



УДК 547.873.57.083.3

© 1994 Ж. В. Самсонова, С. А. Еремин,
А. М. Егоров, М. Франек*

ПРОБЛЕМА ВЫБОРА СТРУКТУРЫ МЕЧЕНОГО
АНТИГЕНА ПРИ РАЗРАБОТКЕ ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО
ФЛУОРОИММУНОАНАЛИЗА АТРАЗИНА

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии, Москва;

* Институт ветеринарии, Брно

Ключевые слова: атразин, анализ; поляризационный флуороиммуноанализ.

Рассмотрены некоторые аспекты выбора структуры меченого антигена для разработки высокочувствительного поляризационного флуороиммуноанализа атразина. Найдено, что наибольшую чувствительность обеспечивает применение негомологичного меченого реагента с самым коротким химическим «мостиком» между его молекулой и флуоресцентной меткой.

В настоящее время наряду с физико-химическими методами, такими, как ГЖХ, ВЭЖХ, ГХ/МС [1—3], для определения остаточных количеств гербицидов в различных объектах окружающей среды широко используются высокочувствительные и специфичные иммунохимические методы анализа. Гомогенный метод поляризационного флуороиммуноанализа (ПФИА), подробно описанный в работах [4—6], основан на конкуренции определяемого антигена (аналита) и антигена, меченого флуоресцентной меткой (маркера), за ограниченное число центров связывания антител и измерении степени поляризации флуоресценции реакционной смеси. Эта характеристика определяется многими факторами, и, в частности, размерами флуоресцирующего комплекса, поэтому ее величина тем выше, чем больше небольших молекул маркера связано с молекулами антител. При этом количество связанных молекул маркера зависит от количества аналита, присутствующего в пробе.

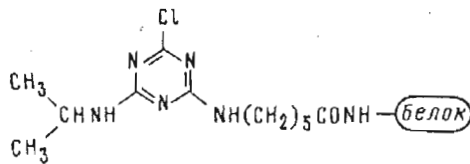
Успешная разработка ПФИА зависит не только от качества полученных антител, но и от правильного выбора структуры меченого антигена. Структура, длина химического «мостика» между молекулой антигена и флуоресцентной меткой, место его присоединения в молекуле аналита могут оказывать заметное влияние на результат анализа (чувствительность, предел обнаружения аналита, специфичность).

В данном сообщении рассматриваются некоторые аспекты выбора структуры маркера при разработке ПФИА на атразин — один из широко используемых в сельском хозяйстве гербицидов класса *симм*-1,3,5-триазинов. Ранее нами были

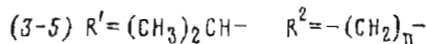
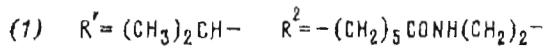
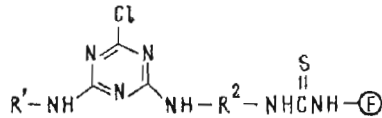
Сокращение: ПФИА — поляризационный флуороиммуноанализ.

Адрес для переписки: 119899, Москва, МГУ, химфак, кафедра химической энзимологии. Еремин Сергей Александрович.

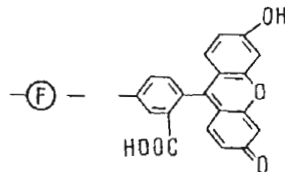
Иммуноген



Маркеры



(3) $n=2$, (4) $n=4$, (5) $n=6$



опубликованы результаты по влиянию структуры меченого анализата на чувствительность и специфичность ПФИА фенобарбитала [7] и 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты [8].

Для проведения исследований был синтезирован ряд меченых антигенов, имеющих структуру, сходную со структурой иммуногена.

Гомологичные маркер (1) и маркер (2) отличаются от иммуногена структурой алифатического радикала в 6-м положении триазинового кольца, а химический «мостик» образован за счет молекулы антигена. Маркеры (3)—(5) различаются длиной (количеством метиленовых групп) «мостика», структура которого была образована за счет различных производных флуоресцеинтиокарбамата.

При титровании поликлональной антисыворотки кролика различными маркерами показано (рис. 1), что титры антисыворотки при 50% связывании немного больше для маркеров (3)—(5), чем для маркеров (1) и (2) (табл. 1), для маркеров (3)—(5) в области малых разведений антисыворотки (до 1/300) наблюдается следующая закономерность: с увеличением длины химического «мостика» уменьшается уровень поляризации флуоресценции. Это, по-видимому, связано с тем, что в случае маркера с коротким «мостиком» (в данном случае маркер (3)) структура образующегося комплекса меченый антиген/антитело более жесткая, малоподвижная и, следовательно, значение поляризации флуоресценции выше, чем при использовании маркеров с более длинным «мостиком» ($n=4$, $n=6$). При разведении антисыворотки более чем 1/300 кривые титрования антисыворотки различными маркерами практически совпадают.

Наиболее чувствительный градуировочный график получен для маркера (3) с самым коротким химическим «мостиком», а по мере увеличения длины «мостика» (маркеры (4) и (5)) чувствительность анализа уменьшалась (рис. 2). Это связано с тем, что по мере уменьшения длины «мостика», т. е. приближения флуоресцентной метки к антигенсвязывающему центру антитела, возрастают силы элект-

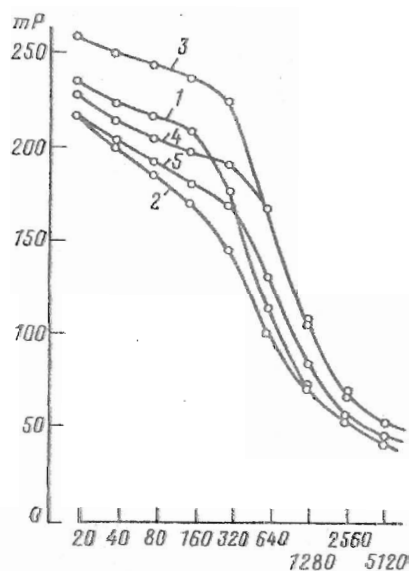


Рис. 1

Рис. 1. Кривые титрования поликлональной антисыворотки кролика различными маркерами (1)—(5) (кривые 1—5 соответственно). По оси абсцисс — разведение антисыворотки, по оси ординат — поляризация флуоресценции (mP)

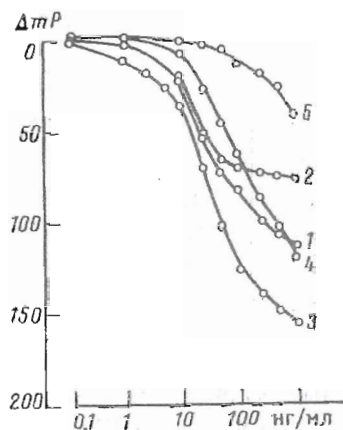


Рис. 2

Рис. 2. Градуировочные графики для ПФИА атразина с использованием маркеров (1)—(5) (кривые 1—5 соответственно). По оси абсцисс — концентрация атразина ($нг/мл$), по оси ординат — изменение поляризации флуоресценции (ΔmP)

тростатического отталкивания между аминокислотными остатками антитела и флуоресцентной молекулы. Кроме того, могут возникать стерические затруднения при образовании комплекса меченый антиген — антитело. Очевидно, что для маркера (3) они наиболее выражены, поэтому аналит легче вытесняет последний из комплекса меченый антиген — антитело, чем маркеры (4) и (5). При сравнении маркеров (1) и (2) видно, что более чувствительный анализ обеспечивает применение гомологичного маркера (1). Анализ полученных градуировочных графиков позволяет сделать вывод, что для разработки ПФИА атразина с наибольшей чувствительностью целесообразно применять негомологичный маркер с самым коротким химическим «мостиком».

В табл. 1 приведены константы связывания и отношение концентрации высоко- и низкоаффинных антител для систем с различными маркерами, вычисленные графически по Скэтчарду методом поляризации флуоресценции в присутствии меченого и немеченого аналита [9]. Для маркеров (3) и (4) константы связывания имеют значения одного порядка, а при переходе к маркеру (5) с самым длинным химическим «мостиком» константы связывания уменьшаются на порядок, что характерно для конкурентных систем [10]. При увеличении длины «мостика», кроме того, увеличивается количество активных центров низкоаффинных антител по отношению к высокоаффинным, что приводит к уменьшению чувствительности анализа (табл. 1). Для маркеров (1) и (2) значения константы связывания высокоаффинных антител и отношения концентраций центров связывания примерно равны, но значение константы связывания низкоаффинных антител больше для маркера (2), что и делает более чувствительным анализ с гомологичным маркером (1). При сравнении же маркеров (1) и (3) видно, что значения констант связывания для них примерно одинаковы, но для маркера (1) соотношение фракций низко- и высокоаффинных антител больше.

Исходя из вышеизложенного, для разработки ПФИА был выбран негомоло-

Титры поликлональной антисыворотки кролика, константы связывания и отношение концентраций высокоаффинной (C_v) и низкоаффинной фракций антител (C_n) для различных маркеров

Маркер	Титр	Константа связывания, M^{-1} , для		C_n/C_v
		высокоаффинных антител $K_1 \cdot 10^{-9}$	низкоаффинных антител $K_2 \cdot 10^{-7}$	
1	1/600	1,45 ± 0,01	2,00 ± 0,02	5,2
2	1/600	1,34 ± 0,03	4,09 ± 0,04	5,7
3	1/1000	1,44 ± 0,01	1,54 ± 0,02	3,4
4	1/1000	2,60 ± 0,04	1,25 ± 0,03	6,1
5	1/1000	0,13 ± 0,04	0,40 ± 0,01	14,0

гичный маркер (3) с самым коротким химическим «мостиком». Минимально определяемая концентрация атразина, рассчитанная по методу Родбарда [11], составила 1,5 нг/мл. Так как объем образца для анализа составляет 50 мкл, методом ПФИА можно определять 75 нг гербицида в пробе. Воспроизводимость анализа была оценена с использованием контрольных образцов, содержащих 1, 10 и 100 нг/мл атразина (число повторов — 4). Коэффициенты вариации в пределах одного дня составили 6,7; 5,2 и 0,2%, а между днями — 7,3; 6,5 и 0,1% соответственно.

Для определения специфичности ПФИА были исследованы перекрестные реакции с различными гербицидами класса *симм*-1,3,5-триазинов и вычислен процент перекрестного реагирования (табл. 2). Для этого при построении градуировочных графиков вместо раствора атразина различных концентраций использовали растворы перекрестно реагирующих веществ. Как видно из полученных данных, анализ специфичен к 2-хлор-*симм*-1,3,5-триазином и малоспецифичен к 2-метилтио-*симм*-1,3,5-триазином. Разработанный анализ можно применять для определения наличия 2-хлор-*симм*-1,3,5-триазинов в объектах окружающей среды.

Итак, метод ПФИА позволяет проследить влияние структуры маркера на чувствительность анализа. Для разработки высокочувствительного ПФИА на атразин целесообразно использовать негомологичный маркер с самым коротким химическим «мостиком» между молекулой аналита и флуоресцентной меткой.

Экспериментальная часть

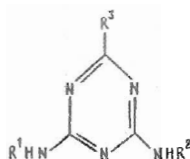
Для проведения синтеза и разработки анализа использовались химические реактивы отечественного (марки х.ч. и о.ч.) и импортного (Sigma) производства. Для проведения анализа использовали 0,05 М боратный буфер (950 мг $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ и 1 г NaN_3 на 1 л дистиллированной воды, pH 7,5—8).

Стандартные растворы гербицидов класса *симм*-1,3,5-триазинов готовили путем разбавления исходного раствора гербицида в абсолютном этаноле (1 мг/мл) до конечных концентраций 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 10 000 нг/мл в боратном буфере.

При разработке анализа использовали поликлональную антисыворотку кролика, полученную в Институте ветеринарии (Брно, Чехия) против белкового конъюгата производного атразина (4-хлор-6-(изопропиламино)-1,3,5-триазин-2-(6-аминокапроновой кислоты)) с овальбумином.

Титр антисыворотки определяли методом поляризации флуоресценции: в 10 кювет стандартной карусели последовательно разливали по 500 мкг буфера,

Структура и перекрестные реакции (X) гербицидов класса симм-1,3,5-триазинов при определении атразина методом поляризационного флуороиммуноанализа



Триазины	R ¹	R ²	R ³	X*, %
Атразин	Et	Pr ^f	Cl	100
Пропазин	Pr ^f	Pr ^f	Cl	57
Симазин	Et	Et	Cl	18
Прометрин	Pr ^f	Pr ^f	SMe	3,2
Тербутилазин	Et	Bu ^f	Cl	<1
Аметрин	Et	Bu ^f	SMe	<1
Тербутрин	Et	Bu ^f	SMe	<1
Азипротрин	N ₃	Bu ^f	SMe	<1

* Перекрестное реагирование (%) рассчитывали по формуле $X = (C_1/C_2) \cdot 100$, где C_1 — концентрация аналита при 50% ингибирования сигнала от уровня нулевого стандарта, C_2 — концентрация перекрестно реагирующего вещества, определяемая в тех же условиях.

далее в первую кювету добавляли 50 мкл цельной сыворотки и 450 мкл буфера (начальное разведение антисыворотки — 1/20). Приготовленный в первой кювете раствор последовательно раститровывали по 500 мкл до девятой кюветы. Во все 10 кювет разливали по 500 мкл раствора антигена, меченного флуоресцеином, и проводили измерение поляризации флуоресценции.

Синтез маркеров. К раствору 2,1 мг (10 мкмоль) 4-хлор-6-(этиламино)-1,3,5-триазин-2-(6-аминокапроновой кислоты) в 200 мкл диметилформаида добавляли 2,3 мг (20 мкмоль) N-гидроксисукцинимид и 4,3 мг (20 мкмоль) дициклогексилкарбодиимида. Реакционную смесь встряхивали 2 ч при 20° С и добавляли 2,5 мг (5 мкмоль) этилендиаминфлуоресценттиокарбамата. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 20° С и хроматографировали в системе хлороформ — этанол (4 : 1, по объему) на пластинках фирмы Silufol. Собирали с пластинки основную желтую полосу с R_f 0,58 и экстрагировали полученную 4-хлор-6-(этиламино)-1,3,5-триазин-2-(6-аминокапроновую кислоту (маркер (2)), меченную флуоресцеином, в 2 мг метанола. Раствор разбавляли до концентрации 10 нмоль/л боратным буфером и использовали в анализе.

Меченную флуоресцеином 4-хлор-6-(изопропиламино)-1,3,5-триазин-2-(6-аминокапроновую кислоту) (маркер (1)) получали аналогично.

Синтез производных атразина, меченных флуоресцеином, с различным метиленовых групп (маркеры (3)—(5)) описан в работе [12].

ПФИА. Для измерения поляризации флуоресценции использовался ТДх-анализатор фирмы Abbott (США). В 10 кювет добавляли по 50 мкл анализируемой пробы или стандартного раствора, 500 мкл раствора трейсера, 500 мкл антисыворотки в рабочем разведении (70% связывания с меченым антигеном) и проводили измерение поляризации флуоресценции в полуавтоматическом режиме по программе «Photo check». Время анализа 10 образцов составляет около 7 мин.

1. *Felding G.*//Pestic. Sci. 1992. V. 35. P. 39—43.
2. Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде: Справочник. Сост. М. А. Клисенко, А. А. Калинина, К. Ф. Новикова. М.: Колос, 1992.
3. *Di Corcia A., Marchetti M.*//Anal. Chem. 1991. V. 63. P. 580—585.
4. *Gutierrez M. C., Gomez-Hens A., Perez-Bendito D.*//Talanta. 1989. V. 36. № 12. P. 1187—1201.
5. *Бекберзенов Б. М., Житишков В. Г.*//Антибиотики и химиотерапия. 1988. Т. 33. № 1. С. 72—76.
6. *Popelka S. R., Miller D. M., Holen J. J., Kelso D. M.*//Clin. Chem. 1981. V. 27. № 7. P. 1198—1201.
7. *Дзгоев А. Б., Еремин С. А., Карнов М. В., Дашилова П. П., Василев П. Г., Егоров А. М.*//Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. № 7. С. 713—721.
8. *Еремин С. А., Лунская И. М., Егоров А. М.*//Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. № 8. С. 836—844.
9. *Dandliker W. B., Schapiro H. C., Meduski J. W., Alonso R., Faigen A., Hamrick J. R.*//Immunochemistry. 1964. V. 1. P. 165—191.
10. *Colbert D. L., Fremin S. A., Landon J.*//J. Immunol. Meth. 1991. V. 140. P. 227—233.
11. *Rodbard D.*//Anal. Biochem. 1978. V. 90. P. 1—12.
12. *Самсонова Ж. В., Еремин С. А., Егоров А. М.*//Вопр. мед. химии. 1994. № 4. Т. 40. С. 53—56.

Поступила в редакцию
14.X.1993

После доработки
29.XII.1993

*J. V. Samsonova, S. A. Eremin, A. M. Egorov,
M. Franek **

**CHOICE OF THE STRUCTURE OF LABELLED ANTIGEN FOR
DEVELOPMENT OF POLARIZATION FLUOROIMMUNOASSAY
FOR ATRAZINE**

*Department of Chemistry, Moscow State University, Moscow;
Veterinary Research Institute, Brno*

Key words: atrazine, analysis, polarization fluoroimmunoassay.

Influence of labelled antigens structure on the sensitivity of the polarization fluoroimmunoassay of atrazine was studied. It is shown that the highest sensitivity is provided by the use of the heterologous labelled reagent with the shortest chemical bridge between the antigen and fluorescent label.