



УДК 547.588 : 57.083.3 : 535.518

© 1993 С. А. Еремин, И. М. Лунская, А. М. Егоров

**ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ ТРЕЙСЕРА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ  
И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛУОРОИММУНОАНАЛИЗА  
2, 4-ДИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ***Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет*

Дана сравнительная оценка влияния длины химической «ножки» (количество  $\text{CH}_2$ -групп  $n = 2, 4, 6$ ) между антигеном и флуоресцентной меткой на константу связывания и специфичность антител к гербициду 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоте (2,4-D), а также чувствительность обнаружения 2,4-D методом поляризационного флуороиммуноанализа. Максимальное связывание антител наблюдается с трейсером с длиной «ножкой» и монотонно убывает с уменьшением длины химической «ножки». Константы аффинности для трейсеров с  $n = 2, 4$  и  $6$  составляли величины соответственно  $3 \cdot 10^8$ ,  $7 \cdot 10^7$  и  $5 \cdot 10^7 \text{M}^{-1}$ . Показано, что по мере уменьшения длины химической «ножки» специфичность анализа улучшалась. В случае использования трейсера с длинной ножкой ( $n = 6$ ) нижний предел обнаружения составил  $4,8$  мкг/мл, для трейсера с короткой ножкой ( $n = 2$ ) —  $0,5$  мкг/мл. Для постановки высокоспецифичного ПФИА на 2,4-D необходимо использовать трейсер с самой короткой «ножкой» ( $n = 2$ ), а трейсеры с более длинными «ножками» предпочтительнее применять для анализа класса арилоксиалкилкарбоновых кислот.

В последнее время метод поляризационного флуороиммуноанализа (ПФИА) нашел применение для контроля концентраций 2,4-D — одного из наиболее часто используемых гербицидов класса арилоксиалкилкарбоновых кислот в экстрактах из различных источников в целях охраны окружающей среды [1, 2]. Принцип ПФИА подробно описан в обзорах [3, 4]. Он основан на конкуренции определяемого антигена и антигена, меченого флуоресцентной меткой (трейсера), за ограниченное количество центров связывания антител и измерении поляризации флуоресценции реакционной смеси. Поляризация флуоресценции меченого антигена в растворе невелика и значительно возрастает при образовании иммунного комплекса с антителами. Чем выше концентрация определяемого антигена в пробе, тем в большей степени меченый антиген в реакционной смеси будет в свободном состоянии. Поэтому значение поляризации флуоресценции реакционной смеси будет ниже. Так как метод ПФИА не требует использования твердой фазы для разделения связанной и свободной фракции антител, он позволяет определять константу связывания для антител в растворе.

Сокращения: ПФИА — поляризационный флуоресцентный иммуноанализ, 2,4-D — 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота.

Данный метод анализа является гомогенным, осуществляемым в однофазной системе и не требующим механического разделения образовавшихся соединений. Он позволяет определять концентрацию антигена в течение нескольких минут.

В предлагаемой работе ставилась задача исследовать влияние химической структуры трейсера на константы связывания антител, специфичность и нижний предел обнаружения в гомогенном ПФИА гербицида 2,4-D.

Большинство гербицидов имеют небольшую молекулярную массу и приобретают иммуногенность только после конъюгирования с белком-носителем. В качестве последнего чаще всего используют бычий сывороточный альбумин, овальбумин, тироглобулин, гемоцианин моллюсков и др. Степень конъюгирования антигена с белком-носителем должна быть не менее 10 моль/моль. Увеличение ее несущественно влияет на качество антител, специфичность которых зависит в основном от места пришивки молекулы гаптена к белку-носителю, а также от природы и длины химической «ножки» между ними.

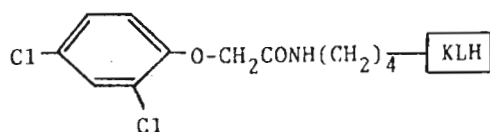
Антитела, как правило, вырабатываются на антигенную детерминанту, «ножку» и фрагмент белка-носителя [3]. В иммуноанализе гаптенных определенное значение имеет структура меченого антигена. Так, в работе [5] было показано: чем идентичнее «ножка» между антигеном и флуоресцентной меткой и «ножка» в иммуногене, тем чувствительнее анализ. Нельзя утверждать, что вышеупомянутая зависимость реализуется всегда. Она не является аксиомой для всех иммунохимических систем, а имеет место лишь в определенных случаях. В молекуле иммуногена химическая «ножка» может быть ориентирована в пространстве таким образом, что ее фрагмент будет экранирован большой молекулой белка-носителя и, следовательно, стерически не доступен при узнавании специфическим антителом. Таким образом, не исключена возможность, что, чем менее идентичными будут «ножка» между антигеном и флуоресцентной меткой и «ножка» в иммуногене, тем более чувствительным окажется анализ, т. е. не существует прямой зависимости между структурой «ножки» в иммуногене и трейсере, оказывающей однозначное влияние на чувствительность анализа.

Известно, что чувствительность иммунохимических методов определяется аффинностью антител, концентрацией меченого антигена и антител, а также методом проведения анализа и точностью получаемых данных. Оптимальная чувствительность конкурентного метода анализа достигается в случае соблюдения соотношения антиген — меченый антиген 1 : 1. Кроме того, концентрация меченого антигена должна лежать в пределах 0,3—20 нМ, чтобы отношение сигнал — фон составляло 100 : 1. Высокая аффинность антител позволяет достичь высокой чувствительности, но ограничивает диапазон, в пределах которого можно варьировать другие параметры. Например, в исследуемом образце, где немеченый антиген конкурирует с меченым, уменьшение концентрации метки до определенного уровня позволяет снижать минимальный предел обнаружения. Этот предел определяется величиной константы аффинности антител ( $K_{af}$ ) [6]. Аффинность антител с количественной стороны характеризует взаимодействие антиген — антитело и является фактически константой образования иммунокомплекса. Самый крутой участок кривой титрования соответствует концентрациям, близким к  $1/K_{af}$ . При значительно меньших, чем  $1/K_{af}$ , концентрациях антигена большинство антигенсвязывающих участков остается незанятым, вследствие этого конкуренция оказывается менее эффективной. Аналогичным образом понижение концентрации антител будет до определенного предела приводить к увеличению чувствительности метода. Этот предел зависит от значения  $1/K_{af}$  и от величины фонового «неспецифического связывания», т. е. уменьшение концентрации антител до того значения, когда связывание метки в отсутствие немеченого антигена становится слишком близким к уровню фона, будет приводить к потере чувствительности из-за понижения точности.

Константы аффинности, титр антисыворотки и предел обнаружения 2,4-D методом поляризационного флуороиммуноанализа с трейсерами с различной длиной «ножки»

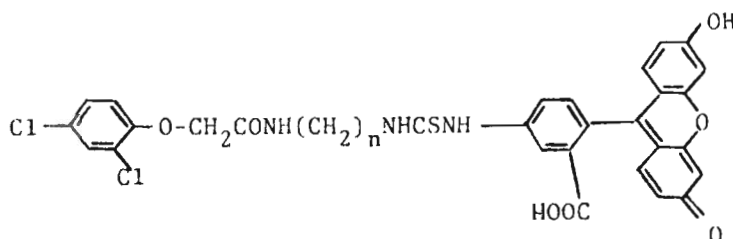
Трейсер	$K_{аф} \cdot 10^{-9}, M^{-1}$	Титр	Нижний предел обнаружения, мкг/мл
1	$0,30 \pm 0,09$	800	0,5
2	$0,07 \pm 0,02$	1440	3,5
3	$0,05 \pm 0,06$	2560	4,8

В данной работе использовалась поликлональная антисыворотка к 2,4-D, полученная иммунизацией кроликов конъюгатом 2,4-D с гемоцианином моллюсков (KLH) [1]:



При тестировании антисывороток к гаптенам гомогенным методом поляризации флуоресценции для объективной первоначальной оценки аффинности антител необходимо иметь различные (по длине химической «ножки») трейсеры. По иммунологическим свойствам меченый антиген не должен сильно отличаться от исходного антигена. Поэтому для создания структуры трейсера предпочтительны небольшие флуорогенные молекулы, которые отделены от молекулы антигена небольшой «ножкой». Химическая природа этой «ножки» играет ключевую роль в сохранении иммунологических свойств меченого антигена. Кроме длины такой промежуточной «ножки» определенное значение имеет ее химическая структура [3].

В работе исследовались трейсеры, различающиеся числом метиленовых групп пировок ( $n = 2, 4, 6$ ), отделяющих флуоресцентную молекулу от молекулы определяемого антигена (1—3):



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

Кривые разбавления наглядно демонстрируют, что максимальное связывание получаемых антител наблюдается с трейсером (3) и монотонно убывает с уменьшением длины химической «ножки» (рис. 1, табл. 1). Этот факт в первую очередь объясняется тем, что полученные антитела, по-видимому, способны реагировать не только с молекулой определяемого антигена, но и с химической «ножкой», что в свою очередь вносит некоторый вклад в связывание антител с молекулой меченого антигена и способствует увеличению поляризации флуоресценции. Получение антител для иммунохимического анализа гаптенов — многофакторная задача в силу того, что антитела способны распознать не только молекулу исследуемого гаптена, но и некоторую «ножку» между антигеном и белком-носителем, а в отдельных случаях и сам белок-носитель. Таким образом,

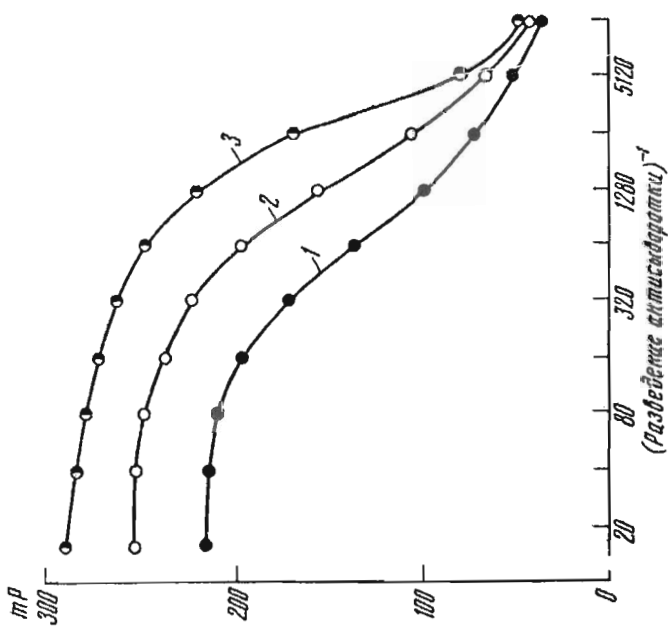


Рис. 1. Кривые титрования антиисворотки с различными трейсерами.  $mP$  — величина поляризации флуоресценции

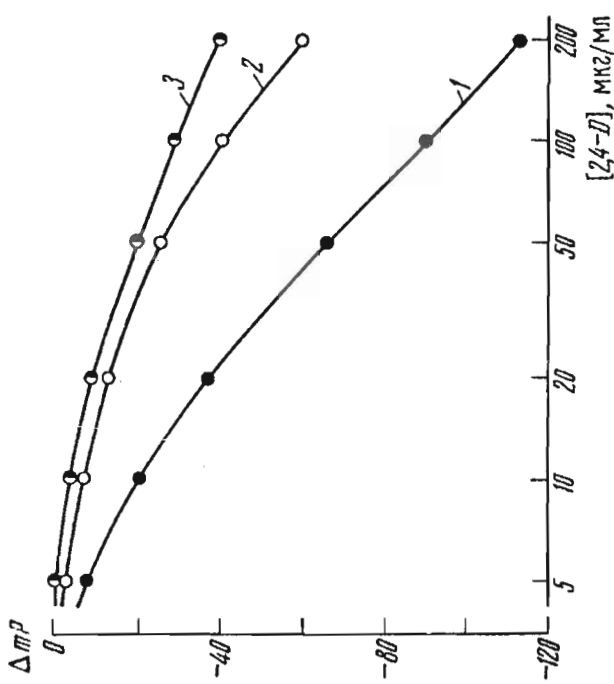


Рис. 2. Калибровочные кривые ПФИА 2,4-Д для различных трейсеров.  $\Delta mP$  — уменьшение измеряемой величины поляризации флуоресценции

варьируя способ конъюгирования и белок-носитель, возможно получать антитела требуемой специфичности и разрабатывать методы иммунохимического анализа с заданной чувствительностью [7—9]. Из вышесказанного можно предположить, что в данной работе были использованы фракции антител различной специфичности, т. е. антитела распознают не только молекулу антигена, но и фрагмент белка-носителя, который представляет собой своеобразную ножку между ними. По-видимому, антитела распознают не только антиген, но и остаток лизина, по концевой аминогруппе которого было проведено присоединение антигена к белку-носителю. Чем длиннее химическая «ножка» трейсера, тем большее количество антител, имеющих различные антигенсвязывающие участки, способно связываться с молекулой меченого антигена. Следовательно, максимальная поляризация флуоресценции наблюдалась в случае использования трейсера с самой длинной «ножкой».

Достаточно большой размер молекулы флуоресцеина относительно молекулы гаптена может вызывать стерические затруднения при связывании антитела с молекулой трейсера [10]. В случае трейсера с самой короткой «ножкой» (1) стерические затруднения наиболее выражены, так как относительно короткая «ножка» обеспечивает жесткую фиксацию флуоресцентной молекулы и вероятность того, что молекула флуоресцеина может экранировать молекулу антигена, тем самым препятствуя узнаванию антителом антигенной детерминанты, наибольшая. Кроме стерических затруднений на связывание антитела с трейсером влияет, уменьшая его, электростатическое отталкивание между заряженными группировками аминокислотных остатков антитела и молекулы флуоресцеина.

Наблюдаемая закономерность имеет место лишь в том случае, когда структуры иммуногена и трейсеров подобны по месту присоединения белка-носителя и флуорофора соответственно. По мере уменьшения длины химической «ножки» трейсера происходит возрастание степени вытеснения меченого антигена немеченым [10].

При построении калибровочных кривых с использованием синтезированных трейсеров было обнаружено, что наиболее чувствительный анализ обеспечивает применение трейсера с самой короткой химической «ножкой» (рис. 2). В иммунохимической системе при конкуренции определяемого антигена и антигена, меченого флуоресцентной меткой, за ограниченное количество центров связывания антитела равновесие будет сдвигаться в сторону образования комплекса определяемый антиген — антитело тем больше, чем легче будет происходить диссоциация комплекса меченый антиген — антитело. Очевидно, что при использовании трейсера с короткой химической «ножкой» из-за пространственных затруднений и электростатического отталкивания флуоресцентной метки заряженными группами антигенсвязывающего центра антитела диссоциация будет происходить легче и анализ будет более чувствительным. Чем длиннее химическая «ножка», тем прочнее антитело связывается с антигеном, меченым флуоресцентной меткой, и анализ менее чувствителен.

На нижний предел обнаружения иммуноанализа заметное влияние оказывает объем пробы. Чем он больше, тем чувствительнее может быть система. Однако при анализе гаптен в сыворотке крови методом ПФИА объем пробы можно увеличивать до определенного предела (до 50 мкл), так как с увеличением его возрастает неспецифическое связывание антител с рядом сывороточных белков (в первую очередь с альбуминами).

Минимальные детектируемые концентрации 2,4-D определяли по методу Родбарда [11] при 95% уровне достоверности, рассчитывая стандартное отклонение при 20 измерениях «нулевого» стандарта.

Из приведенных данных (табл. 1) видно, что по мере увеличения длины «ножки» для вытеснения трейсеров (2, 3) необходимо наличие большего количества антигена в растворе, чем при использовании трейсера (1). Это объясняется тем, что в случае применения трейсера (1) из-за пространственных затруднений и электростатического отталкивания флуоресцентной метки заряженными группами антигенсвязывающего центра антитела диссоциация комплекса антитело — ме-

Перекрестные реакции (%) для ПФИА 2,4-D  
с использованием трейсеров с различной длиной «ножки»

Соединение	Перекрестные реакции при 10 мкг/мл 2,4-D, %		
	Трейсер		
	(1)	(2)	(3)
2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота	100	100	100
2,4,5-Трихлорфеноксиуксусная кислота	62	760	800
2,4-Дихлорфенол	58	700	770
2-(2,4-Дихлорфенокси)масляная кислота	48	580	650
2-Метил-4-хлорфеноксимасляная кислота	8	490	510

ченный антиген будет происходить легче и можно определить меньшее количество антигена в растворе.

Похожая картина была и при расчете констант связывания. Из полученных данных (табл. 1) видно, что возрастание константы связывания антител при конкурентном взаимодействии меченого и немеченого 2,4-D происходило по мере уменьшения длины «ножки», причем при переходе от  $n = 2$  к  $n = 4$  наблюдается резкий скачок в значении констант связывания, а при переходе от  $n = 4$  к  $n = 6$  структура трейсера не оказывала заметного влияния на аффинность антител. В случае присутствия в растворе только меченого антигена константы связывания, как правило, возрастают по мере удлинения «ножки» в силу постепенного удаления молекулы флуоресцеина от антигенсвязывающего центра антитела в процессе образования иммунохимического комплекса и уменьшения их электростатического отталкивания [10]. При внесении в эту систему конкурирующего немеченого антигена наблюдается обратная картина. Данное явление объясняется кинетикой процесса образования и распада иммунокомплекса (антитело — меченый антиген) в конкурентной системе. Так, по мере увеличения длины «ножки» скорость диссоциации иммунокомплекса уменьшается, что в конечном итоге отражается на значении итоговой константы аффинности. В результате мы наблюдаем уменьшение константы аффинности по мере увеличения длины химической «ножки».

На специфичность антител влияет не только структура иммуногена, состоящая из молекулы антигена и химической «ножки» между гаптеном и белком-носителем, но, вероятно, и структурные особенности внутри этого «комплекса»: длина «ножки», место расположения ее по гаптену, трейсеру или белку-носителю.

Высокая специфичность антител наблюдается в случае использования трейсера с самой короткой ножкой, по мере увеличения длины ножки (от  $n = 2$  до  $n = 4, 6$ ) наблюдается резкое уменьшение специфичности, в то время как при переходе от  $n = 4$  к  $n = 6$  структура трейсера не оказывала заметного влияния на специфичность анализа (табл. 2).

Это можно объяснить, по-видимому, изменением иммунологических свойств меченого антигена, происходящим по мере удлинения «ножки», что следует отнести на счет конформационных преобразований пространственной структуры молекулы трейсера в растворе (возможность образования пространственных ротамеров). Иммунологические свойства изменяются настолько сильно при переходе к трейсерам (2) и (3), что соединения, близкородственные 2,4-D, намного легче вытесняют трейсер из иммунокомплекса (антитело — меченый антиген). Кроме того, причина наблюдаемого явления может состоять и в структурных особенностях

самих близкородственных соединений (характер и количество заместителей, распределение электронных плотностей и др.).

Таким образом, для постановки высокоспецифичного ПФИА на 2,4-D необходимо использовать трейсер с самой короткой «ножкой» (1), а трейсеры (2) и (3) предпочтительнее применять для анализа гербицидов класса арилоксиалкилкарбоновых кислот.

### Экспериментальная часть

В работе использовали 2,4-D и её структурные аналоги и продукты метаболизма: 2,4,5-трихлорфеноксигукусная кислота, 2,4-дихлорфенол, 2-(2,4-дихлорфенокси) масляная кислота, 2-метил-4-хлорфеноксимасляная кислота (Sigma, США). Все растворы антисыворотки и трейсеров готовили в 0,05 М боратном буферном растворе (рН 7,5) с азидом натрия (1 г/л). Калибровочные пробы готовили путем разбавления матричного раствора 2,4-D в метаноле (1 г/л) до конечных концентраций 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100; 200 мкг/мл.

Измерения поляризации флуоресценции проводили на анализаторе TDx (Abbott Laboratories, США) по программе «Photo Check». Воспроизводимость результатов измерения поляризации флуоресценции составляет 0,005 ед. миллиполяризации. Флуоресцирующий раствор возбуждали светом, поляризованным в вертикальной плоскости, и измеряли интенсивность флуоресценции при вертикальном и горизонтальном расположении второго поляризатора, помещенного на пути излучаемого света флуоресценции. Из этих двух интенсивностей флуоресценции автоматически рассчитывали степень поляризации [12].

**Синтез трейсеров.** К раствору 4 мг (20 мкмоль) 2,4-D в 1 мл DMF добавляли 4 мг (40 мкмоль) N-гидроксисукцинимид и 16 мг (80 мкмоль) 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида. Реакционную смесь перемешивали в темноте 2 ч при 20° С и добавляли 5 мг (10 мкмоль) этилендиаминфлуоресцеинтиокарбамата [13]. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 20° С и затем отгоняли в вакууме органический растворитель. Остаток растворяли в 0,5 мл метанола и хроматографировали на пластинках Silufol в системе этилацетат — метанол — уксусная кислота в отношении 60 : 15 : 1 (по объему). Собирали с пластинки основную желтую полосу с  $R_f$  0,6 и экстрагировали трейсер (1) в 2 мл метанола. 100 мкл полученного раствора трейсера разбавляли 3 мл 0,01 М карбонатного буфера (рН 9,6) и спектрофотометрически определяли концентрацию трейсера при длине волны 492 нм по молекулярному коэффициенту поглощения флуоресцина  $8,78 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [13]. Раствор разбавляли до концентрации 10 нМ боратным буфером и использовали в анализе. Синтез трейсеров (2) и (3) проводили аналогично из бутилендиаминфлуоресцеинтиокарбамата и гексилдиаминфлуоресцеинтиокарбамата соответственно.

**Получение конъюгата 2,4-D с гемоцианином моллюсков (KLN).** К раствору 80 мг (0,4 ммоль) 2,4-D в 1 мл DMF добавляли 90 мг (0,8 ммоль) N-гидроксисукцинимид и 160 мг (0,8 ммоль) 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида. Реакционную смесь инкубировали 2 ч при 20° С, добавляли по каплям при перемешивании к суспензии 53 мг KLN в 2 мл 0,01 М карбонатного буфера (рН 9,6) и оставляли на ночь при 4° С. Затем полученный конъюгат 2,4-D с гемоцианином моллюсков диализовали в течение 2 дней в проточной водопроводной воде и лиофильно высушивали. Получили 50 мг вещества в виде серого порошка.

**Получение антисыворотки на 2,4-D.** Антитела на 2,4-D получали иммунизацией 3 взрослых кроликов (массой 2,5 кг) конъюгатом 2,4-D с гемоцианином моллюсков, вводя им подкожно в несколько точек вдоль позвоночника и внутримышечно в область микроузлов задних лап по 2 мг конъюгата в расчете на одного кролика. Иммунизацию проводили 50% эмульсией водного раствора конъюгата и полного адьюванта Фрейнда в течение 3 нед с интервалом 7 сут. Реиммунизацию осуществляли ежемесячно в течение 3 дней, вводя внутривенно по 1—1,5 мг конъюгата в 1 мл физиологического раствора. Через 7—9 дней после последней реиммунизации отбирали кровь, отделяли сыворотку и тестировали антисыворотку. В работе использовали лучшую антисыворотку от кролика Дима-6 после 3 мес иммунизации, полученную в НПП «Иммунотех».

**Кривые разведения антисывороток при постоянных концентрациях трейсеров.** В кюветы вносили по 500 мкл буферного раствора, отбирали из первой кюветы 50 мкл раствора и добавляли 50 мкл антисыворотки и 500 мкл буферного раствора. После последовательного 2-кратного разбавления антисыворотки по 500 мкл в каждую кювету вносили 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 аффинности антисыворотки, и рассчитывали титр антисыворотки при 50% связывании трейсера.

Константы аффинности рассчитывали путем построения графиков Скэтчерда в координатах:  $y = [B/F]$ ,  $x = [B]$ , где  $B$  и  $F$  — связанная и свободная формы антигена. При определении отношения свободной и связанной форм антигена использовалась предлагаемая в работе [14] формулу:

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

где  $P_i$  — измеренная величина поляризации,  $P_{\max}$ ,  $P_{\min}$  — величина поляризации при максимальном и минимальном связывании антигена и антитела.

Для расчета концентрации связанной формы антигена  $B$  использовали уравнение материального баланса:

$$B + F = T \text{ или } F = T - B,$$

где  $T$  — общая концентрация антигена и трейсера. Если обозначить

$$B/F = X, \text{ то } B/(T - B) = X \text{ или} \\ B = X \cdot T / (X + 1).$$

*Калибровочные кривые для определения 2,4-D.* К 50 мкл стандарта (или образца) добавляли 500 мкл раствора трейсера и 500 мкл антисыворотки в разведении, дающем 60—80% связывания трейсера. Реакционную смесь инкубировали 3—5 мин при 20° С и измеряли поляризацию флуоресценции. Строили в полулогарифмических координатах калибровочные графики и рассчитывали константы связывания антител при конкурентном взаимодействии меченого и немеченого антигена.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Еремин С. А., Морева И. Ю., Дзантшев Б. Б., Егоров А. М., Франек М. // *Вопр. мед. химии.* 1991. Т. 37. № 6. С. 93—95.
2. Лунская И. М., Еремин С. А., Егоров А. М., Колар В., Франек М. // *Агрохимия.* 1993. № 2.
3. Еремин С. А. // *Журн. Всес. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева.* 1989. Т. 34. № 1. С. 46—51.
4. Бекбергенов Б. М., Житников В. Г. // *Антибиотики и химиотерапия.* 1988. Т. 33. № 1. С. 72—76.
5. Eremın S. A., Schiavetta D. E., Lotey H., Smith D. S., Landon J. // *Ther. Drug. Monit.* 1988. V. 10.
6. Chard T. // *An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques,* North-Holland, Amsterdam, 1978.
7. Wie S. I., Hammock B. D. // *J. Agric. Food Chem.* 1984. V. 32. P. 1294—1301.
8. Qing Xiao Li, Meng Shu Zhao e. a. // *J. Agric. Food Chem.* 1991. V. 39. P. 1685—1692.
9. Schneider P., Hammock B. // *J. Agric. Food Chem.* 1992. V. 40. P. 525—530.
10. Colbard D. L., Eremın S. A., Landon J. // *J. Immunol. Methods.* 1991. V. 140. P. 227—233.
11. Rodbard D. // *J. Anal. Biochem.* 1978. V. 90. P. 1—12.
12. Popelka S. R., Miller D. M., Holen J. T., Kelso D. M. // *Clin. Chem.* 1981. V. 27. P. 1198—1201.
13. Pourfarzaneh M., White G. W., Landon J., Smith D. S. // *Clin. Chem.* 1980. V. 26. P. 730—733.
14. Dandliker W. B., Schapiro H. C. e. a. // *Immunochemistry.* 1964. V. 1. P. 165—191.

Поступила в редакцию 11.XII.1992  
После доработки 23.III.1993

S. A. Eremın, I. M. Lunskaya, A. M. Egorov

### THE INFLUENCE STRUCTURE OF LABELLED ANTIGEN ON SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF POLARISATION FLUOROIMMUNOASSAY OF 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID (2,4-D)

M. V. Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry

Effect of the length of linker  $((\text{CH}_2)_n, n = 2, 4 \text{ or } 6)$  between antigen and fluorescent label on specificity of antibody to 2,4-D and detection limit of 2,4-D by the polarisation fluoroimmunoassay was studied. Maximum antibody binding was observed in case of the labelled antigen with the longest linker ( $n = 6$ ), slowly decreasing as the linker shortened, whereas specificity of antibody, upon linker's shortening, increased (detection limit was 4,8  $\mu\text{g/ml}$  at  $n = 6$  but 0,5  $\mu\text{g/ml}$  at  $n = 2$ ). The shortest linker ( $n = 2$ ) is to be used for working out high specificity PFIA to 2,4-D, the longer linkers ( $n = 4, 6$ ) being preferable for the aryloxyalkylcarboxylic acids assay.