנלקח בין הדגימות השונות. יתכן כי בניסוי אילוח בו יעשה שימוש בנוגדי VER-RT, שהתגלו כספציפיים יותר לזיהוי פטריות אפלטוקסיגניות, תתקבל תגובה חיובית ברמות אילוח נמוכות יותר ובזמני הדגרה קצרים יותר. ראוי לציין כי עד היום טרם בוצעו ניסויים לזיהוי סרולוגי של פטריות בגרעינים אשר אולחו בצורה מבוקרת. בעבודות המתמקדות בנושא, מדווח על זיהוי גרעינים נגועים אך ללא התייחסות

לרמת האינקולום. כך למשל בעבודתם עם הפטריה *Penicillium islandicum* דיווחו Dewey et al. (1993) על אפשרות לזהות 100% גרעיני אורז אשר היו מאולחים בפטריה, אולם אין נתונים על רמת האילוח (CFU/gr) ולפיכך יתכן כי רמה זו הייתה גבוהה מהרמות בהן אולח התירס. בעבודה אחרת יוחס סף הגילוי למסת הפטריה (תוך שימוש ברמת הארגוסטרול) (Dewey et al., 1992). גם כאן לא ניתן ליחס את תוצאות מבדקי הארגוסטרול לרמות האינקולום ועשוי להיות שרמה זו הייתה גבוהה מרמות האילוח בהן אולח התירס בעבודה שלנו. עוד ניתן לציין כי העבודות המוזכרות עסקו בזיהוי על ידי נוגדנים מונוקלונליים (mAb), הידועים כספציפיים יותר לאנטיגן. בעבודתנו נעשה לראשונה שימוש בנוגדנים פוליקלונליים, וניתן ליחס את התגובה הנמוכה אשר התקבלה, יחסית לשימוש ב-mAb, לרמת ספציפיות נמוכה של נוגדנים אלה. מכל מקום ניתן לשפר את סף הגילוי על ידי pAb תוך שימוש במספר שיטות; שיפור ספציפיות הנוגדנים על ידי השריית נוגדנים נגד החלבון הנטיבי השלם, לאחר ספיחתו על עמודת glutathione reduce וחיתוך בתרומבין. שיטה נוספת - שימוש במערכת גילוי המבוססת על קשירת אבידין ביוטין בה הגלאי פלורסנטי. יש לשים לב כי במערכת כזו עלול להתגבר גם הסיגנל של בליעת הרקע, כיוון שגרעיני התירס מכילים פיגמנטים שעלולים לבלוע בתחום הפלורסנטי (Hampton et al., 1990). בניסוי אילוח התירס נעשה שימוש בגן אחד (PCR), ובחלבון אחד (ELISA) המשתתפים במסלול ביוסינתזה האפלטוקסין. בעתיד יש להרחיב את מערך הזיהוי ולבסס את הבדיקה המשולבת על מספר גנים. בנוסף, הדוגמאות אולחו במין יחיד של פטריה, בעוד שבצובר גרעינים מצויים מספר מיני מיקרואורגניזמים על הגרגרים. כמו כן, הנבגים בהם אולחו הגרעינים היו אחידים בגילם וטריים יחסית, ואילו בצוברי גרעינים מצויים נבגים בגילים שונים. האילוח והדגרת התירס המאולח נעשו בתנאי מעבדה. לאחר שתופר רמת הדיטקציה בבדיקות ה-ELISA יש להמשיך ולבדוק דוגמאות תירס מצוברים הידועים כמאולחים, במקביל לבדיקות בשיטות זיהוי קונבנציונליות (זריעה ישירה), ולוודא שזיהוי ספציפי של פטריות אפלטוקסיגניות אפשרי ויעיל גם בדוגמאות *in vivo* ולא רק בדוגמאות *in vitro*, בהן הוכחה היעילות.

כשמשתמשים בנוגדנים שהושרו כנגד גנים המקודדים לאנזימי מפתח במסלול יצירת אפלטוקסין יש לקחת בחשבון את האפשרות כי אותם גנים עלולים להימצא גם בגזעים שאינם מפרישים את הרעלן. לחלבון VER-1 56% זהות עם האנזים tetrahydroxynaphthalene reductase, המעורב בביוסינתזה מלאנין בפטריות *magnaporthe grisea* הפוגעות באורז (Vidal-Cros et al., 1994). כדי להתגבר על הבעיה יש לבסס את מערך הזיהוי על תוצרי מספר גנים ספציפיים, המקודדים לאנזימי מפתח במסלול ביוסינתזה אפלטוקסין. כמו כן, זהות ברמת החלבון אינה מעידה בהכרח על זהות ברמת הגנום, ולכן גישה המשלבת בדיקות ברמת הגנום וברמת החלבון מספקת מענה נוסף.

שיטת ה-PCR מאפשרת זיהוי של הפטריה בכל שלבי התפתחותה כיוון שהיא מתבססת על המערך הגנומי המצוי בכל אחד מתאיה במשך כל חייה ואף לאחר מותה (Miller and Martin,

1988). ה-DNA אינו מושמד בעיקור באוטוקלאב וניתן לזהותו זמן רב לאחר מות הפטריה. זיהוי פטריה בדוגמא כאשר אין בה גופי פטריה בעלי חיות הוא חסרון, אך הוא טומן בחובו גם יתרון. זיהוי חיובי של פטריה יעיד כי הפטריה הייתה קיימת בדוגמא בשלב כלשהו, גם אם אין היא קיימת בה בעת הבדיקה ויתכן שבמהלך חייה הספיקה הפטריה ליצור רעלנים. כיוון שאפלטוקסינים אינם מושמדים בתהליכי עיבוד המזון, הרי שהם עלולים להימצא בדוגמא ולכן כדאי לבדוק נוכחות אפלטוקסינים בדוגמא כזו. בכל אופן בניסויים המתוארים בעבודה הדוגמאות הודגרו לפני מיצוי ה-DNA במצע העשרה, ועל ידי כך הוקטן הסיכוי לזיהוי פטריה שאינה חיונית. שיטת ה-ACP-ELISA, לעומת זאת, מתבססת על פפטיד המיוצר אך ורק בשלב הביוסינתזה של AFB_1 , כך שהפטריה לא תזוהה בשלבים שונים בהתפתחותה, למרות הימצאותה בצובר. בנוסף לבעיית זמינות הפפטיד בגלל עיתוי ייצורו, קיימת בעיה של זמינותו עקב פירוקו. יתרון נוסף של השימוש בגלאי חומצות גרעין על פני גלאי אנטיגני הוא האפשרות לגלות בעזרתו מערכת גנים שלמה, לעומת תוצר חלבוני יחיד, הניתן לגילוי בשיטות אימונולוגיות (Miller and Martin, 1988). לשיטת ה-ELISA יתרון על פני השיטות המולקולריות. כיום קיימות ערכות רבות המבוססות על שימוש בנוגדנים לזיהוי פתוגנים במגוון תחומים (מחלות אדם, וירוסים בצמחים). השימוש בערכות אלה אינו דורש מיומנות רבה והוא פשוט ביותר. שילוב של שתי השיטות, וביסוס מערך הבדיקה על מספר גנים המקודדים לאנזימי מפתח במסלול יצירת הרעלן, יבטיח זיהוי אמין ויעיל של הפטריות האפלטוקסיגניות. גישה זו ניתן להרחיב לזיהוי וגילוי של פטריות מיקוטוקסיגניות אחרות בהן מתרחש מסלול ביוסינתזה שניוני והגנים המעורבים ידועים.

5. תקציר

פטריות עובש מאלחות גרעינים ומזון יבש וגורמות נזקים רבים. בנוסף, מינים רבים יוצרים רעלנים המסוכנים לבריאות האדם והחי. מבין הרעלנים הידועים, אלה הנמנים על קבוצת האפלטוקסינים, הם הרעילים ביותר. האפלטוקסינים מיוצרים על ידי פטריות השייכות לקבוצת *Aspergillus flavus*, וביניהן: *A. parasiticus*, *A. nomius* ו-*A. tamarii*. פטריות אלה נפוצות בגרעינים ולפיכך המצאות אפלטוקסינים בהן מוחשית. שיטות הזיהוי המקובלות כיום לשם זיהוי כמותי ואיכותי של עובשים במזון יקרות, דורשות זמן רב, אינן מספקות מידע מפורט על המינים המצויים בדוגמת המזון והפעלתן דורשת מיומנות רבה.

מטרת העבודה היא פיתוח מערכת לזיהוי נוכחות עובשים אפלטוקסיניים בדוגמת מזון בשיטות מולקולריות ואימונולוגיות לשם גילוי מוקדם של עובשים יוצרי אפלטוקסינים במזון ובגרעינים. הזיהוי מבוסס על גילוי גנים ייחודיים למסלול יצירת אפלטוקסין B₁ בפטריה *A. parasiticus* בעזרת שיטות ה-PCR וה-ELISA.

לצורך ה-PCR נעשה שימוש בתחלים המשלימים את קצוות 5' ו-3' של הגנים *ver-1*, *omt-1*, *nor-A*, הספציפיים למסלול ביוסינתזת האפלטוקסין. כפטריות מבחן שימשו גזעים אפלטוקסיניים של הפטריות *A. flavus*, *A. parasiticus* ו-*A. tamarii*, ותבדיד *A. flavus* NRRL649 (להלן ת.649) שדווח כגזע שאינו אפלטוקסיגני, ולא ייצר אפלטוקסין לאחר שגודל במשך 7 ימים בתנאים המעודדים את יצירת הרעלן. כל התבדידים הראו דפוס דומה בבדיקת ה-PCR. בהסתמך על תוצאות אלה, סביר להניח כי גנום תבדיד ה-*A. tamarii* מכיל את קבוצת הגנים המשתתפים במסלול יצירת אפלטוקסין, למרות שטרם אופיין גנטית. לעומת זאת, התוצאות סותרות את הדווח כי בגנום ת.649 חסרה "קבוצת הגנים" (gene cluster) המשתתפים במסלול יצירת אפלטוקסין. כיוון שהניסוי נערך בשתי חזרות והביקורות השליליות לא זוהמו, סביר מאוד להניח כי בעת המשך העברתו ושימורו של ת.649 חל זיהום במערכת הגידול. בכל אופן יש לבדוק את התבדיד ברמת ה-DNA בשיטת זיהוי נוספת. ת.649 נבדק גם ברמת ה-RNA על ידי שימוש בטכניקת ה-RT-PCR עם תחלים המשלימים את קצוות 5' ו-3' של הגנים *omt-1* ו-*ver-1*. באף אחת מהראקציות שהכילו מיצוי RNA מהתבדיד לא התקבלו תוצרים, עובדה המלמדת כי לא חל שיעתוק של הגנים.

תוצר PCR של מקטע הגן *apa-2* ותוצרי RT-PCR של הגנים *apa-2* ו-*ver-1* מהפטריה *A. parasiticus* שובטו לפלסמיד pGEX-2T, בהמשך למסגרת הקריאה לגן המקודד לחלבון Glutathione-S-transferase, והוחדרו לחיידקי *Escherichia coli*. לאחר אינדוקציה לביטוי יתר הופקו החלבונים הכימריים מהחיידקים, והופרדו על גלים דנטורטיביים (להלן חלבונים-GST-APA-2, GST-VER-RT ו-APA-RT-GST, בהתאמה). נוגדנים שהושרו בארנבות כנגד החלבון הכימרי GST-APA-2 התגלו כספציפיים לפטריות אפלטוקסיגניות *A. parasiticus* ו-*A. flavus* במבחן ACP-ELISA מבין שאר פטריות המבחן שנבדקו והתירס. ספציפיות הנוגדנים שהושרו

כנגד החלבון GST-APA-RT נבדקת בימים אלה. נוגדנים שהושרו כנגד החלבון GST-VER-RT התגלו כספציפיים לזיהוי הפטריות האפלטוקסיגניות *A. tamarii*, *A. flavus*, *A. parasiticus* ואילו בראקציה עם ת.649 התקבלה תגובה חלשה בדומה לתגובה שהתקבלה עם התירס. הנוגדנים שהושרו כנגד הגן *ver-1* השלם התגלו כספציפיים יותר מאשר הנוגדנים שהושרו כנגד מקטע הגן על ידי Shapira et al. (1997). מהתוצאות המתוארות ניתן להסיק כי על ידי שימוש משולב בטכניקת ה-PCR וה-ACP-ELISA ניתן לזהות גזעים אפלטוקסיגניים בצורה ספציפית.

סך הגילוי של שיטות ה-PCR וה-ACP-ELISA נבדק בניסוי בו אולחו גרעיני תירס ברמות שונות של נבגי *A. parasiticus*, מהם נלקחו דגימות לאחר פרקי זמן שונים. רמת הזיהוי בבדיקת PCR היה נבגים בודדים לגר' תירס מאולח, מספר הקטן ממספר הנבגים הניתן לזיהוי בשיטת הזריעה הישירה ובשיטת המיהולים. נמצא כי הזמן הדרוש לקבלת תוצר PCR תלוי ברמת האילוח ההתחלתית, וכי עוצמת הפס, המעידה על כמות תוצר ה-PCR, התחזקה כפונקציה של משך ההדגרה בכל רמות האילוח שנבדקו. בהסתמך על תוצאות אלה ניתן יהיה בעתיד לכייל את המערכת כך שיתקבל תוצר PCR לאחר הדגרה מינמלית שתאפשר זיהוי הפטריה בהתאם לדרישות. לעומת זאת בדיקת ה-ACP-ELISA, עם נוגדני GST-APA-2, התגלתה כרגישה פחות לזיהוי רמות אילוח נמוכות. גם ברמות אילוח גבוהות ובמשך הדגרה ארוך הייתה התגובה לנוגדנים נמוכה יחסית. יש להשתמש בשיטות ספציפיות המקובלות לשם העלאת רגישות הנוגדנים, וזאת במטרה להוריד את סף הגילוי.

בעבודה זו פותחו ויושמו שיטות רגישות וסגוליות לגילוי מוקדם של פטריות אפלטוקסיגניות במזון. בעזרת השיטות שתוארו לעיל יתכן גילוי של תאים ספורים של הפטריה עוד לפני שהחל ייצור אפלטוקסין כך שניתן יהיה לטפל במזון הנגוע עוד לפני התפשטות הפטריה. גישה זו ניתן להרחיב לזיהוי וגילוי פטריות מיקוטוקסיגניות אחרות בהן מתרחש מסלול ביוסינתזה שניוני והגנים המעורבים ידועים.

6. רשימת ספרות

אייל אסנת (1995). גילוי עובשים יוצרי רעלנים מקבוצת האפלטוקסינים בשיטות מולקולריות ואימונולוגיות. עבודת גמר לתואר מוסמך, מוגשת לפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית בירושלים. 64 עמודים.

פסטר ג. 1994. מניעת יצירת רעלני פטריות (מיקוטוקסינים) מקבוצת האפלטוקסינים ע"י מיצויים צמחיים. מחקר חקלאי בישראל. ז': 123-131.

פסטר ג. מנשרוב מ. שעה א. יובל ב. רביד ע. 1993. שימוש במיצויים המופקים מצמחי תבלין להדברת פטריות עובש יוצרות מיקוטוקסינים התוקפות גרגרים מאוסמים. מנהל המחקר החקלאי. סדרה ה': 25-27.

Adye J. Mateles R.I. 1964. Incorporation of labelled compounds into aflatoxin. *Biophys. Acta.* 86:418-420.

Anon (1995). Official methods of analysis of A.O.A.C. international, 16th ed. VA, USA.

Arnheim N. Erlich H. 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* 61:131-156.

Azzouz M.A. Bullerman L.B. 1982. Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. *J. Food Protect.* 45:1298-1301.

Banks J.N. Cox S.J. Clarke J.H. Shamsi R.H. Northway B.J. 1992. Toward the immunological detection of field and storage fungi. In: Samson R.A. Hocking A.D. Pitt J.I. King A.D., eds. *Modern Methods in Food Mycology*. Elsevier, Amsterdam. pp:247-251.

Betina V. 1989. *Mycotoxins. Chemical, biological and environmental aspects*. Elsevier, Amsterdam.

1. מטרת המחקר לתקופת הד"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה:
פיתוח אמצעים סרולוגיים, מולקולריים לזהוי ואבחון פטריות יוצרות אפלטוקסין.
2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הד"ח:
פותח פרוטוקול לזהוי הפטריה בעזרת PCR, הושרו נוגדנים כנגד חלבונים כימריים אפייניים למעגל הסינטזה של הטוקסין.
3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו:
הגישה המוצגת הוכחה כברת יישום. יש למצוא אפשרות למיסחור הממצאים.
4. הבעיות שנוותרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן:
ההיפוטזה - שלוב שיטות לזהוי יעיל, אמיתית ונכונה. יש להרחיב אמצעי זהוי ולכלול ב"קיט" המפותח.
5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הד"ח - יש לפרט: פרסומים -
כמקובל בביליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך:
במסגרת הפרויקט הוצגו הממצאים בכנסים, פורסמו 2 עבודות והושלמו שתי עבודות מוסמך.