



УДК 615.214.24:57.083.3:535.518

© 1993 А. Б. Дзгоев *, С. А. Еремин *, М. В. Карпов **,
Н. П. Данилова, Р. Г. Василев, А. М. Егоров *

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОБАРБИТАЛА МЕТОДОМ ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛУОРОИММУНОАНАЛИЗА. ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ ИММУНОГЕНА И ТРЕЙСЕРА НА СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ПРЕДЕЛ ДЕТЕКЦИИ

НПО «Биотехнология», Москва;

* Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет;

** Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова

Исследовано влияние структуры иммуногена и меченного флуоресцентной меткой антигена («трейсера») на специфичность и чувствительность ПФИА фенобарбитала. Показано, что структура «ножки» между гаптеном и белком-носителем в иммуногене не влияет на значения титра, константы аффинности антител к фенобарбиталу. Антисыворотки (I) и (III), полученные против иммуногенов с «ножкой», содержащей одну или три CN_2 -группы, имели примерно одинаковые значения титра антител — 6000—8000, а константы аффинности — $(3,0\text{—}4,9) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$. При этом «ножка» используемого трейсера (4) была наиболее короткой. Увеличение длины «ножки» трейсера снижало значения титра и константы аффинности. При использовании трейсера (6) — с наиболее длинной «ножкой» между гаптеном и флуоресцентной меткой — титр антисывороток (I) и (III) был заметно ниже — 2500—3500, а константы аффинности — $(1,0\text{—}1,9) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$.

Показано, что чувствительность ПФИА фенобарбитала снижается с увеличением длины «ножки» в иммуногене, используемом для получения антисыворотки. Значения нижнего предела обнаружения антигена для антисывороток (I) и (III) были 0,6—0,8 и 1,2—1,7 мкг/мл соответственно.

Показано, что на специфичность антител и чувствительность анализа фенобарбитала методом ПФИА существенно влияет не длина «ножек» иммуногена и трейсера, а их структурное сходство.

Получение антител для иммунохимического анализа гаптенов представляет собой многофакторную задачу, так как антитела способны распознавать как незначительные изменения в строении гаптена и «ножки» между ним и белком-носителем («ножка» иммуногена), так и сам белок-носитель. Изменяя используемый антиген, способ его конъюгирования и белок-носитель, можно получать антитела требуемой специфичности и разрабатывать методы иммунохимического анализа с заданной чувствительностью [1—4].

В иммуноанализе гаптенов важное значение имеет структура меченого антигена («трейсера»): чем более идентичными будут «ножка» между антигеном и флуоресцентной меткой и «ножка» в иммуногене, тем чувствительнее будет анализ [5].

Сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин, МкАт — моноклональные антитела, ПФИА — поляризационный флуоресцентный иммуноанализ.

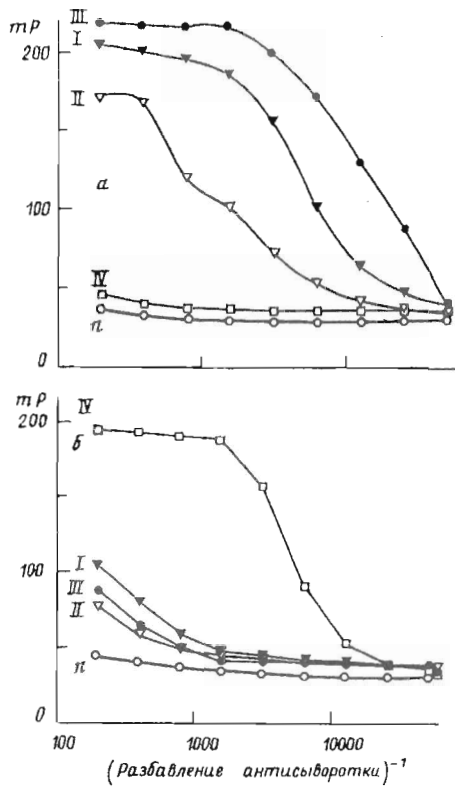


Рис. 1. Кривые титрования антисывороток (I)–(III) и моноклональных антител (IV) к фенобарбиталу: а — с использованием трейсера (4); б — с использованием трейсера (7). По оси абсцисс — разведение антисывороток, по оси ординат — измеряемая величина поляризации флуоресценции; н — нормальная сыворотка кролика

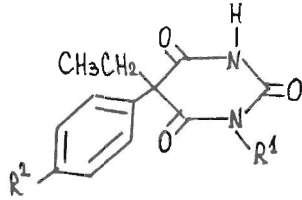
В предлагаемой работе ставилась задача исследовать влияние химической структуры иммуногена и трейсера на константы аффинности антител, специфичность и предел обнаружения в гомогенном ПФИА фенобарбитала (1) — одного из наиболее распространенных в медицинской практике антиконвульсантов. Структуры иммуногенов (2а, 2б, 2в), использованных для получения антисывороток (I)–(III) соответственно, отличаются от структуры иммуногена (3), использованного для получения моноклональных антител (IV) и поликлональной антисыворотки (V), местом присоединения антигена к белку-носителю. Структуры трейсеров (4–7) также различаются как местом присоединения антигена к флуоресцентной метке, так и длиной «ножки».

Применение в качестве меченого антигена трейсера (4) для титрования антисывороток (I)–(III) и МкАт (IV) показало, что МкАт (IV), полученные с использованием иммуногена (3), не взаимодействуют с трейсером (4) (рис. 1а). Объяснить это можно тем, что «ножки» иммуногена (3) и трейсера (4) различались местом присоединения к молекуле фенобарбитала. Антисыворотки (I)–(III), полученные с использованием иммуногенов (2а)–(2в), имеющих сходные «ножки» с трейсером (4), хорошо взаимодействовали с последним и имели значения титров до 1 : 8000 (табл. 1). Там же, где в эксперименте был использован трейсер (7) с «ножкой», имеющей сходство с «ножкой» иммуногена (3), МкАт (IV) давали титр 1 : 6000, а поликлональные антисыворотки (I)–(III) крайне слабо реагировали с этим трейсером (рис. 1б), т. е. для эффективного взаимодействия антител с меченым антигеном необходимо иметь сходные структуры иммуногена и трейсера, т. е. «ножка», соединяющая антиген и флуоресцентную метку в трейсере, должна располагаться строго идентично «ножке» иммуногена.

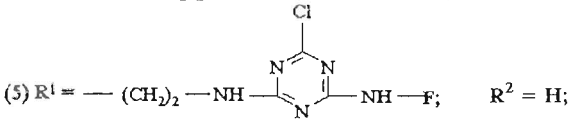
Таблица 1

Константы аффинности и титры антител, предел обнаружения фенобарбитала методом ПФИА, рассчитанные для различных комбинаций антисывороток и трейсеров

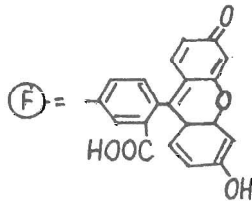
Иммуноген	Антисыворотка	Трейсер	Константы аффинности $K_1 \cdot 10^9, M^{-1}$	Титр антител	Предел обнаружения, мкг/мл
(2a)	(I)	(4)	$3,0 \pm 0,2$	6000	$0,6 \pm 0,1$
		(5)	$2,2 \pm 0,1$	1400	$0,9 \pm 0,1$
		(6)	$1,0 \pm 0,2$	2500	$0,8 \pm 0,1$
(2б)	(II)	(4)	$1,6 \pm 0,2$	1200	$0,8 \pm 0,1$
		(5)	$2,3 \pm 0,1$	1000	$0,9 \pm 0,1$
		(6)	$1,8 \pm 0,2$	2000	$1,0 \pm 0,1$
(2в)	(III)	(4)	$4,9 \pm 0,2$	8000	$1,2 \pm 0,1$
		(5)	$1,6 \pm 0,2$	1200	$1,7 \pm 0,1$
		(6)	$1,9 \pm 0,2$	3500	$1,4 \pm 0,1$
(3)	(IV)	(7)	$1,6 \pm 0,1$	6000	$2,6 \pm 0,1$
(3)	(V)	(7)	$3,2 \pm 0,2$	1000	$1,2 \pm 0,1$



- (1) $R^1 = R^2 = H$;
 (2) $R^1 = -(CH_2)_n - CONH - BSA$; $R^2 = H$;
 (2a) $n = 1$; (2б) $n = 2$; (2в) $n = 3$;
 (3) $R^1 = H$; $R^2 = -N=N - BSA$;
 (4) $R^1 = -(CH_2)_2 - NHCSNH - F$; $R^2 = H$;



- (6) $R^1 = -(CH_2)_2 - CONHCH_2CH_2NHCSNH - F$; $R^2 = H$;
 (7) $R^1 = H$; $R^2 = -NH - CS - NH - F$



Титр антител, константы связывания, нижний предел обнаружения

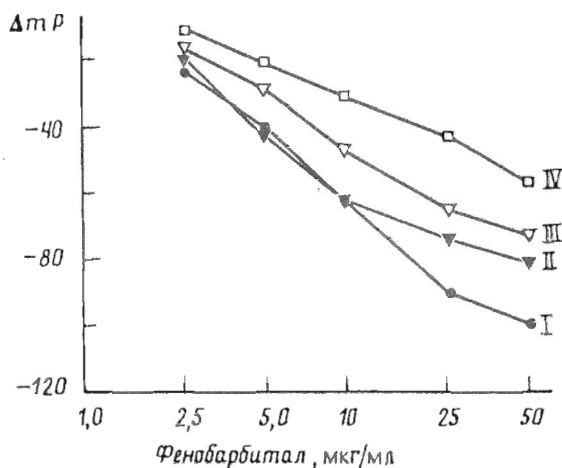


Рис. 2. Калибровочные кривые ПФИА фенобарбитала для антисывороток (I) — (III) с использованием трейсера (4) и моноклональных антител (IV) с использованием трейсера (7). По оси абсцисс — концентрация фенобарбитала в сыворотке крови (мкг/мл); по оси ординат — уменьшение измеряемой величины поляризации флуоресценции (ΔmP)

Известно, что, кроме изотопной метки (3H) [4], все остальные вводимые метки (ферменты, субстраты, флуорофоры и др.) приводят к изменению иммунологических свойств антигена. При этом специфичность антител в большой степени зависит от структуры «ножки» между антигеном и меткой [6, 7].

Из результатов исследований, приведенных в табл. 1, следует, что длина «ножки» трейсера влияет на титр, константу аффинности антител и чувствительность ПФИА. Значения нижнего предела обнаружения фенобарбитала и констант аффинности антител при использовании трейсера (4) в комбинациях с антисыворотками (I) и (III) были заметно лучше, чем при использовании трейсера (6).

Приведенные результаты показали, что по мере увеличения длины «ножки» между антигеном и белком-носителем в иммуногене чувствительность анализа с использованием получаемой антисыворотки ухудшается. Практически антисыворотки (I) и (III) одинаковы по аффинности и титру антител, но различаются по чувствительности. Нижний предел обнаружения фенобарбитала в анализе при использовании антисыворотки (I) был вдвое выше, чем при использовании антисыворотки (III). Вероятно, с увеличением длины «ножки» в иммуногене уменьшается относительное содержание высокоаффинной фракции антител, которая в основном и участвует в конкурентном взаимодействии меченого и немеченого антигена.

Поликлональные антисыворотки, как правило, гетерогенны и представляют собой набор субпопуляций антител с различной аффинностью и специфичностью к какому-то определенному участку антигена [8]. Количественный уровень субпопуляции с нужной специфичностью и аффинностью будет зависеть как от реактивности иммунной системы животного, так и от структуры иммуногена, т. е. можно предположить, что содержание высокоаффинной субпопуляции антител к фенобарбиталу в антисыворотке (III) было незначительно, что ухудшало чувствительность анализа.

Очевидно, для получения поликлональных антисывороток к фенобарбиталу предпочтительны более короткие, конформационно более устойчивые «ножки» между гаптеном и белком-носителем. Иммуноген с подвижной химической структурой увеличивает разнообразие антител в получаемой антисыворотке, но доля высокоаффинной фракции при этом будет понижаться, что в свою очередь отражается на чувствительности анализа. Вместе с тем данный вывод требует более полного экспериментального подтверждения.

Построенные калибровочные кривые (рис. 2) и рассчитанные величины нижнего предела обнаружения фенобарбитала в анализе показали, что наиболее чувствительной для антисывороток (I)—(III) система детекции получалась при использовании антисыворотки (I) и трейсера (4).

Предполагают, что изменение полярности «ножки» (трейсер (5)) приводит к уменьшению неспецифического взаимодействия и тем самым к увеличению чувствительности иммуноанализа [9]. Однако полученные нами при использовании этого трейсера результаты показали невысокую степень замещения при титровании антисывороток. Значения титров не превышали 1 : 1400, а нижний предел обнаружения в анализе достигал 1,7 мкг/мл, что значительно хуже, чем для трейсера (4).

Специфичность

В основе исследований влияния структурных особенностей иммуногенов и трейсеров на специфичность антител была реакция между фенобарбиталом, меченным флуоресцентной меткой, его структурным аналогом и антителами к фенобарбиталу. Процент перекрестного реагирования считали по формуле

$$(C_1 : C_2) \cdot 100\%,$$

где C_1 — концентрация фенобарбитала, определенная при 50%-ном связывании меченого флуоресцентной меткой антигена, C_2 — концентрация перекрестно реагирующего вещества, определяемая также при 50%-ном связывании меченого антигена.

В табл. 2 приводятся структурные формулы соединений — аналогов фенобарбитала и степень перекрестной активности для всех комбинаций трейсеров и антисывороток. Структуры родственных фенобарбиталу соединений различаются тем, что вместо фенильного кольца (R^3) содержат алифатические углеводородные цепи различной длины.

Выше мы отмечали, что при использовании трейсера (5) величины нижнего предела обнаружения фенобарбитала в ПФИА были хуже, чем при использовании трейсеров (4) и (6). Результаты перекрестного взаимодействия структурных аналогов фенобарбитала с различными антисыворотками при применении трейсера (5) показали, что только в случае антисыворотки (I) антигенсвязывающие центры антител «предпочитали» связывание с меченым антигеном связыванию с его структурными аналогами. Степень перекрестной реактивности не превышала в данном случае 10%. Однако для антител, полученных с использованием иммуногенов (2б) и (2в) (антисыворотки (II) и (III)), перекрестная реактивность при применении трейсера (5) была гораздо более высокой (от 1000 до 4700%), т. е. данный трейсер легко вытесняется в ходе конкуренции за активные центры антител структурными аналогами фенобарбитала из-за значительного различия в структурах «ножки» иммуногена и трейсера.

Сравнивая специфичность антисывороток (I)—(III) при применении трейсеров (4) и (6), можно предположить, что в антисыворотке (I) наиболее высокое относительное содержание антител, специфичных к антигенной детерминанте и «ножке» иммуногена, так как даже значительные изменения в структуре трейсера не оказывают сильного влияния на специфичность антител. Перекрестная реактивность для антисыворотки (I) не превышала 2,5% (бутетал, бутабарбитал).

Для антисыворотки (II), иммуноген которой (2б) отличался от иммуногена (2а) на одну CH_2 -группу, достаточная специфичность антител наблюдается при использовании трейсера (4), тогда как при использовании трейсера (6) наблюдается увеличение перекрестного взаимодействия до 15—20% (барбамил, этаминал-Na).

Увеличение длины «ножки» иммуногена еще на одну CH_2 -группу дало высокоаффинную субпопуляцию антител ($4,9 \cdot 10^9 M^{-1}$, при использовании трейсера (4)), но перекрестное взаимодействие со структурными аналогами фенобарбитала

Специфичность поляризационного флуороиммуноанализа фенобарбитала, рассчитанная для различных трейсеров и антисывороток *

барбитураты	R ³	Антисыворотки										
		(I) (II) (III) (IV) (V)										
		4	5	6	4	5	6	4	5	6	7	
Трейсер												
Фенобарбитал	C ₆ H ₅	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Бутабарбитал	CN(CH ₃)CH ₂ CH ₃	2,5	9,0	0,1	5,0	4000	10	500	1400	1,0	1,5	4,0
Бутетал	C ₂ H ₅ CH ₂ CH ₂ CH ₃	2,5	10	0,5	7,5	5500	0,5	800	1400	0,5	1,0	3,0
Барбитал	C ₂ H ₅	0,1	8,0	0,1	5,0	1000	1,0	200	1000	0,5	0,2	7,2
Барбамил	CN ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	0,1	1,0	0,1	0,5	4700	1,5	5000	2500	0,5	1,5	12,5
Этаминал-Na	CN(CH ₃)CH ₂ CH ₂ CH ₃	2,0	7,5	0,1	6,0	4650	20	760	2000	1,0	3,5	9,0

* Приведена степень перекрестной активности (в процентах) барбитуратов в ПФИА фенобарбитала.

выявило низкое относительное содержание этих антител в сыворотке (III). Перекрестная реактивность достигала 760—800% (этминал-На, бутетал). Поскольку высокая специфичность антител проявилась далее при использовании трейсера (6), можно предположить, что решающим здесь было возможное конформационное сходство на участках второй и третьей CH_2 -групп в «ножке» иммуногена и двух CH_2 -групп (фрагмент $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$) в трейсере (6), т. е. антисыворотка (III) содержала субпопуляцию антител, в формировании антигенсвязывающих центров которых большое значение имели две CH_2 -группы «ножки» иммуногена. Аффинность этой субпопуляции антител была сравнительно невысока — $1,6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ (табл. 1), но относительное содержание в сыворотке было достаточно высоким, что и предопределило специфическое взаимодействие при использовании трейсера (6) и антисыворотки (III).

Таким образом, полученные данные показали, что при определении уровня специфичности антисыворотки большое значение имеет структура используемого меченого антигена — его идентичность структуре исходного иммуногена. Так, поликлональная антисыворотка (III), например, может быть использована как для специфического анализа на фенобарбитал — при использовании трейсера (6), так и для анализа класса барбитуратов — при использовании трейсера (4).

МкАт (IV) и поликлональная антисыворотка (V), полученная с использованием иммуногена (3), в котором присоединение антигена к белку проводили по фенильному кольцу, были высокоспецифичными. Когда присоединение антигена идет по фенильному кольцу, оно может выполнять функции довольно жесткой части «ножки» иммуногена, а антитела в равной мере вырабатываются как на гетероцикл, так и на «ножку», составным элементом которой является фенильное кольцо молекулы антигена. Структурные аналоги фенобарбитала различаются наличием алифатических заместителей вместо фенильного радикала, и вырабатываемые антитела не реагируют на группы, отличные от последнего.

Полученные результаты нижнего предела обнаружения для антисыворотки (V) и МкАт (IV) ($1,2 \pm 0,1$ и $2,6 \pm 0,08$ мкг/мл) хуже, чем, к примеру, для антисыворотки (I) ($0,6 \pm 0,07$ мкг/мл), но достаточны для лекарственного мониторинга фенобарбитала, потому что концентрации менее 3 мкг/мл на оказывают терапевтического или токсического действия на организм пациента.

Экспериментальная часть

В работе были использованы фенобарбитал (5-этил-5-фенил-2,4,6-триоксогидропириимидин) и его структурно подобные аналоги: барбамил, бутабарбитал, бутетал, этаминал и барбитал — фирмы Sigma (США). Все растворы антисывороток и трейсеров готовили в 0,1 М фосфатном буферном растворе (рН 7,4) с бычьим гамма-глобулином (1 г/л) и азидом натрия (1 г/л).

Калибровочные стандарты готовили путем разбавления матричного раствора фенобарбитала в метаноле (1 г/л) в нормальной сыворотке человека до конечных концентраций: 2,5; 5,0; 10; 25; 50 мкг/мл.

Измерения поляризации флуоресценции проводили на анализаторе TDx (Abbott Laboratories), в котором используются поляризаторы на жидких кристаллах и специальные датчики для контроля постоянства температуры раствора. Точность измерения поляризации флуоресценции составляет 0,005 [10]. Флуоресцирующий раствор возбуждают светом λ 485 нм, поляризованным в вертикальной плоскости, а степень поляризации флуоресценции измеряют с помощью второго поляризатора (λ 525 нм), у которого плоскость поляризации периодически располагается вертикально или горизонтально. Из этих двух интенсивностей флуоресценции автоматически рассчитывается степень поляризации [10].

Синтез иммуногена фенобарбитала (3) [11]. К охлажденному на ледяной бане раствору 50 мг 5-этил-5-(4-аминофенил)барбитуровой кислоты, приготовленной из фенобарбитала нитрованием с последующим восстановлением, в 5 мл

0,1 М НСІ добавляли 20 мг NaNO₂ и полученную смесь перемешивали 10 мин. Избыток азотистой кислоты удаляли добавлением 10 мг мочевины. Затем 1 М раствором бикарбоната натрия устанавливали рН 8,6, после чего раствор диазотированного фенобарбитала добавляли по каплям к перемешиваемому раствору 60 мг БСА в 3 мл бикарбоната натрия. Реакцию проводили при 4° С в течение 30 мин. Полученный продукт очищали диализом 3 сут в проточной воде. Выделенное вещество лиофилизировали, получив 74 мг иммуногена (3). Количество молекул фенобарбитала в расчете на одну молекулу БСА определяли по интенсивности полосы циклического амида при 1770 см⁻¹ в ИК-спектре конъюгата, впрессованного в диски КВг. Согласно полученным данным, соотношение гаптен — БСА 28 : 1.

Иммуноген (3) использовали для получения специфичных к фенобарбиталу поликлональных антител (V).

Моноклональные антитела к фенобарбиталу (IV) получали путем слияния спленоцитов мышей линии BALB/C с клетками миеломной линии X63-Ag865.3 по методу Kohler и Milstein [12]. Для иммунизации мышей использовали иммуноген (3).

Поликлональные антисыворотки (I)—(III), полученные иммунизацией кроликов конъюгатами N¹-производных фенобарбитала с БСА с разной длиной «ножки» (иммуногены 2а, 2б, 2в), были любезно предоставлены нам проф. Ч. Кескеи (Институт изотопов, Будапешт, Венгрия).

Трейсер (7) синтезировали из 5 мг 5-этил-5-(4-аминофенил)барбитуровой кислоты и 8,5 мг флуоресцеинизотиоцианата в 0,5 мл пиридина. Реакцию проводили в темноте в течение 24 ч при 20° С. Затем реакционную смесь наносили на пластинку Силуфол УФ₂₅₄ (по 70 мкл на пластинку) и хроматографировали в системе этилацетат — метанол — уксусная кислота (90 : 8 : 2). Главную полосу с R_f 0,72 снимали с пластинки и элюировали продукт 3 мл метанола. Полученное соединение сохраняли в метанольном растворе при —20° С. Для приготовления рабочей концентрации трейсера 20 мкл метанольного раствора разбавляли 4 мл 0,05 М карбонатного буфера (рН 8,6), после чего спектрофотометрически определяли оптическое поглощение при длине волны 492 нм и по молярному коэффициенту поглощения флуоресцеина (8,78 · 10⁴ л · моль⁻¹ · см⁻¹) рассчитывали концентрацию приготовленного раствора. Трейсеры (4)—(6) были синтезированы в Институте изотопов (Будапешт, Венгрия).

Титрование антисывороток. В 10 кювет вносили по 500 мкл 0,1 М Na-фосфатного буферного раствора (рН 7,4), отбирали из первой 10 мкл раствора и добавляли туда 10 мкл антисыворотки (или асцитной жидкости в случае МкАт) и 500 мкл буферного раствора. Проводили серию последовательных двукратных разбавлений антител, после чего вносили во все кюветы по 500 мкл трейсера постоянной концентрации и после 3—5 мин инкубации измеряли поляризацию флуоресценции. По полученным результатам строили кривые разведения, определяли соотношение связавшегося и несвязавшегося трейсера, получая первоначальную оценку констант аффинности антисыворотки.

Расчет констант аффинности проводили путем построения графиков Скэтчарда в координатах: Y = [B/F], x = [B], где B и F — связанная и свободная формы антигена. При определении отношения свободной и связанной форм антигена использовали предлагаемую в работе [13] формулу:

$$(B/F)_i = (P_i - P_{\min}) / (P_{\max} - P_i),$$

где P_{min}, P_{max} — величины поляризации при минимальном и максимальном связывании антигена и антител; P_i — измеренная величина поляризации флуоресценции.

Калибровочные кривые для определения фенобарбитала. 500 мкл антисыворотки в разведении, дающем 75% связывания каждого трейсера, инкубировали 3—5 мин с калибровочными стандартами (20 мкл) и трейсером (500 мкл) и

измеряли поляризацию флуоресценции. Калибровочные графики строили в полулогарифмических координатах.

Минимальные детектируемые концентрации фенобарбитала мы определяли по методу Родбарда [14], рассчитывая стандартное отклонение при 20 повторных измерениях «нулевого» стандарта (нормальная сыворотка).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wie S. I., Hammock B. D.* // *J. Agric. Food Chem.* 1984. V. 32. P. 1294—1301.
2. *Qing Xiao Li, Meng Shu Zhao, Gee S. J., Kurth M. J., Seiberand J. N., Hammock B.* // *J. Agric. Food Chem.* 1991. V. 39. P. 1685—1692.
3. *Schneider P., Hammock B.* // *J. Agric. Food Chem.* 1992. V. 40. P. 525—530.
4. *Еремин С. А.* // *Журн. Всес. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева.* 1989. Т. 34. № 1. С. 46—51.
5. *Eremin S. A., Schiavetta D. E., Lotey H., Smith D. S., Landon J.* // *Ther. Drug Monit.* 1988. V. 10. № 5. P. 327—332.
6. *Sidki A. M., Al-Abdulla I. H., Rowell F. J.* // *Clin. Chem.* 1987. V. 33. № 4. P. 463—467.
7. *Cohon R. E., Gallacher G., Landon J., Rae C.* // *Ann. Clin. Biochem.* 1988. V. 25. № 1. P. 49—52.
8. *Иммунология.* Т. 3 // *Ред. У. Пол. М.: Мир,* 1989.
9. *Пат. США № 4420568.*
10. *Popelka S. R., Miller D. M., Holen J. T., Kelso D. M.* // *Clin. Chem.* 1981. № 27. P. 1198—1201.
11. *Bousquet E. W., Adams R.* // *J. Org. Chem.* 1930. V. 52. P. 224—229.
12. *Kohler G., Milstein C.* // *Nature.* 1975. V. 256. № 5517. P. 495—497.
13. *Dandliker W. B., Shapiro H. C., Meduski J. W., Alonso R., Faigen A., Hamrick J. R.* // *Immunochemistry.* 1964. V. 1. P. 165—191.
14. *Rodbard D.* // *J. Anal. Biochem.* 1978. V. 90. P. 1—12.

Поступила в редакцию
3.XI.1992

После доработки
13.I.1993

A. B. Dzgoyev, S. A. Eremin*, M. V. Karpov**, N. P. Danilova,
R. G. Vasilov, A. M. Egorov**

THE INFLUENCE OF STRUCTURE OF IMMUNOGEN AND TRACER ON SPECIFICITY AND DETECTION LIMIT OF PHENOBARBITAL BY POLARISATION FLUOROIMMUNOASSAY

SPA «Biotechnologia»;

** Department of Chemistry, Moscow State University;*

*** I. M. Sechenov Medical Academy, Moscow*

The influence of the immunogen's tracer's structure on properties of antibodies to phenobarbital was studied by the polarisation fluoroimmunoassay method. It was shown that in homogeneous method of polarisation fluoroimmunoassay the titer of antibodies to phenobarbital (1/1000—1/10 000) is affected by the position of linker binding the antigen with carrier-protein and by the structure of the linker. The affinity constant ($(1-4) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$), cross-reactivity, limit of the detection (0,6—2,6 $\mu\text{g/ml}$) phenobarbital with different combinations of antibodies and tracers were calculated. The antisera grew the more heterogeneous in affinity and specificity, the longer became the linker. The more heterogeneous antibodies are preferable in the class specific assay of barbiturates.