



УДК 579.862.1'114.083

ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕАКЦИИ ЛАТЕКСНОЙ АГГЛЮТИНАЦИИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

© 2000 г. А. Н. Генералова, А. Н. Буряков, Ю. В. Лукин, В. П. Зубов[#]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 09.12.99 г. Принята к печати 13.01.2000 г.

На примере определения 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-D) методом ингибирования реакции латексной агглютинации охарактеризованы новые синтетические полимерные микросферы для конъюгирования антител и агглютинаторы на основе овальбумина и полиакриламида. Методом турбидиметрии исследовано влияние различных параметров (концентрации реагентов, типа и степени модификации поверхности микросфер, природы носителя в составе агглютинатора) на скорость реакции агглютинации и на предельное значение оптического поглощения, зарегистрированное в ходе реакции. Выявлены оптимальные параметры биореагентов для определения 2,4-D путем ингибирования реакции латексной агглютинации с турбидиметрической регистрацией результатов.

Ключевые слова: реакция латексной агглютинации; полимерные микросферы; гаптен; агглютинатор; турбидиметрический анализ; 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота.

ВВЕДЕНИЕ

Реакция латексной агглютинации используется в клинической химии в течение многих лет как простой, быстрый и недорогой метод определения белков, гормонов и других биологически активных соединений. Белки, являясь поливалентными антигенами, вступают в реакцию с антителами с образованием иммунных комплексов, или агглютинатов [1]. Как правило, иммунные комплексы слабо визуализируются не только невооруженным глазом, но и с помощью фотометрических методов. Использование дисперсионных полимеров (латексов), сенсibilизированных антителами или антигенами, позволяет значительно облегчить детекцию реакции агглютинации, которая в этом случае называется реакцией латексной агглютинации.

Моновалентные антигены (гаптены) при взаимодействии с антителами не образуют агглютинатов, поэтому для их определения используется метод ингибирования реакции латексной агглютинации, в которой антитела вступают в конку-

рентные реакции со свободным гаптенем и гаптенем, конъюгированным с носителем. Основными реагентами для определения гаптенем этим методом являются полимерные микросферы, сенсibilизированные соответствующими антителами, поливалентный антиген (агглютинатор) и сам гаптен (ингибитор) [2].

Результаты реакции могут учитываться как визуально (на стекле, в пробирке или в планшете), так и с использованием различных приборов, позволяющих количественно определять содержание антител или антигенов в анализируемом образце. Одним из инструментальных методов детекции латексной агглютинации является турбидиметрический анализ, в основе которого лежит способность агрегатов частиц рассеивать свет более интенсивно по сравнению с отдельными частицами. По изменению интенсивности проходящего через образец света можно исследовать процесс агрегации частиц [3].

Полимерные частицы, используемые в данном методе анализа для иммобилизации антител, должны иметь диаметр 100–150 нм, узкое распределение по размерам, содержать функциональные группы, которые могут химически связывать антитела, обладать агрегативной устойчивостью, в том числе в средах с высокой ионной силой, например, в физиологических растворах. Микросферы должны также давать значительное изменение величины оптического поглощения в процессе реакции и высокую воспроизводимость результатов анализа [4]. Известные коммерческие

Сокращения: OVA – овальбумин; Аса – 6-аминокапроновая кислота; 2,4-D – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; MS-Ab и MS-Аса-Ab – конъюгаты антител (Ab) на основе сополимерных микросфер (MS); 2,4-D-OVA, 2,4-D-PAA – агглютинаторы на основе овальбумина и полиакриламида; ΔA_{\max} – предельное значение величины оптического поглощения; $\Delta A/\text{мин}$ – скорость реакции латексной агглютинации.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 336-06-00; e-mail: zubov@ibch.ru).

образцы полимерных микросфер относительно дороги и не всегда отвечают требованиям данного метода. Поэтому продолжает оставаться актуальной задачей синтез новых частиц, обладающих вышеперечисленными свойствами.

Агглютинатор, использующийся в анализе методом ингибирования латексной агглютинации, представляет собой гаптен или антиген, конъюгированный с носителем, в качестве которого может выступать глобулярный белок, полисахарид или синтетический полимер [5]. Агглютинатор вступает в реакцию с антителами, иммобилизованными на полимерных микросферах, вызывая специфическую агрегацию последних.

Природа агглютинатора играет важную роль при проведении реакции ингибирования латексной агглютинации. Чем меньше концентрация агглютинатора, обеспечивающая возможность контроля за реакцией, тем ниже минимальная детектируемая концентрация гаптена (т.е. выше чувствительность метода). При синтезе агглютинатора необходимо оптимизировать не только природу носителя, но и его молекулярную массу, а также содержание гаптена в агглютинаторе [6]. При использовании традиционных носителей, например альбумина, не все указанные параметры можно регулировать. Напротив, синтетические полимеры, в том числе полиакриламид, дают возможность получать агглютинаторы определенной молекулярной массы с требуемым содержанием гаптена, обладающие химической и иммунологической инертностью.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы представляем новые дисперсионные и водорастворимые полимерные носители для получения соответственно латексных иммунореагентов и агглютинаторов. Применение данных соединений в турбидиметрическом методе анализа позволяет исследовать кинетические закономерности реакции агглютинации. В качестве дисперсионных носителей использовали полимерные микросферы, полученные сополимеризацией стирола и акролеина, которые имеют на поверхности альдегидные группы для ковалентного связывания антител. Агглютинаторы были получены на основе овалбумина и синтетического водорастворимого полимера поли(4-нитрофенил-акрилата). В качестве анализируемого гаптена использовали широко применяемый в сельском хозяйстве гербицид – 2,4-дихлорфеноксисуксиную кислоту.

При выборе полимерных носителей для турбидиметрических исследований следует учитывать ряд факторов, которые влияют на эффективность данного метода: диаметр микросфер (распределение частиц по размерам), плотность,

показатель преломления, наличие функциональных групп на поверхности, коллоидную стабильность. Благодаря броуновскому движению частицы с размерами 100–300 нм активно перемещаются в водной фазе, что препятствует их оседанию на дно кюветы. Низкая плотность полимерных частиц также повышает седиментационную устойчивость суспензии. Чем выше показатель преломления частиц, тем сильнее они рассеивают свет, а, следовательно, выше интенсивность сигнала. Полистирольные микросферы в основном отвечают перечисленным требованиям [4].

Агрегативно устойчивые полистирольные частицы с узким распределением частиц по размерам (коэффициент вариации 5%), имеющие диаметр 150 нм, получают безэмульгаторной радикальной полимеризацией стирола [7], но отсутствие функциональных групп ограничивает их применение в иммуноанализе. Для введения требуемых групп используют привитую полимеризацию соответствующего мономера на поверхность полистирольных микросфер [8]. Так, путем сополимеризации с акролеином можно синтезировать полимерные микросферы, содержащие на поверхности альдегидные группы. Такие частицы удовлетворяют требованиям спектрофотометрического анализа и позволяют ковалентно связывать антитела.

В данной работе получены частицы, которые состоят из полистирольного ядра и полиакролеиновой оболочки. Поиск оптимальной концентрации вводимого акролеина показал, что при повышении концентрации акролеина в процессе модификации частиц полистирольной дисперсии возрастала концентрация поверхностных альдегидных групп, но снижалась агрегативная устойчивость частиц (таблица). Было найдено, что полимерная суспензия с диаметром частиц 150 нм и содержанием альдегидных групп 10,2 мкмоль/г отвечает требованиям турбидиметрического анализа. Данную суспензию далее использовали для иммобилизации антител.

Сенсибилизацию полимерных микросфер антителами против 2,4-D проводили либо путем прямой реакции поверхностных альдегидных групп с белками по их первичным аминогруппам, либо при участии спейсера, 6-аминокапроновой кислоты (Аса). Иммунохимическую активность всех агглютинаторов предварительно проверяли в реакции латексной агглютинации в планшете с окрашенными полиакролеиновыми микросферами, сенсибилизированными антителами к 2,4-D, которые были получены нами ранее [6].

Необходимое условие при проведении турбидиметрического анализа – агрегативная и седиментационная устойчивость сенсибилизированных микросфер, т.е. постоянство значения оптического поглощения анализируемой пробы при отсутствии в системе агглютинирующего агента.

Концентрация альдегидных групп на поверхности частиц суспензии сополимера стирол/акролеин и агрегативная устойчивость* данных суспензий в растворе электролита (NaCl)

Акролеин в расч. на стирол, мас. %**	[CHO], мкмоль	[NaCl], М					
		1.0	0.6	0.4	0.3	0.15	0.015
0	—	+	+	+	+	+	+
1.5	10.2	—	—	+	+	+	+
3.0	14.3	—	—	—	—	+	+
5.0	17.3	—	—	—	—	+	+
10.0	18.1	—	—	—	—	—	+

* Знаками "+" и "-" обозначены устойчивость и неустойчивость.

** Количество, вводимое в сополимеризацию.

Поэтому для всех конъюгатов антител первоначально были проведены контрольные опыты в отсутствие агглютинаторов. Суспензию сенсibilизированных частиц и боратный буфер вносили в кварцевую кювету, перемешивали и следили за изменением оптического поглощения образцов во времени с помощью спектрофотометра. В течение 600 с эта величина оставалась постоянной, то есть, данные частицы не подвергались спонтанной агрегации и сохраняли седиментационную устойчивость при выбранных условиях реакции, что свидетельствует о возможности использования синтезированных нами сополимерных частиц в турбидиметрическом анализе реакции латексной агглютинации.

На рис. 1 представлены результаты кинетических исследований реакции агглютинации конъюгатов на основе сополимерных микросфер с нагрузкой антител (10–25 мкг/мг латекса) и агглютинатора 2,4-D-OVA (90 нг/мл). После добавления агглютинатора к реакционной системе с MS-Aca-Ab с различной нагрузкой антител во всех случаях наблюдается устойчивый рост вели-

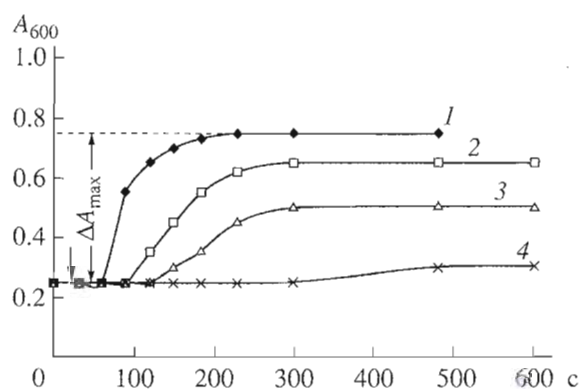


Рис. 1. Кинетические закономерности реакции латексной агглютинации между MS-Aca-Ab и 2,4-D-OVA (90 нг/мл). Нагрузка антител 25 (1), 15 (2), 10 (3) мкг/мг латекса; 15 (4) мкг/мг латекса (для MS-Ab, без спейсера). Стрелкой показан момент добавления 2,4-D-OVA.

чины оптического поглощения в течение 200 с с дальнейшим выходом на плато (ΔA_{\max}). Эти предельные значения ΔA_{\max} остаются неизменными до конца эксперимента. Скорость изменения оптического поглощения суспензии в начале реакции и величина предельного значения ΔA_{\max} возрастают с увеличением концентрации иммобилизованных антител. Максимальное значение ΔA_{\max} , равное 0.5, получено для MS-Aca-Ab с наибольшей нагрузкой антител (25 мкг/мг латекса).

В случае использования конъюгатов MS-Ab (без спейсера) введение агглютинатора практически не изменяло значения оптического поглощения образца, т.е. отсутствовало взаимодействие MS-Ab и молекул агглютинатора, что может быть вызвано стерическими причинами. Повышение нагрузки антител в MS-Ab, не модифицированных Aca, до 20 мкг/мг латекса приводило к неспецифической агрегации частиц.

Было изучено влияние концентрации агглютинатора 2,4-D-OVA (45–140 нг/мл) на протекающие реакции агглютинации (рис. 2). Увеличение концентрации агглютинатора и количества иммобилизованных на микросферы антител ускоряло данную реакцию и повышало значение ΔA_{\max} . Максимальные значения скорости и ΔA_{\max} получены при добавлении 2,4-D-OVA (140 нг/мл) к MS-Aca-Ab (25 мкг/мг латекса).

При добавлении синтетических агглютинаторов 2,4-D-РАА (90 нг/мл) с различным содержанием 2,4-D к MS-Aca-Ab (15 и 25 мкг/мг латекса) были сняты кинетические кривые, аналогичные приведенным выше для агглютинатора на основе глобулярного белка. Повышение нагрузки антител на полимерные частицы увеличивает значения $\Delta A/\text{мин}$ и ΔA_{\max} (рис. 3). Следует отметить, что для всех MS-Aca-Ab в реакции с 2,4-D-РАА при содержании 2,4-D 2.5 мол. % получены более высокие значения $\Delta A/\text{мин}$, чем с 2,4-D-OVA (90 нг/мл), но значения ΔA_{\max} ниже. С увеличением содержания 2,4-D в агглютинаторе до 10 мол. % реакция протекает почти в два раза медленнее,

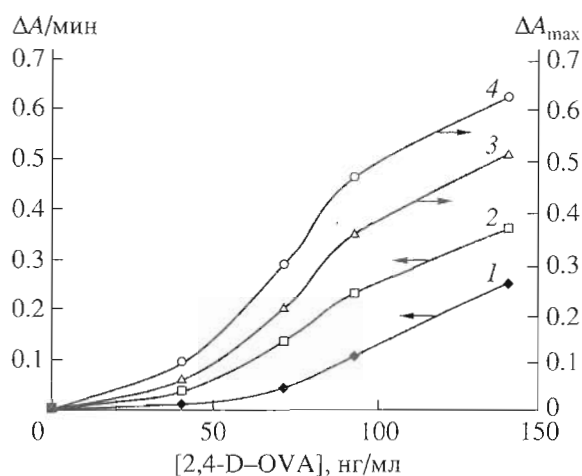


Рис. 2. Зависимость скорости реакции агглютинации (1, 2) и предельной величины оптического поглощения (3, 4) от концентрации 2,4-D-OVA для конъюгатов MS-Aca-Ab с нагрузкой антител 15 (1, 3) и 25 (2, 4) мкг/мг латекса.

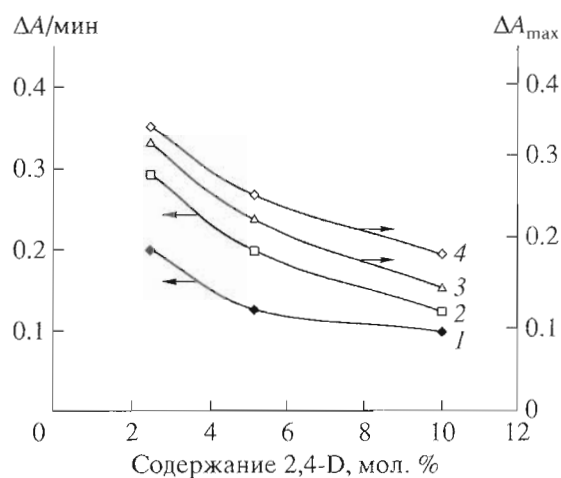


Рис. 3. Зависимость скорости реакции агглютинации (1, 2) и предельной величины оптического поглощения (3, 4) от содержания 2,4-D в агглютинаторе 2,4-D-РАА для MS-Aca-Ab с нагрузкой антител 15 (1, 3) и 25 (2, 4) мкг/мг латекса.

при этом ΔA_{max} падает с 0.34 до 0.2 для MS-Aca-Ab (25 мкг/мг латекса), имеющих по сравнению с MS-Aca-Ab (15 мкг/мг латекса) наибольшие значения скорости и предельного значения оптического поглощения в реакции с 2,4-D-РАА (90 нг/мл) с различным содержанием 2,4-D.

Для проведения реакции ингибирования с целью определения гаптена 2,4-D были выбраны реагенты, имеющие оптимальные показатели в прямой реакции агглютинации: MS-Aca-Ab (25 мкг/мл), 2,4-D-OVA (140 нг/мл), 2,4-D-РАА (2.5% замещения, 90 нг/мл). MS-Aca-Ab смешивали со свободным 2,4-D, выдерживали при комнатной температуре, затем добавляли агглютинатор и следили за изменением оптического поглощения. Увеличение концентрации 2,4-D в присутствии как 2,4-D-OVA, так и 2,4-D-РАА выше 10 нг/мл приводит к снижению $\Delta A/\text{мин}$ и ΔA_{max} , причем большая степень ингибирования была зарегистрирована для синтетического агглютинатора (50% ингибирования при 25 нг/мл) (рис. 4).

Таким образом, проведенные исследования показали, что турбидиметрия является простым и быстрым методом при изучении кинетики реакции латексной агглютинации. Данный метод позволяет регистрировать специфическую агрегацию частиц через определенные промежутки времени сразу после введения агглютинирующего агента, а не только по окончании реакции агглютинации или реакции ингибирования агглютинации. Скорость реакции и предельное значение оптического поглощения, измеряемые в данном анализе, являются важнейшими характеристиками системы, которые дают возможность оптимизировать условия для проведения реакции латексной агглютинации. Продолжение турбидиметри-

ческих исследований реакции ингибирования латексной агглютинации позволит создать диагностическую тест-систему для определения 2,4-D.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Мономеры (стирол, акролеин), инициаторы очищали по методикам [9]. Средний диаметр полимерных микросфер измеряли на субмикронном анализаторе частиц "Coulter N4-MD" (Coultronics, France). Агрегативную стабильность полимерных суспензий оценивали визуально при смешивании

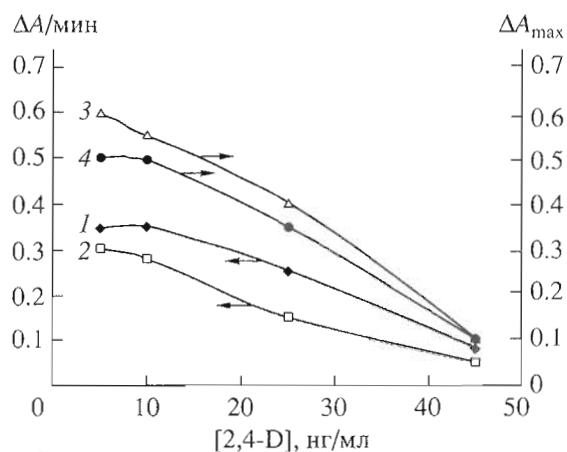


Рис. 4. Зависимость скорости реакции ингибирования латексной агглютинации (1, 2) и предельной величины оптического поглощения (3, 4) от концентрации свободного 2,4-D для: MS-Aca-Ab (25 мкг/мг латекса) и 2,4-D-OVA (140 нг/мл) (1, 3); MS-Aca-Ab (25 мкг/мг латекса) и 2,4-D-РАА (2.5 % зам., 90 нг/мл) (2, 4).

на стекле капли суспензии и капли раствора хлорида натрия различной молярности.

В данной работе использовали модельную систему антиген 2,4-D–антитело (моноклональные антитела против 2,4-D, клон 4/E2/G2 (МГУ) [10]).

Получение полимерных микросфер. Полимерные микросферы с функциональными группами на поверхности были получены привитой полимеризацией акролеина на частицы полистирола.

Для синтеза полистирольных частиц был использован метод безэмульгаторной эмульсионной полимеризации стирола при соотношении фаз мономер–вода, 1 : 9 (по объему), концентрации инициатора персульфата калия 1.5 мас. % в расчете на мономер и температуре 80°C [7].

Модификацию микросфер полистирола акролеином проводили при достижении 95% конверсии стирола: после понижения температуры до 50°C в реактор добавляли акролеин (0–10 мас. % в расчете на стирол) и при постоянном перемешивании выдерживали в течение 1 ч при данной температуре, а затем 2 ч при 80°C. Полученные полимерные суспензии трижды отмывали от реакционной смеси водой, отделяя осадок центрифугированием. К осадку добавляли дистиллированную воду до концентрации полимера 5%. Концентрацию альдегидных групп определяли спектрофотометрически с помощью *n*-нитрофенилгидразина [11].

Получение агглютинатора на основе овальбумина. Агглютинатор 2,4-D–OVA получали по методике, описанной в работе [12], путем взаимодействия 2,4-D с OVA в присутствии карбодиимида и *N*-гидроксисукцинимиды (метод активированных эфиров). Содержание 2,4-D в данном агглютинаторе составляло 25 мол. %.

Синтетические агглютинаторы 2,4-D–РАА были получены конденсацией гаптена (2,4-D) с поли(4-нитрофенилакрилатом).

Поли(4-нитрофенилакрилат) получали полимеризацией 4-нитрофенилакрилата в присутствии 2,2'-азо-*бис*-изобутиронитрила в сухом бензоле по методике [13]. 2,4-D для введения в реакцию конденсации модифицировали гексаметилендиаминным спейсером. Реакцию модификации проводили в сухом диметилформамиде в присутствии триэтиламина по методике [14]. Содержание 2,4-D в образцах составляло 2.5, 5, 10 мол. %. Полимерные имели молекулярную массу 30 кДа. Все синтетические агглютинаторы были исследованы в прямой реакции латексной агглютинации методом турбидиметрии.

Реакция латексной агглютинации в планшете. Иммунохимическую активность всех агглютинаторов определяли в реакции латексной агглютинации в планшете с помощью окрашенных частиц полиакролеиновых суспензий (*d* 1.8 мкм), сенсibilизированных антителами к 2,4-D [6].

Сенсibilизацию полимерных микросфер антителами к 2,4-D осуществляли двумя способами: а) путем ковалентного связывания антител с поверхностными альдегидными группами частиц сополимера (MS-Ab) или б) с помощью спейсера – 6-аминокапроновой кислоты (MS-Aca-Ab).

а) Конъюгаты MS-Ab. К 0.1 мл 5% суспензии и 0.4 мл 0.1 М Na-боратного буфера (рН 8.2) (буфер А) добавляли 250–300 мкл препарата антител (0.35 мг/мл в 0.1 М фосфатно-солевом буфере, рН 7.4) и инкубировали на водяной бане 30 мин при 56°C. Для остановки реакции и удаления непрореагировавших компонентов к конъюгатам добавляли 0.1 М Na-боратный буфер (рН 8.2) с OVA (10 мг/мл) (буфер Б), затем трижды отмывали центрифугированием с последующим редиспергированием в 5 мл буфера Б.

б) Конъюгаты MS-Aca-Ab. К 3 мл 3% водного раствора 6-аминокапроновой кислоты по каплям добавляли 1 мл 5% суспензии латекса. рН суспензии доводили до 9.0 с помощью 0.1 н. NaOH. Реакционную смесь перемешивали в течение 32 ч при комнатной температуре. Для остановки реакции добавляли 0.2 мл этаноламина и инкубировали в течение ночи при 4°C. Перемешивали 4 ч с боргидридом натрия (0.05 г), а затем суспензию полимера трижды отмывали дистиллированной водой с помощью центрифугирования [3].

Осадок, полученный после центрифугирования 0.125 мл 5% суспензии частиц, модифицированных Аса, ресуспендировали в 0.125 мл 0.5% раствора 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорида в буфере А. После перемешивания в течение 15 мин при 4°C суспензию частиц добавляли к 0.2 мл буфера А, содержащего 180–450 мкл антител против 2,4-D (0.35 мг/мл в 0.1 М фосфатно-солевом буфере, рН 7.4). Смесь перемешивали 1 ч при комнатной температуре, добавляли 0.01 мл 0.1 М раствора глицина для остановки реакции. Конъюгаты MS-Aca-Ab трижды отмывали центрифугированием и редиспергировали в 5 мл буфера Б [15].

В случаях а) и б) количество связанного белка определяли по разнице между количеством белка, добавленного в реакционную смесь, и несвязавшимся белком, количество которого измеряли по методу Лоури [16]. Для турбидиметрических исследований использовали 0.1% конъюгаты MS-Ab и MS-Aca-Ab, имеющих нагрузку антител (мкг в расчете на 1 мг полимера в суспензии) 15 и 20 (для MS-Ab), 10, 15 и 25 (для MS-Aca-Ab).

Турбидиметрический метод исследования реакции латексной агглютинации. Процесс агрегации конъюгатов полимерных микросфер, иницированный добавлением агглютинатора проводился на спектрофотометре “Ultrospec” (LKB, Швеция) при 600 нм. При проведении прямой реакции агглютинации через 5 с после перемешива-

ния в кварцевой кювете 200 мкл конъюгата анти-тел в 660–755 мкл буфера А с 45–140 мкл раствора агглютинатора 2,4-D-OVA в воде (1 мкг/мл) или с 90 мкл раствора агглютинатора 2,4-D-РАА в воде (1 мкг/мл) в течение 600 с измеряли оптическое поглощение суспензии. Скорость реакции агглютинации ($\Delta A/\text{мин}$) определяли по тангенсу угла наклона прямолинейного участка кривой, фиксирующей увеличение относительного оптического поглощения. Значение предельного оптического поглощения ΔA_{max} определяли как разность начального оптического поглощения образца и максимального значения, полученного при реакции агглютинации.

Реакцию ингибирования латексной агглютинации конъюгата MS-Aca-Ab (25 мкг/мг латекса) с 2,4-D проводили в присутствии агглютинаторов. Предварительно при комнатной температуре смешивали 200 мкл конъюгата антител в 615–705 мкл буфера А и 5–45 мкл раствора 2,4-D в воде (1 мкг/мл) и через 10 мин после добавления 140 мкл водного раствора агглютинатора 2,4-D-OVA (1 мкг/мл) или 90 мкл водного раствора 2,4-D-РАА со степенью замещения 2.5% (1 мкг/мл) ход реакции контролировали спектрофотометрически.

Авторы выражают благодарность Н. В. Бовину (ИБХ РАН) и С. А. Еремину (МГУ) за предоставление синтетических агглютинаторов и моноклональных антител, а также д-ру Г. Хуглю и д-ру А. Нанну (Boyer AG) за методическую помощь и обсуждение результатов работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пол У. Иммунология: Пер. с англ. М.: Мир, 1987. С. 14–45.
2. Bangs L.B. Uniform Latex Particles. Indianapolis: Seradyn Inc., 1987. 67 p.
3. Kitano H., Iwai S., Okubo T., Ise N. // J. Am. Chem. Soc. 1987. V. 109. P. 7609–7612.
4. Thompson J.C., Craig A.R., Davey C.L., Newman D.J., Lonsdale M.L., Bucher W.J., Nagle P.D., Price C.P. // Clin. Chem. 1997. V. 43. P. 2384–2389.
5. Lukin Yu.V., Dokuchaev I.M., Polyak I.M., Eremin S.A. // Anal. Lett. 1994. V. 27. P. 2973–2982.
6. Lukin Yu.V., Generalova A.N., Tyrtyshev T.V., Eremin S.A. // Immunochemical Technology for Environmental Applications / Eds Aga D.S., Thurman E.M. Washington: Am. Chem. Soc.; ACS Symposium Series 657. 1997. P. 97–105.
7. van der Hul H.J., Vanderhoff J.W. // Brit. Polym. J. 1970. V. 2. P. 121–127.
8. Montagne P., Omari R.E., Cliquet F., Cuilliere M.L., Duheille J. // Bioconjugate Chem. 1992. V. 3. P. 504–509.
9. Грицкова И.А., Седякова Л.И., Мурадян Д.С., Синцаев Б.М., Павлов А.В., Праведников А.Н. // Докл. АН СССР. 1978. Т. 243. С. 403.
10. Лунская И.А., Еремин С.А., Егоров А.М., Коллар В., Франек М. // Агрохимия. 1993. № 2. С. 113–118.
11. Margel S. // J. of Polymer Sci. 1984. V. 22. P. 3521–3533.
12. Еремин С.А., Лунская И.А., Самсонова Ж.В., Егоров А.М. // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. С. 836–844.
13. Ivanov A.E., Belov S.V., Zubov V.P. // J. of Polymer Sci. 1993. V. 35. P. 1093–1098.
14. Bovin N.V., Korchagina E.Yu., Zemlyanukhina T.V., Byramova N.E., Galanina O.E., Zemlyakov A.E., Ivanov A.E., Zubov V.P., Mochalova L.V. // Glycoconjugate J. 1993. V. 10. P. 142–151.
15. Kondo A., Kawano T., Higashitani K. // J. of Ferment. and Bioengin. 1992. V. 73. P. 435–439.
16. Практическая химия белка. М.: Мир, 1989. С. 293.

The Turbidimetric Study of Latex Particle Agglutination: Assay of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid

A. N. Generalova, A. N. Buryakov, Yu. V. Lukin, and V. P. Zubov[#]

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

By the example of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) assay by the inhibition of latex agglutination, new synthetic polymer microspheres for the conjugation with antibodies to 2,4-D and agglutinators based on ovalbumin and polyacrylamide were developed and characterized. The effect of various parameters (the concentration of reagents, the type and the degree of modification of the microsphere surface, and the nature of the carrier in the composition of the agglutinator) on the rate of agglutination and the maximal optical absorption observed during the reaction were studied by turbidimetry. The optimal parameters were found for the assay of 2,4-D by the inhibition of latex agglutination with turbidimetric registration of the results.

Key words: agglutinator, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, hapten, latex particle agglutination, polymer microspheres, turbidimetric analysis

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 336-0600; e-mail: zubov@ibch.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 7. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.