



УДК 547.873:57.083.3+541.182

ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЙ ФЛУОРОИММУНОАНАЛИЗ ПРОПАЗИНА В ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛАХ АЭРОЗОЛЯ ОТ В ОКТАНЕ

© 1996 г. Е. Г. Матвеева[#], Ж. В. Самсонова*, С. А. Еремин*

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 117071, Москва, Ленинский просп., 33;

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

Поступила в редакцию 19.01.96 г. После доработки 20.06.96 г.

Методом поляризационного флуоресцентного анализа исследовано взаимодействие между меченым флуоресцентным пропазином и антителами к нему в системе обращенных мицелл АОТ в *n*-октане. Изучено влияние степени гидратации мицелл W_0 ($W_0 = [H_2O]/[ПАВ]$), определяющей их размер, и концентрации поверхностно-активного вещества на связывание антигена с антителами. Оптимальными для связывания являются высокая степень гидратации обращенных мицелл (W_0 15–30) и небольшая концентрация поверхностно-активного вещества (менее 50 мМ). Эффективность связывания зависит от строения меченого флуоресцентом гаптена, в частности от длины мостика, связывающего флуоресцеин с пропазином. Показана возможность проведения поляризационного флуороиммуноанализа пропазина в системе обращенных мицелл в неполярном органическом растворителе (октане) с пределом обнаружения около 100 нМ (20 мкг/л), что на порядок выше, чем при анализе в водной среде. Преимуществом предлагаемого поляризационного флуороиммуноанализа в среде обращенных мицелл для низкорастворимых в воде гаптенных является возможность определения анализируемого вещества непосредственно в органических вытяжках (например, растворов в хлороформе).

Ключевые слова: поляризационный флуороиммуноанализ, обращенные мицеллы, пропазин.

В последнее время все более актуальной становится проблема анализа в экстрактах из продуктов питания, почвы и других объектов плохо растворимых или практических нерастворимых в воде соединений. Использование для этой цели методов экспресс-иммуноанализа ограничено из-за инактивации антител в неводных средах (при проведении анализа в неводной среде) и низкой растворимости гаптена (при проведении анализа в водной среде). Подготовка проб в случае плохо растворимых в воде гаптенных, в частности пестицидов триазиновой группы, включает в себя предварительную экстракцию анализируемого вещества из образца (глища, вода, почва и т.п.) органическим растворителем (ацетонитрилом [1], этилацетатом [2] или хлороформом [3]) с последующим упариванием растворителя и солиubilизацией образца в водном буферном растворе. Такая пробоподготовка образца довольно трудоемка и приводит к ухудшению точности определения.

Один из возможных путей решения этих проблем – использование систем обращенных мицелл поверхностно-активных веществ (ПАВ) в органических растворителях. Гидратированные

обращенные мицеллы ПАВ представляют собой микрокапельки воды (или водных растворов биологически активных веществ), окруженные слоем ПАВ и диспергированные в неполярном органическом растворителе. Таким образом, в целом система бифильна, т.е. содержит как гидрофильные, так и гидрофобные компоненты. Известно, что белки, в том числе антитела [4–8], солибулизированные в такой системе, сохраняют свою биологическую активность. В то же время гидрофобность окружающей среды позволяет использовать в исследованиях как полярные (водорастворимые), так и неполярные (органорастворимые) реагенты, в частности гидрофильные и гидрофобные антигены. Варьирование физико-химических характеристик обращенных мицелл позволяет плавно и целенаправленно изменять природу окружения взаимодействующих антитела и антигена, а также образующегося между ними иммунокомплекса [5–8].

Возможность проведения гомогенного иммуноферментного анализа в системе обращенных мицелл была продемонстрирована ранее на примере анализа тироксина [5] и кортизола [6]. Были проведены также исследования взаимодействия мицелина человека с моноклональными антителами против него в обращенных мицеллах АОТ в изооктане методом поляризационного флуороиммуноанализа (ПФИА) [7]. Однако полученные

Сокращения: АОТ – Аэрозоль ОТ, натриевая соль ди-(2-этил)гексилового эфира сульфоянтарной кислоты; ПАВ – поверхностно-активное вещество; ПФИА – поляризационный флуороиммуноанализ; ФП – меченый флуоресцентом пропазин; ФА – меченый флуоресцентом атразин.

[#] Автор для переписки.

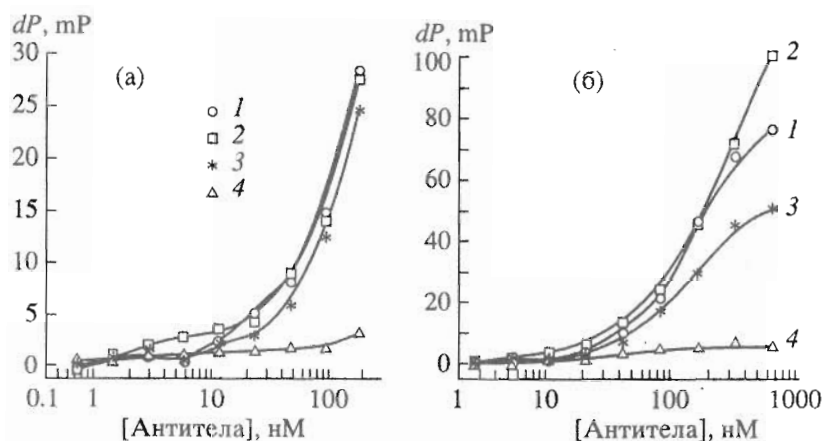
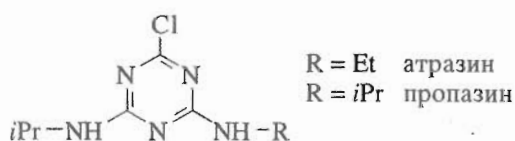


Рис. 1. Зависимость изменения поляризации флуоресценции при связывании антител с мечеными производными пропазина в мицеллярной ([АОТ] 0.1 M, W_0 16.7) (а) и водной среде (б): 1 – ФП-2 (аналогично для ФП-3 в обеих средах и для ФП-2м в мицеллярной среде); 2 – ФА-Х2 (аналогично для ФП-2м в водной среде); 3 – ФП-52; 4 – ФП-4 (аналогично для ФП-6 в мицеллярной среде); в водной среде для ФП-6 величина dP равна нулю во всем интервале концентраций антител.

результаты не были использованы для разработки метода анализа антигена.

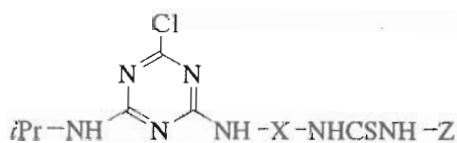
Настоящая работа посвящена исследованию методом ПФИА взаимодействия антиген–антитело в системе обращенных мицелл АОТ в *n*-октане в зависимости от основных характеристик системы обращенных мицелл, а также от структуры меченного флуоресцеином гаптена. В качестве модельного малорастворимого в воде гаптена был выбран пропазин – пестицид класса симм-1,3,5-триазинов, отличающийся от основного представителя этого класса – атразина – заместителем при аминогруппе R:



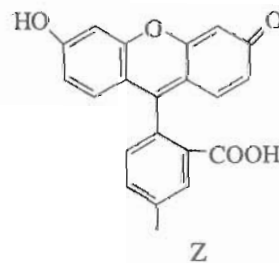
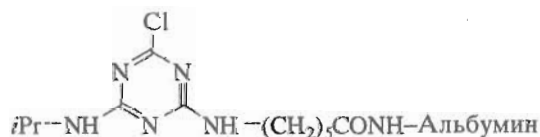
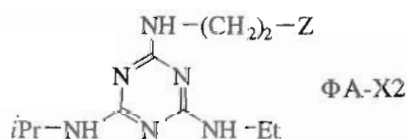
Принципы ПФИА и методики анализа триазинов методом ПФИА в воде подробно описаны в обзорах [9–11]. Метод ПФИА основан на конкуренции между определяемым антигеном и антигеном, меченым флуоресцеином, за ограниченное количество центров связывания антител. Степень

связывания антител с антигеном контролируется по изменению значения поляризации флуоресценции реакционной смеси. Чем больше определяемого антигена в пробе, тем большее количество меченого антигена находится в несвязанном состоянии и тем ниже значение поляризации флуоресценции. Значения поляризации флуоресценции измеряют в относительных единицах mP (миллипи), для которых нет определения в русском варианте системы СИ.

Влияние структуры меченого флуоресцеином пропазина (ФП) на поляризацию флуоресценции при связывании ФП с антителами в системе обращенных мицелл АОТ–октан было исследовано для двух типов соединений. Так называемые гомологичные соединения ФП представляют собой пропазин, связанный с флуоресцеином мостиками -X- различной длины, в которых место связывания гаптена с флуоресцеином то же, что и у гаптена с белком-носителем при получении иммуногена. Также изучен гетерологичный иммуногену конъюгат (ФА–Х2) аналога пропазина – атразина с производным флуоресцеина, полученный замещением в гаптене по атому хлора.



X	Шифр ФП
$-(CH_2)_2-$	ФП-2
$-CH_2CH(CH_3)-$	ФП-2м
$-(CH_2)_3-$	ФП-3
$-(CH_2)_4-$	ФП-4
$-(CH_2)_6-$	ФП-6
$-(CH_2)_5CONH(CH_2)_2-$	ФП-52



Типичная кривая титрования антител получена следующим образом: раствор антител в системе обращенных мицелл АОТ-*n*-октан-вода последовательно разбавляли раствором обращенных мицелл той же степени гидратации, после чего ко всем образцам добавляли мицеллярный раствор конъюгата ФП (степень гидратации та же). При уменьшении концентрации антител мы наблюдали уменьшение поляризации флуоресценции (рис. 1), причем уровень поляризации флуоресценции ФП в отсутствие антител в обращенных мицеллах (60–120 мР, в зависимости от степени гидратации мицелл) был заметно выше, чем в водном растворе (27–30 мР), что объясняется гидрофобным окружением несвязанного ФП в мицеллярной среде.

Показано, что все исследованные конъюгаты ФП связываются с антителами в системе обращенных мицелл и в соответствии с типом кривой титрования антител могут быть разделены на две группы (см. рис. 1а):

гомологичные конъюгаты ФП-2, ФП-2м, ФП-3 и гетерологичный конъюгат ФА-Х2 эффективно связываются с антителами (кривые 1–3), что проявляется в значительном изменении поляризации флуоресценции системы с ростом концентрации антител (максимальное изменение поляризации флуоресценции – 25–30 мР);

гомологичные конъюгаты ФП-4 и ФП-6 (кривая 4) слабо взаимодействуют с антителами и вызывают незначительное изменение поляризации флуоресценции (менее 5 мР).

Таким образом, мы обнаружили, что эффективность связывания антител с ФП в обращенных мицеллах АОТ/октан зависит от структуры ФП, в частности от длины мостика, связывающего флуоресцеиновую метку и гаптен.

Аналогичные различия в связывании антител с теми же конъюгатами мы наблюдали и в водной среде (рис. 1б), где все конъюгаты можно подразделить в зависимости от эффективности связывания на следующие три группы: 1) ФА-Х2, ФП-2, ФП-2м, ФП-3 (сильное связывание); 2) ФП-52 (среднее связывание); 3) ФП-4, ФП-6 (слабое связывание).

Мы видим, что в целом полученная картина для водной и мицеллярной систем совпадает, однако для конъюгата ФП-52, который по химической структуре мостика наиболее отличается от других конъюгатов и проявляет в водной среде среднюю степень связывания, в среде обращенных мицелл отмечено значительное изменение поляризации флуоресценции при связывании с антителами.

С целью более наглядного сравнения эффективности связывания различных конъюгатов с антителами мы определили (из кривых титрования антител) для каждого ФП величину увеличе-

ния поляризации флуоресценции (dP) конъюгата при связывании с антителами. Суммарные данные по влиянию структуры ФП на эффективность связывания (величину dP при концентрации антител 200 нМ) в среде обращенных мицелл АОТ-*n*-октан и в водной среде представлены в таблице.

Таким образом, для исследований взаимодействия антиген-антитело в среде обращенных мицелл по изменению поляризации флуоресценции наилучшими являются конъюгаты ФП-2, ФП-2м, ФП-3 и ФА-Х2. Эффективность связывания для двух конъюгатов с длинным соединительным мостиком, ФП-4 и ФП-6, низка в обеих изученных системах, поэтому эти конъюгаты в дальнейшем не исследовались.

Для изучения влияния степени гидратации мицелл на эффективность связывания конъюгатов с антителами мы выбрали конъюгаты ФП-52, ФА-Х2, ФП-2 и ФП-2м, наиболее эффективно изменяющие величину поляризации флуоресценции при связывании. Степень гидратации обращенных мицелл W_0 ($W_0 = [\text{вода}]/[\text{ПАВ}]$) изменяли тремя способами:

последовательным разбавлением мицеллярного раствора антител раствором “пустых” обращенных мицелл без антител с той же степенью гидратации W_0 ;

добавлением разного количества водного буферного раствора к мицеллярному раствору, содержащему одинаковое количество антител и конъюгата;

добавлением разного количества водного раствора антител к мицеллярному раствору, содержащему одинаковое количество конъюгата.

Во всех случаях измеряли величину поляризации флуоресценции мицеллярного раствора образца до и после добавления избытка свободного антигена (пропазина). В качестве характеристики специфического связывания рассматривали разность значений поляризации флуоресценции (dP).

Влияние структуры конъюгата на изменение поляризации флуоресценции при связывании с антителами

Конъюгат	Изменение поляризации флуоресценции, мР	
	в обращенных мицеллах*	в воде
ФП-2	28	51
ФП-2м	29.5	55
ФП-3	26	52
ФП-52	25	33
ФП-Х2	27.5	54
ФП-4	3	5
ФП-6	6.5	-1

* 0.1 М АОТ, W_0 16.7.

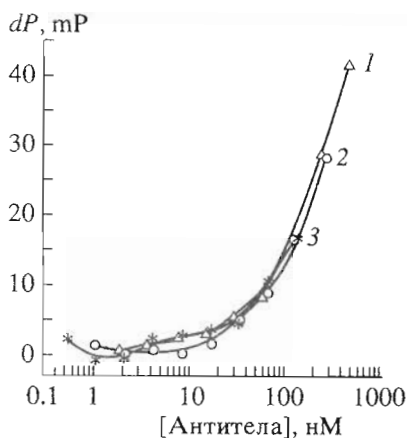


Рис. 2. Кривые титрования антител конъюгатом ФП-52 при степени гидратации обращенных мицелл W_0 38.9 (1), 22.2 (2), 11.1 (3); [АОТ] 0.1 М.

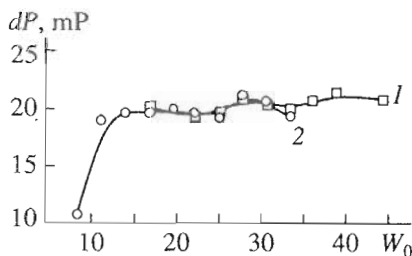


Рис. 3. Зависимость изменения поляризации флуоресценции при связывании антител с конъюгатами ФП-2 (1) и ФП-2м (2) от степени гидратации обращенных мицелл.

Кривые титрования антител, полученные по первому способу (конъюгат ФП-52) для трех различных степеней гидратации ($W_0 = 11.1$; 22.2 и 38.9), практически совпадают (рис. 2). Варьирова-

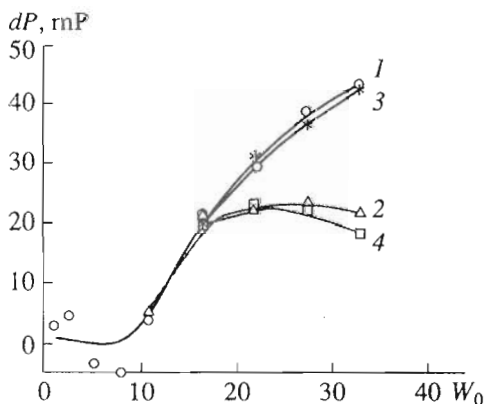


Рис. 4. Зависимость изменения поляризации флуоресценции при связывании антител с конъюгатами ФА-Х2 (1, 2) и с ФП-52 (3, 4) от степени гидратации обращенных мицелл: 1, 3 – варьируемая концентрация антител, 2, 4 – в пересчете на концентрацию антител 400 нМ.

ние степени гидратации в соответствии со вторым способом было проведено для двух конъюгатов – ФП-2м и ФП-2. Степень гидратации варьировали от 6 до 34. Показано, что в области высоких W_0 (от 12 до 34) величина dP практически постоянна, а при W_0 ниже 10–12 происходит заметное уменьшение dP (рис. 3). Варьирование степени гидратации по третьему способу было проведено для конъюгатов ФП-2 и ФА-Х2 (рис. 4). В этом случае концентрация антител увеличивается с ростом степени гидратации. Величина dP также растет с увеличением W_0 (кривые 1 и 3, рис. 4). Однако, если мы пересчитаем изменение поляризации флуоресценции на единицу концентрации антител (кривые 2 и 4, рис. 4), полученная зависимость dP от W_0 окажется аналогичной картине, показанной для второго способа в области высоких степеней гидратации: величина dP не зависит от W_0 в диапазоне значений 15–40, а в области низких W_0 (7–13) происходит уменьшение dP .

Уменьшение изменения поляризации флуоресценции dP при низких значениях W_0 может быть объяснено, по-видимому, тем фактом, что размеры обращенных мицелл с уменьшением W_0 также уменьшаются и становятся меньше размеров антитела. Таким образом, низкогидратированные мицеллы не способны защитить молекулу антитела от влияния органической среды, что приводит к инактивации антитела и соответственно к уменьшению его связывания с антигеном.

Изучено влияние концентрации АОТ на эффективность связывания ФП-52 с антителами при фиксированной степени гидратации мицелл (W_0 38). Показано, что эффективность связывания увеличивается (одно и то же значение dP достигается при меньших концентрациях антител) при уменьшении концентрации ПАВ (рис. 5).

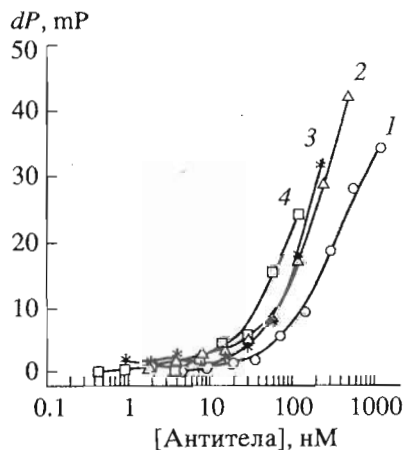


Рис. 5. Кривые титрования антител конъюгатом ФП-52 в системе обращенных мицелл АОТ-*n*-октан-вода при концентрациях АОТ 0.29 (1), 0.1 (2), 0.05 (3), 0.025 М (4) (W_0 38).

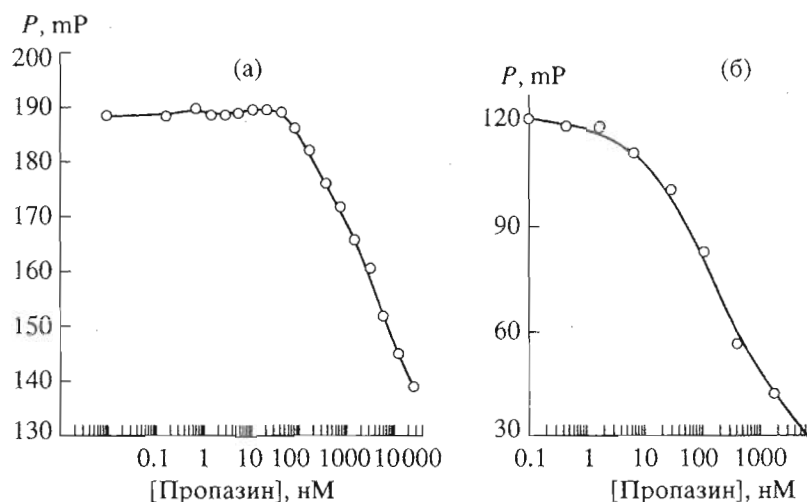


Рис. 6. Калибровочная кривая ПФИА пропазина в обращенных мицеллах АОТ-*n*-октан (а) и в водном растворе (б). Условия эксперимента: [антитела] 370 (а) и 490 нМ (б), время инкубации смеси антител с ФП-52 и свободным пропазином 30 (а) и 40 мин (б); [АОТ] 0.1 М, W_0 16 (а).

На основе полученных данных был разработан ПФИА пропазина в обращенных мицеллах АОТ-октан с использованием конъюгата ФП-52. Методика проведения ПФИА в обращенных мицеллах была аналогична методике, обычно используемой для водных растворов (см. "Экспериментальную часть").

Калибровочные кривые ПФИА пропазина в обращенных мицеллах АОТ-октан представлены на рис. 6а. Предел обнаружения пропазина составляет около 100 нМ (20 мкг/л). Для сравнения мы получили калибровочные кривые ПФИА пропазина в водной среде с использованием тех же препаратов антител и конъюгата, что и для среды обращенных мицелл (рис. 6б). Предел обнаружения пропазина в водной среде на порядок лучше – около 10 нМ (2 мкг/л). Следует отметить, что в системе обращенных мицелл чувствительность метода несколько меньше из-за уменьшения разницы между предельными значениями поляризации (влияние мицеллярной среды на величину поляризации флуоресценции несвязанного меченого антигена). Однако минимально определяемая в обращенных мицеллах концентрация пропазина все же достаточно низка, а преимуществом использования среды обращенных мицелл для ПФИА плохо растворимых в воде гаптенных является существенное упрощение подготовки проб (возможность использования для анализа непосредственно органических вытяжек гаптенных, например в виде растворов в хлороформе).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы отечественного ("Реахим", марки ос.ч. и ч.) и импортного (Sigma, США) производства. Поверхностно-ак-

тивное вещество АОТ (Serva, США) дополнительной очистке не подвергали.

Этилендиаминфлуоресцеинтиокарбамат получали по методу, описанному ранее [12], с некоторыми модификациями. К раствору 1.5 ммоль дигидрохлорида этилендиамина в 50 мл метанола, содержащего 0.5 мл триэтиламина, добавляли по каплям при перемешивании в течение 30 мин раствор 300 мкмоль флуоресцеинизотиоцианата в 10 мл такого же растворителя. Реакционную смесь перемешивали 1 ч. Выпавший ярко-красный осадок продукта отфильтровывали на воронке Бюхнера и промывали 10 мл метанола. Полученное соединение сушили в вакууме (выход 85%). Флуоресцеинтиокарбамилпроизводные других диаминов $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ ($n = 2-6$) были синтезированы аналогично.

Синтез конъюгатов. ФА-Х2 был предоставлен компанией "Abion" (Германия).

ФП-52. К раствору 10 мкмоль 4-хлор-6-(изопропиламино)-1,3,5-триазин-2-(6-аминокапроновой кислоты), полученной как описано ранее [13], в 200 мкл диметилформамида добавляли 20 мкмоль *N*-гидроксисукцинимид и 20 мкмоль дициклогексилкарбодиимид. Реакционную смесь встряхивали в течение 2 ч при комнатной температуре и отфильтровывали от осадка. К супернатанту добавляли 50 мкмоль этилендиаминфлуоресцеинтиокарбамата. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при комнатной температуре и полученный конъюгат очищали методом тонкослойной хроматографии (пластинки фирмы Silufol, элюент – хлороформ-метанол, 4 : 1). Собирали с пластинки основную желтую полосу и полученный конъюгат экстрагировали в 2 мл метанола.

Остальные конъюгаты ФП с мостиками различной длины синтезировали конденсацией 2,4-дихлор-6-изопропиламино-1,3,5-триазина, полученного как описано в [13], с флуоресцеинтиокарбамилпроизводными диаминов $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ ($n = 2-6$). К раствору 20 мкмоль 2,4-дихлор-6-изопропиламино-1,3,5-триазина в 500 мкл диметилформамида добавляли 10 мкмоль флуоресцеинтиокарбамилпроизводного диамина, 10 мкл триэтиламина и следовые количества (0.5–1 мкл) пиридина. Реакционную смесь встряхивали в течение 2 ч при комнатной температуре и оставляли на ночь при 4°C. Растворитель отгоняли в вакууме, остаток растворяли в 500 мкл метанола и хроматографировали как описано для синтеза ФП-52.

Поликлональные антитела, специфичные к пропазину и атразину, были получены иммунизацией кроликов конъюгатом 4-хлор-6-(изопропиламино)-1,3,5-триазин-2-(6-аминокапроновой кислоты) с бычьим сывороточным альбумином как описано в [14].

Приготовление мицеллярных растворов. Водный раствор антител (1.3×10^{-5} М) добавляли к раствору АОТ в *n*-октане (0.025–0.29 М) и смесь энергично встряхивали. Через 5–10 с образовывалась оптически прозрачная система. Контрольные мицеллярные растворы готовили аналогичным образом с использованием водного буферного раствора (в том числе содержащего неспецифические антитела). Все образцы антител вводили в раствор обращенных мицелл в виде раствора в буфере 50 мМ трис (рН 8.8). Этот же буферный раствор использовали для приготовления контрольных мицеллярных растворов (не содержащих антител) и для экспериментов сравнения в водном растворе – в качестве водной среды.

Титрование антител. Раствор антител последовательно разбавляли водным буфером или мицеллярным раствором, после чего ко всем образцам добавляли раствор конъюгата. Связывание антител с антигеном контролировали по увеличению значения поляризации флуоресценции реакционной смеси. Измерения проводили на поляризационном ТДх-анализаторе (Abbott, США) в режиме "Photo Check" в стеклянных кюветках. Концентрацию конъюгата подбирали экспериментально таким образом, чтобы получить интенсивность флуоресценции смеси 3000 усл. ед. (примерно 10 нМ), что соответствует максимальной точности поляризационных измерений. По результатам измерений строили графическую зависимость поляризации флуоресценции (mP) от концентрации антител (логарифмическая шкала).

Проведение ПФИА. В стеклянную кюветку к 10–50 мкл анализируемой пробы или стандартного раствора, содержащего пропазин (в этаноле – для водных систем и в хлороформе – для систем обращенных мицелл), добавляли по 500 мкл рас-

творов ФП и антител, встряхивали и проводили измерение поляризации флуоресценции. Время измерения для 10 образцов составляло около 7 мин. На основании результатов измерения строили калибровочный график – зависимость поляризации флуоресценции (mP) от концентрации пропазина (логарифмическая шкала; концентрация при измерении, после разбавления пробы). Предел обнаружения пропазина определяли по методу "3s" [15] (концентрация пропазина, соответствующая по калибровочному графику изменению поляризации, равному утроенной величине среднего квадратичного отклонения поляризации от нулевого стандарта s).

Авторы выражают признательность фирме "Abion" (Германия) за предоставление поликлональной антисыворотки к симм-триазинам и конъюгата ФА-Х2. Работа частично финансирована грантами Международной ассоциации содействия сотрудничеству с учеными независимых государств бывшего Советского Союза (INTAS, грант № 93-2223) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 95-03-08039а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bushway R.J., Perkins B., Savage S.A., Lekousi S.J., Ferguson B.S.* // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1989. V. 42. P. 899–904.
2. *Lucas A.D., Schneider P., Harrison R.O., Biggar J.W., Rolston D.E., Seiber J.N., Hammock B.D.* // Food Agric. Immunol. 1991. V. 3. P. 155–167.
3. *Lucas A.D., Jones A.D., Goodrow M.H., Saiz S.G., Blewett C., Seiber J.N., Hammock B.D.* // Chem. Res. Toxicol. 1983. V. 6. P. 107–116.
4. *Еремин А.Н., Савенкова М.И., Метелица Д.И.* // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. С. 606–612.
5. *Kabanov A.V., Khrutskaya M.M., Eremin S.A., Klyachko N.L., Levashov A.V.* // Anal. Biochem. 1989. V. 181. P. 145–148.
6. *Еремин А.Н., Метелица Д.И.* // Докл. АН БССР. 1989. Т. 33. С. 932–935.
7. *Groome N.P., Vacher M., Nicot Cl., Waks M.* // Biochem. Int. 1990. V. 21. P. 1–7.
8. *Еремин А.Н., Карасева Е.И., Метелица Д.И.* // Докл. АН Беларуси. 1991. Т. 35. С. 549–552.
9. *Еремин С.А., Самсонова Ж.В., Егоров А.М.* // Успехи химии. 1994. Т. 63. С. 638–649.
10. *Eremin S.A.* // Immunoanalysis of Agrochemicals, Emerging Technologies / Eds J.O. Nelson, A.E. Karu, R.B. Wong. ACS Symposium Series 586. Washington, 1995. P. 223.
11. *Уильямз А.Т.Р.* // Новые методы иммуноанализа / Ред. У.П. Коллинз. М.: Мир, 1991. С. 138.
12. *Fourfarzaneh M., White G.W., Landon J., Smith D.S.* // Clin. Chem. 1980. V. 26. P. 730–733.
13. *Goodrow M.H., Harrison R.O., Hammock B.D.* // J. Agric. Food Chem. 1990. V. 38. P. 990–996.
14. *Matveeva E.G., Melik-Nubarov N.S., Miethel P., Levashov A.V.* // Anal. Biochem. 1996. V. 234. P. 13–18.
15. *Rodbard D.* // Anal. Biochem. 1978. V. 90. P. 1–12.

Polarization Fluoroimmunoassay of Propazine in Reversed Micelles of Aerosol OT in *n*-Octane

E. G. Matveeva*, Zh. V. Samsonova**, and S. A. Eremin**

*Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 117071 Russia

**Moscow State University, Chemistry Faculty, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

Abstract—The interaction between fluorescein-labeled propazine and antibodies against this hapten was studied in the reversed micelles of Aerosol OT in *n*-octane by a polarization fluoroassay. The effect of the hydration degree of micelles W_0 ($W_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{Surf}]$), which determines their size and surfactant concentration, on the binding of the antigen with antibodies was studied. A high hydration degree of the reversed micelles ($W_0 = 15\text{--}30$) and low concentration of the surfactant (less than 50 mM) are optimal for binding. The binding efficacy depends upon the structure of the fluorescein-labeled hapten, particularly upon the length of the bridge binding fluorescein with propazine. It was shown that the polarization fluoroimmunoassay of propazine may be carried out in a reversed micellar system in nonpolar organic solvent (octane) with a detection limit of about 100 nM (20 $\mu\text{g/l}$). This is an order of magnitude higher than that achievable upon analysis in aqueous medium. The proposed polarization fluoroimmunoassay in a reversed micellar system makes it possible to detect haptens that are poorly soluble in water directly in organic extracts, e.g., in chloroform solutions.

Key words: polarization fluoroimmunoassay, reversed micelles, propazine.