



УДК 615.214:57.083.3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОБАРБИТАЛА МЕТОДАМИ ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА. ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОЙ СТРАТЕГИИ

© 1995 г. Н. П. Данилова[#], Н. И. Бекман, Н. Г. Подымова, А. Л. Максимова*,
Е. В. Железнова*, Р. Г. Васильев

Институт биотехнологии, 117246, Москва, Научный пр., 8;

*Московский НИИ психиатрии, Москва

Поступила в редакцию 18.10.94 г.

Сравниваются характеристики двух вариантов твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) фенобарбитала, основанных на принципе прямого и непрямого ИФА. Оба метода разработаны на основе одних и тех же моноклональных антител, в качестве метки в обоих случаях применялась пероксидаза хрена. При использовании в качестве твердой фазы планшетов для микротитрования предпочтение следует отдать методу, основанному на принципе непрямого ИФА, в котором происходит конкуренция фенобарбитала из пробы и фенобарбитала, сорбированного на планшетах в виде конъюгата с белком, за связывание с антифенобарбиталовыми антителами, мечеными пероксидазой. В непрямом ИФА объем пробы 5 мкл, длительность анализа 40 мин, коэффициент вариации <8%.

Ключевые слова: иммуноанализ, фенобарбитал.

Фенобарбитал – одно из основных средств для лечения эпилепсии. Эффективность его применения значительно возрастает при индивидуальном подборе дозы на основе контроля за концентрацией препарата в крови. Для измерения концентрации фенобарбитала чаще всего используют иммуноаналитические методы [1, 2].

В настоящее время в иммуноанализе наметилась тенденция замены поликлональных антител моноклональными. Это объясняется очевидными преимуществами моноклональных антител (высокая специфичность, аффинность и гомогенность), за счет чего достигается улучшение характеристик анализа. Мы получили мышиную гибридную линию 1A9, продуцирующую высокоаффинные и специфичные антифенобарбитальные антитела [3]. На основе этих антител был разработан метод иммуноанализа фенобарбитала, базирующийся на принципе поляризации флуоресценции [4], и твердофазный иммуноферментный метод, основанный на принципе прямого ИФА [5], в котором на твердой фазе сорбировали антитела, а фенобарбитал метили пероксидазой.

Иммунометрические методы анализа, использующие меченые антитела, меньше разработаны для гаптенных. Это объясняется тем, что с поликло-

нальными антителами из-за их гетерогенности не-прямой ИФА дает менее стабильные результаты, чем прямой ИФА. При переходе на моноклональные гомогенные антитела появляется возможность более широкого использования принципа непрямого ИФА для анализа гаптенных, так как он имеет ряд потенциальных преимуществ: возможность широкого варьирования формы калибровочной кривой путем изменения строения конъюгата гаптена с белком, достижение более высокой чувствительности. Последнее объясняется тем, что если при сорбции антитела теряют до 90% активности [6], то при мечении пероксидазой их активность падает незначительно, к тому же они лучше сохраняются в растворе, чем сорбированными на пластик.

Поэтому целью данной работы было изучение возможности использования полученных нами моноклональных антител для разработки твердофазного иммунометрического метода анализа фенобарбитала и сравнение его параметров с характеристиками метода, основанного на прямым ИФА.

Разработан твердофазный иммуноферментный метод для анализа фенобарбитала, основанный на конкуренции между фенобарбиталом из пробы и фенобарбиталом, сорбированным на 96-луночные полистироловые планшеты в виде конъюгата BSA, за связывание с антителами, мечеными пероксидазой.

Сокращения: BSA – бычий сывороточный альбумин, PB-BSA – конъюгат фенобарбитала с BSA, ИФА – иммуноферментный анализ, ЗФР – забуференный физиологический раствор (0.15 М NaCl, 0.01 М фосфат натрия, pH 7.4).

[#] Автор для переписки.

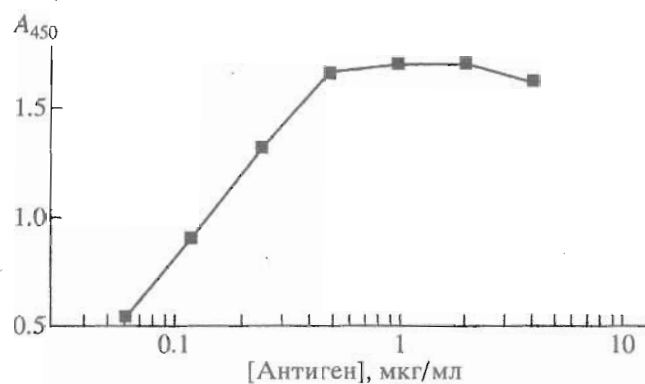


Рис. 1. Зависимость связывания антител с антигеном РВ-BSA от концентрации антигена, используемой при сорбции на планшеты.

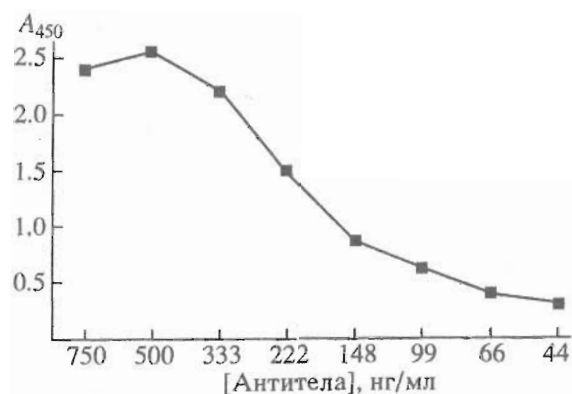


Рис. 2. Зависимость связывания антител, меченных пероксидазой, с сорбированным антигеном от концентрации антител.

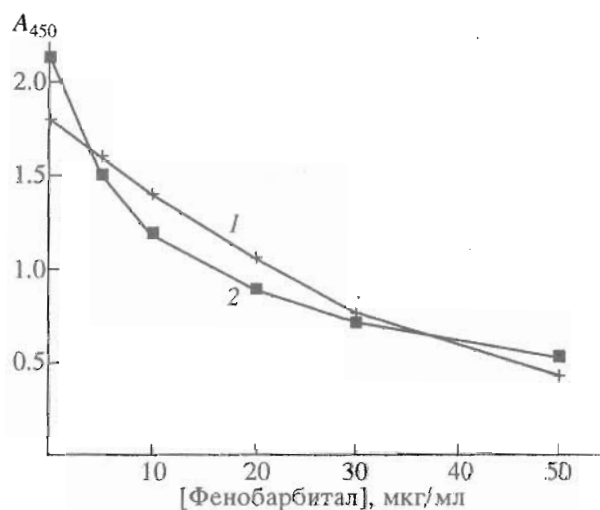


Рис. 3. Калибровочные кривые для определения фенобарбитала методами прямого (1) и непрямого (2) твердофазного ИФА.

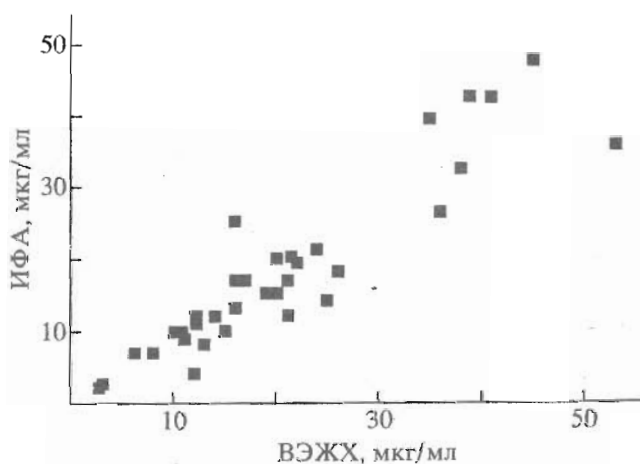


Рис. 4. Сравнение результатов определения фенобарбитала методом ИФА (ось ординат) и методом ВЭЖХ (ось абсцисс).

Для получения конъюгата фенобарбитала с BSA использовали *m*-аминофенобарбитал и глутаровый альдегид в качестве сшивающего агента. Конъюгат сорбировали на полистироловые 96-луночные планшеты в концентрации 0.5 мкг/мл, минимально необходимой для насыщения твердой фазы (рис. 1).

Антитела из асцитов выделяли ионообменной хроматографией и метили пероксидазой хрена по модифицированному методу Nakane [7]. В качестве рабочего разведения конъюгата применяли разведение, соответствующее 50% связыванию антител с антигеном, сорбированным на твердой фазе (рис. 2).

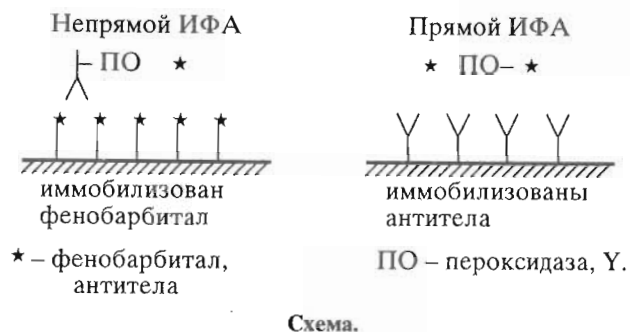
Иммуноанализ проводили в одну стадию (см. "Экспер. часть"). Концентрацию фенобарбитала в пробе определяли из калибровочной кривой, которая построена на основании значений поглощения, полученных для стандартных растворов фенобарбитала (рис. 3).

Коэффициент вариальности результатов анализа, определенный из анализа 30 проб в четырех повторах 10 раз, составлял <8% для всего диапазона измеряемых концентраций.

Результаты анализа хорошо коррелируют с данными, полученными ВЭЖХ (r 0.96) (рис. 4).

Было проведено сравнение параметров этого метода с твердофазным методом определения фенобарбитала, основанным на прямом ИФА, который был разработан и описан нами ранее [5]. В методе использовались полистироловые планшеты, сенсibilизированные моноклональными антителами, и фенобарбитал, меченный пероксидазой хрена.

Оба метода позволяют получить калибровочные кривые, линейные во всем диапазоне терапевтических концентраций фенобарбитала (10 - 40 мкг/мл) и с углом наклона, близким к 45° (рис. 3).



Минимально определяемая концентрация в обоих методах одинакова и составляет 2 мкг/мл, но чувствительность в непрямом твердофазном ИФА выше, так как размер пробы в этом методе меньше в 4 раза по сравнению с прямым вариантом (соответственно 5 и 20 мкл).

Очевидно, что на характеристики анализа влияют его кинетические параметры. Мы сравнили кинетику связывания меченых антител с иммобилизованным фенобарбиталом в непрямом ИФА с кинетикой связывания конъюгата фенобарбитал-пероксидаза с иммобилизованными антителами "в прямом" варианте анализа. В случае непрямой ИФА состояние равновесия достигается за 50 - 60 мин, в то время как в "прямом" варианте этот процесс занимает более 24 ч (рис. 5).

При проведении анализа важно учитывать ошибку, которая может возникать из-за разной скорости внесения проб или прибавления реагентов. В связи с этим при сравнении двух методов бросается в глаза специфика использования полистироловых планшетов в качестве твердой фазы. Как ясно из схемы, в случае прямого ИФА проба, содержащая свободный препарат, должна вноситься в лунку, где уже сорбированы антитела. При этом препарат сразу начинает взаимодействовать с антителами, а поскольку время между внесением пробы и последующим добавлением

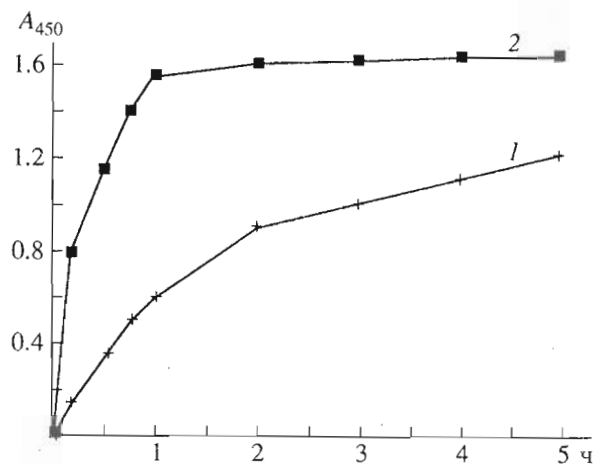


Рис. 5. Кинетика иммунохимической реакции в прямом (1) и непрямом (2) твердофазном ИФА.

фенобарбитала, меченного ферментом, будет разным для разных лунок, это приведет к возникновению ошибки. Для ее уменьшения необходимо очень быстрое внесение проб или проведение реакции не на всем планшете, а только на его участке — например, на одном стрипе. Этот недостаток присущ только планшетам; если же в методе в качестве твердой фазы используются, например, полистироловые шарики с антителами, то ошибка не возникает, так как пробу вносят в пустую пробирку, смешивают с меченым лигандом и только затем добавляют твердую фазу с антителами.

В случае прямого ИФА на планшете иммобилизован конъюгат фенобарбитала с белком, при добавлении пробы никакой реакции не происходит, и, следовательно, скорость внесения проб не влияет на результаты анализа, что обеспечивает преимущество этому варианту анализа.

Таким образом, сравнение двух вариантов твердофазного ИФА на полистироловых планшетах с использованием одних и тех же моноклональных антител и одной и той же ферментной метки позволяет сделать вывод о предпочтительности варианта прямого ИФА.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали BSA, пероксидазу из хрена, фенобарбитал, твин-20, глутаровый альдегид, боргидрид натрия (Sigma, США); тетраметилбензидин (H-Roche, Швейцария); 96-луночные полистироловые планшеты (Nunc, Дания); DEAE-Toyorearl 650M (Toyo Soda MFG, Япония).

Сыворотки предоставлены клиникой экзогенно-органических психических нарушений и эпилепсии Московского НИИ психиатрии (руководитель — проф. Э.Л. Максимова).

Конъюгат фенобарбитала с BSA (12 моль РВ/моль BSA) синтезировали по описанному методу [3].

Для сорбции на полистироловые планшеты готовили двойные разведения конъюгата РВ-BSA в 0.05 М карбонат-бикарбонатном буфере (рН 9.6) в концентрации 8 - 0.0625 мкг/мл и инкубировали с твердой фазой в течение 2 ч при 20°C и 18 ч при 4°C, планшеты отмывали водой и инкубировали 30 мин с 0.1% раствором BSA, промывали и высушивали.

Гибридную линию 1А9, продуцирующую моноклональные антитела к фенобарбиталу, культивировали в виде асцитных опухолей в мышцах, асцитную жидкость отбирали и отделяли от клеток. К 1 мл асцита добавляли 1 мл насыщенного раствора сульфата аммония и после 30 мин инкубации при 4°C осадок отделяли центрифугированием. Осадок растворяли в 0.5 мл воды и диализовали против 1 мМ фосфатного

буфера, рН 8.0. Затем раствор антител наносили на колонку с DEAE-целлюлозой, уравновешенной тем же буфером, и градиентно элюировали хлористым натрием (0 - 0.5 М). Антитела диализовали против ЗФР и хранили с добавлением 0.01% азида натрия при 4°C.

Конъюгат антител с пероксидазой. К 0.1 мл водного раствора 1 мг пероксидазы добавляли 1 мг периодата натрия в 25 мкл воды. Смесь инкубировали 20 мин в темноте при 20°C, пропускали через 0.5-см слой сефадекса G-25 и смешивали с 4 мг антител (концентрация определялась спектрофотометрически по $E_{0.1\%}^{280} = 1.4$) в 0.1 М карбонат-бикарбонатном буфере, рН 9.6. Через 3 ч добавляли 0.1 мг боргидрида натрия, инкубировали 1 ч и диализовали конъюгат против воды. Конъюгат хранили в ЗФР в концентрации 2 мг/мл с добавлением 0.1% фенола и 20 мг/мл BSA.

Стандартные растворы фенобарбитала в сыворотке. Пул из 5 донорских сывороток (100 мл) пропускали через колонку (1 × 5 см) с активированным углем. Фенобарбитал растворяли в метаноле в концентрации 1 мг/мл и готовили из этого раствора стандартные растворы в сыворотке с концентрациями 0; 5; 10; 20; 30 и 50 мкг/мл. Стандартные сыворотки разливали по 217 мкл во флаконы и лиофильно высушивали. Перед использованием стандарты растворяли в 200 мкл дистиллированной воды.

Определение фенобарбитала методом ИФА. В лунки планшета с сорбированным конъюгатом вносили по 5 мкл пробы или стандартной сыворотки с известным содержанием фенобарбитала.

Конъюгат антител с пероксидазой разводили в соотношении 1 : 10000 в ЗФР с добавлением 0.2% BSA и 0.05% твина-20 и затем многоканальной пипеткой разливали в лунки планшета по 100 мкл в лунку. После 30 мин инкубации раствор антител удаляли, твердую фазу промывали водой и в каждую лунку добавляли по 100 мкл субстратного раствора, содержащего тетраметилбензидин и перекись водорода в натрий-цитратном буфере, рН 5. Через 10 мин реакцию останавливали добавлением в планшеты по 100 мкл 5% серной кислоты и измеряли поглощение при 450 нм.

Определение фенобарбитала в сыворотке крови методом ВЭЖХ проводилось в лаборатории фармакокинетики Института биотехнологии (зав. лабораторией – проф. А.А. Фирсов).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Klein G., Collinsworth W., Courbe A., Diez O. // Wien. Klin. Wochenschr. Suppl. 1992. V. 191. P. 43 - 47.
2. Nielsen I.M., Gram L., Dam M. // Epilepsia. 1992. V. 33(3). P. 558 - 563.
3. Данилова Н.П., Дзгоев А.Б., Бекман Н.И., Василлов Р.Г. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. P. 950 - 954.
4. Дзгоев А.Б., Еремин С.А., Данилова Н.П., Егоров А.М., Василлов Р.Г. // Вопр. мед. химии. 1991. Т. 3. P. 85 - 86.
5. Дзгоев А.Б., Еремин С.А., Данилова Н.П., Егоров А.М., Василлов Р.Г., Карпов М.В. // Клиническая лабораторная диагностика. 1992. Т. 11. P. 13 - 16.
6. Butler J.E. // J. Immunol. Methods. 1992. V. 150 (1 - 2). P. 77 - 90.
7. Tijssen P. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Amsterdam; New York; Oxford: Elsevier, 1985. P. 221 - 241.

Determination of Phenobarbital by the Methods of Solid Phase Enzyme Immunoassay: The Selection of an Optimal Strategy

N. P. Danilova*,¹ N. I. Bekman*, N. G. Podymova*, A. L. Maksutova**, E. V. Zheleznova**, and R. G. Vasilov*

* Institute of Biotechnology, Nauchnyi pr. 8, Moscow, 117246 Russia

** Moscow Research Institute of Psychiatry, Moscow, Russia

Abstract – Two variants (direct and indirect) of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) of phenobarbital are compared. Both techniques were developed on the basis of the same monoclonal antibodies, and horse radish peroxidase was used as the label in both cases. When microtitration plates are used as the solid phase, indirect ELISA, in which phenobarbital of the sample competes with phenobarbital sorbed on plates in the form of a conjugate with protein for the binding with peroxidase-labeled antiphenobarbital antibodies, is preferable. In indirect ELISA, the sample volume was 5 µl, the time of assay was 40 min, the variability coefficient was <8%.

Key words: immunoassay, phenobarbital.

¹ To whom correspondence should be addressed.