



УДК 57.083.3:632.954

ПРОСТЫЕ ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕСТИЦИДОВ НА ОСНОВЕ БИОТИН-СТРЕПТАВИДИНОВОЙ СИСТЕМЫ

© 1997 г. И. С. Павлова[#], И. А. Любавина, А. В. Жердев*, А. А. ЗинченкоИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

* Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

Поступила в редакцию 06.02.97 г. Принята к печати 23.05.97 г.

Разработан метод получения высокоактивного конъюгата стрептавидин–пероксидаза, использование которого позволяет повысить чувствительность биоаналитических методов в 4 раза. С использованием полученного конъюгата разработан метод количественного определения симазина в 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (конкурентный ИФА) и неинструментальный экспресс-метод для совместного определения этих пестицидов (иммунофльтрационный дот-анализ). Чувствительность определения – 3–4 и 2 нг/мл пестицида для ИФА и иммунофльтрации соответственно при продолжительности анализов 1.5 ч и 5 мин. Преимуществами предложенного экспресс-метода являются доступность и простота, обеспечивающие возможность проведения анализа во внелабораторных условиях.

Ключевые слова: симазин, 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, стрептавидин–пероксидаза, иммунофльтрация, конкурентный ИФА.

Загрязнение окружающей среды вследствие хозяйственной деятельности человека стало одной из серьезных экологических проблем современности. Важным аспектом этой проблемы является повсеместное применение пестицидов в практике сельского хозяйства. Химические методы защиты и растений – наиболее радикальный способ борьбы с вредителями, сорняками и болезнями растений, однако нерациональное их применение может приводить к накоплению пестицидов в объектах окружающей среды. Именно поэтому необходимо иметь простые аналитические методы, позволяющие быстро и точно определять остаточные количества пестицидов в воде, почве, воздухе и продуктах питания.

Традиционно для решения этой задачи применяют физико-химические методы анализа – газовую, газожидкостную и высокочувствительную жидкостную хроматографию [1]. В последнее

время для определения пестицидов разработан ряд иммунологических методов, таких, как радиоиммуноанализ, иммуноферментный анализ и поляризационный флюороиммуноанализ [1–4]. Эти методы незаменимы, когда необходимо строго идентифицировать искомое вещество, однако они имеют ряд существенных недостатков. К ним следует отнести трудоемкость, сложность, длительность анализа, а также необходимость использования дорогостоящего оборудования и привлечения высококвалифицированного персонала.

Данное исследование посвящено разработке простых методов определения 2-хлор-4,6-ди(Ν-этиламино)-1,3,5-триазина (далее: симазин) и 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (далее 2,4-D), типичных представителей двух широко применяемых классов пестицидов – симм-триазинов и арилоксиалкилкарбоновых кислот [1].

Для решения этой задачи выбран метод конкурентного иммуноферментного анализа. В качестве биоспецифических реагентов были использованы биотинилированные поликлональные антитела против симазина, биотинилированные моноклональные антитела против 2,4-D и высокоактивный конъюгат стрептавидин–пероксидаза. Определение пестицидов основано на конкуренции между пестицидом, иммобилизованным на поверхности твердой фазы, и свободным пестицидом, содержащимся в образце, за центры связывания биотинилированных антител,

Сокращения: Sm – симазин; 2,4-D – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; 2-CPA и 4-CPA – 2- и 4-хлорфеноксиуксусная кислота; OVA – овалбумин; Sm-OVA и 2,4-D-OVA – поливалентные конъюгаты овалбумина с симазинем и 2,4-D; STR – стрептавидин; HRP – пероксидаза хрена; Vi-IgG – биотинилированные иммуноглобулины; PBS – фосфатно-солевой раствор, pH 7.4; PBST – PBS, содержащий 0.05% Tween 20; PBS(T)/OVA – PBS(T), содержащий овалбумин (2 мг/мл).

[#]Автор для переписки.

которые определяют с помощью конъюгата стрептавидин–пероксидаза. Использование биотин–стрептавидиновой пары продиктовано необходимостью создания универсальной системы детекции и максимального повышения чувствительности анализа.

В последнее время биотин–стрептавидиновая система, а ранее биотин–авидиновая, все более широко используется в медико–биологических исследованиях [5]. Исключительно высокое сродство и уникальная специфичность взаимодействия биотина (витамин Н) с белком авидином или его бактериальным аналогом стрептавидином ($K_D 10^{-15}$ М) обеспечивают значительное повышение чувствительности биоаналитических методов с применением этой системы. Широкому распространению биотин–стрептавидиновой системы способствовала также легкость введения биотина в различные молекулы (белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды и др.), практически не сопровождающаяся изменениями биологической и иммунологической активности. Нейтральная изоэлектрическая точка и отсутствие в молекуле стрептавидина углеводных остатков обеспечивают большую специфичность анализа по сравнению с авидином ($pI 10,5$) и значительно более широкое распространение стрептавидина как для иммунодетекции различных биологически активных соединений (белки, нуклеиновые кислоты, вирусы и низкомолекулярные соединения), так и в практической медицине для диагностики различных инфекционных заболеваний (СПИД, гепатит, стрептококковые инфекции), определения токсинов (афлотоксин) и гормонов (тесты на беременность и овуляцию, соматотропный и тиреотропный гормоны) [6].

С целью дальнейшего повышения чувствительности биоаналитических методов на основе биотин–стрептавидиновой системы нами был разработан простой подход для получения высокоактивных конъюгатов стрептавидин–пероксидаза. Широко используемый метод получения пероксидазных конъюгатов, предложенный впервые Накане и Каваои [7] и усовершенствованный Тиссенем и Курстак [8], заключается в окислении периодатом натрия углеводных компонентов фермента до альдегидных групп, которые затем ковалентно реагируют с первичными аминогруппами белка (антитела, стрептавидин) с образованием оснований Шиффа. Непрореагировавшие компоненты затем отделяют гель-фильтрацией. Повышение активности конъюгата в предложенном нами методе достигается путем предварительной олигомеризации молекул фермента. Для этого окисленную форму пероксидазы подвергли дополнительному аминированию с помощью этилендиамина, после чего проводили олигомеризацию окисленной и аминированной форм пер-

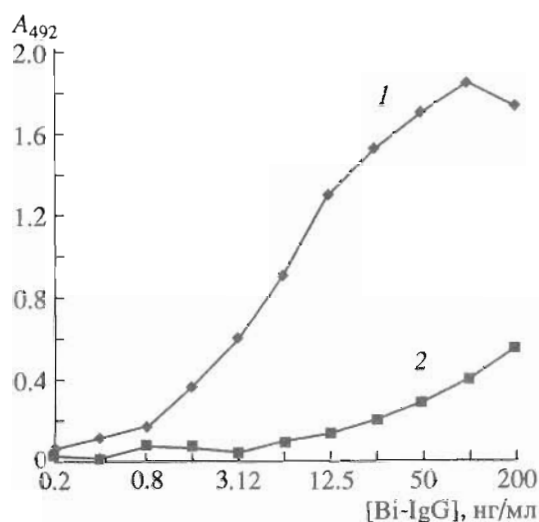


Рис. 1. Сравнение активности предложенного (1) и стандартного (2) конъюгатов STR–HRP методом сэндвич–ИФА при определении биотинилированных иммуноглобулинов.

оксидазы. Стрептавидин конъюгировали с олигомерной формой пероксидазы. В ходе экспериментов были выбраны оптимальные условия синтеза: соотношение окисленной и аминированной формы пероксидазы – 3 : 1, олигомерной пероксидазы и стрептавидина – 4 : 1 (по массе). Конъюгат использовали без дальнейшего фракционирования.

Активность стрептавидин–пероксидазных конъюгатов, полученных по разработанной и стандартной методикам, сравнивали с помощью метода сэндвич–ИФА при определении биотинилированных иммуноглобулинов (рис. 1). Как следует из результатов определения, активность конъюгата STR–HRP, полученного по предлагаемому методу, возрастает более чем на порядок. Возрастание активности обусловлено в первую очередь увеличением числа молекул пероксидазы, связанных с одной молекулой стрептавидина. Это подтверждают данные молекулярно–массового распределения конъюгатов. Молекулярную массу пероксидазных конъюгатов определяли с помощью ВЭЖХ. Как следует из хроматограмм, приведенных на рис. 2, молекулярная масса конъюгатов, полученных с помощью разработанного метода, составляет 600–900 кДа, тогда как конъюгат, полученный по стандартному методу, имел молекулярную массу около 100 кДа [8]. Мольное соотношение пероксидаза–стрептавидин, вычисленное на основании величин A_{280} (общий белок) и A_{403} (пероксидаза), для олигомерного конъюгата варьировало от 5 : 1 до 6 : 1, в то время как для стандартного конъюгата это соотношение было близким к 1 : 1.

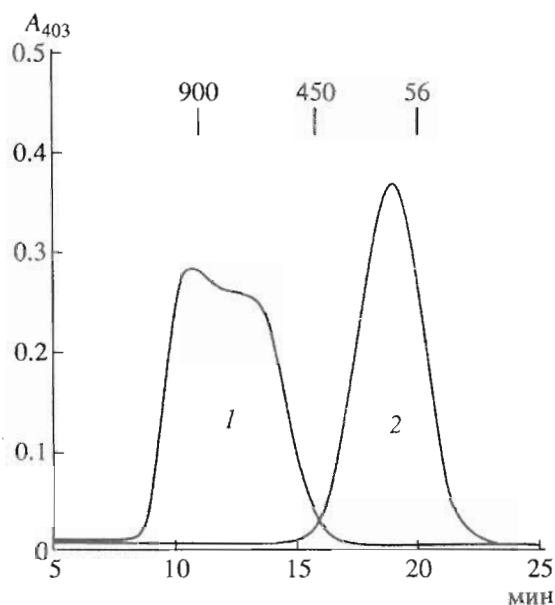


Рис. 2. Определение молекулярной массы предложенного (1) и стандартного (2) конъюгатов STR-HRP. Указаны положения белков-стандартов и их молекулярные массы (в кДа).

Полученный высокоактивный конъюгат STR-HRP был использован для количественного определения симазина и 2,4-D методом конкурентного иммуноферментного анализа в планшете. На первом этапе были определены условия проведения анализа, обеспечивающие оптимальное соотношение сигнал/фон. Оптимальные концентрации реагентов составили (мкг/мл): поливалентный антиген (конъюгат овальбумина с 5–10 молекулами пестицида) – 1, биотинилированные антитела – 1 (для симазина) и 4 (для 2,4-D) и STR-HRP – 1. Применение высокоактивного конъюгата STR-HRP позволило увеличить область линейности и повысить чувствительность определения и симазина, и 2,4-D в 4 раза (рис. 3). Чувствительность анализа составила 3 (симазин) – 4 (2,4-D) нг/мл. Разработанный нами метод по длительности и чувствительности не уступает другим известным ИФА для определения этих пестицидов [9–15], при этом в нашей работе была использована схема с мечением антител, а не более широко распространенный подход с мечением антигена. Предложенная нами схема анализа обладает определенными преимуществами по сравнению с уже известными. Она является универсальной для различных пестицидов и других низкомолекулярных соединений и позволяет не синтезировать для каждого нового антигена его конъюгат с пероксидазой, что упрощает оптимизацию параметров анализа.

Для быстрого полуколичественного определения пестицидов был выбран метод иммуофилт-

рационного дот-анализа. По сравнению с традиционным дот-анализом (время в зависимости от выбранной схемы – 1–2 ч) режим иммуофилтрации позволяет сократить процедуру анализа до 5 мин без существенного снижения чувствительности [6, 16]. Для проведения анализа поливалентный антиген иммобилизовали на нитроцеллюлозной мембране, которую затем помещали в специальную микрофилтрационную ячейку. Сквозь мембрану последовательно пропускали образец, содержащий биотинилированные антитела (поликлональные – для симазина или моноклональные – для 2,4-D), STR-HRP и субстрат. При отсутствии пестицида в пробе на поверхности мембраны в области нанесения антигена образовывалось ярко-синее пятно. Присутствие пестицида в пробе приводит к конкуренции свободного и иммобилизованного на полимерном носителе пестицида за центры связывания антител и соответственно к ингибированию реакции (окрашенное пятно не образуется).

На рис. 4 представлены типичные данные по определению симазина и 2,4-D методом иммуофилтрационного дот-анализа. При оптимизации параметров, обеспечивающих максимальную чувствительность анализа, оказалось, что чувствительность и характер ингибирования реакции (ответ по типу “+/-” (пятно либо есть, либо нет) или по типу “+/-” (яркое пятно, бледное пятно, пятна нет)) зависят от соотношения концентраций поливалентного антигена и биоспецифических антител. Для иммобилизации использовали поливалентный антиген в концентрации 1 мг/мл. При меньших концентрациях снижалась яркость пятна, а при больших одновременно с увеличением яркости пятна ухудшалась чувствительность анализа. При концентрациях антител меньше или равной 5 (для симазина) или 10 мкг/мл (для 2,4-D) реакция проходила по типу “+/-”, однако уменьшение концентрации приводило к снижению яркости пятна. Увеличение концентрации антител снижало чувствительность анализа и одновременно изменяло характер ингибирования реакции (по типу “+/-”). Так, для концентрации анти-2,4-D-антител 40 мкг/мл была получена следующая зависимость: окрашивания не наблюдалось при концентрации 2,4-D, равной или выше 16 нг/мл; при концентрации 8 нг/мл образовывалось бледно-голубое пятно, а при меньших концентрациях – ярко-синее. Появление промежуточного слабоокрашенного пятна затрудняло интерпретацию результатов анализа, поэтому для дальнейшей работы были выбраны следующие концентрации (мг/мл): поливалентного антигена – 1, биотинилированных антител – 5 (для симазина) или 10 (для 2,4-D), STR-HRP – 2.

В указанных условиях ингибирование реакции проходило по типу “+/-”, причем переход соответствовал концентрациям симазина и 2,4-D, равным

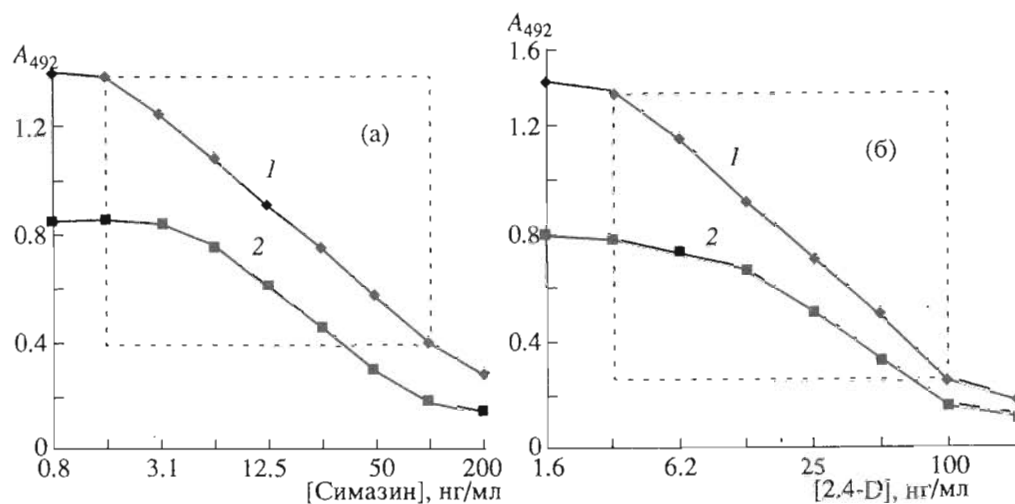


Рис. 3. Зависимость оптического поглощения от концентрации свободного симазина (а) или 2,4-D (б) в конкурентном ИФА с использованием предложенного (1) и стандартного (2) конъюгатов STR-HRP. Рамки ограничивают область линейности.

2 нг/мл. Дополнительная предынкубация антител с тестируемым образцом в течение 5 и 15 мин непосредственно перед стадией фильтрации не влияла на чувствительность анализа. В иммунофильтрационном дот-анализе (как и в планшетном формате анализа) использование высокоактивного конъюгата STR-HRP позволило повысить чувствительность определения пестицидов в 4 раза (табл. 1).

Практический интерес представляет дальнейшее развитие предложенного метода экспресс-анализа для совместного определения нескольких пестицидов одновременно. Эта цель достигается при иммобилизации на мембране нескольких разных антигенов и использовании набора соответствующих антител. Для совместного определения двух пестицидов (симазин и 2,4-D) на мембрану наносили два поливалентных антигена (Sm-OVA и 2,4-D-OVA), а затем проводили анализ по ранее описанной схеме с использованием указанных выше концентраций реагентов. Анализируемый образец смешивали с раствором, содержащим как антисимазин, так и анти-2,4-D-антитела. Чувствительность определения симазина в присутствии 2,4-D и 2,4-D в присутствии симазина не изменилась и составила 2 нг/мл соответственно (рис. 5).

Для определения специфичности разработанных методов были исследованы перекрестные реакции между симазином, 2,4-D и некоторыми соединениями, структурно родственными 2,4-D. Данные табл. 2 позволяют сделать вывод о высокой специфичности предложенных методов.

Таким образом, предложенный в работе метод конъюгирования стрептавидина и пероксидазы позволяет получать высокоактивные конъюга-

ты, использование которых повышает чувствительность биоаналитических методов. Разработанные на основе высокоактивного конъюгата STR-HRP методы количественного и полуколичественного экспресс-определения симазина и 2,4-D характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью. Они могут быть использованы в качестве прототипной схемы при разработке биоаналитических методов определения других низкомолекулярных соединений (пестициды, наркотики, витамины и др.). По сравнению с

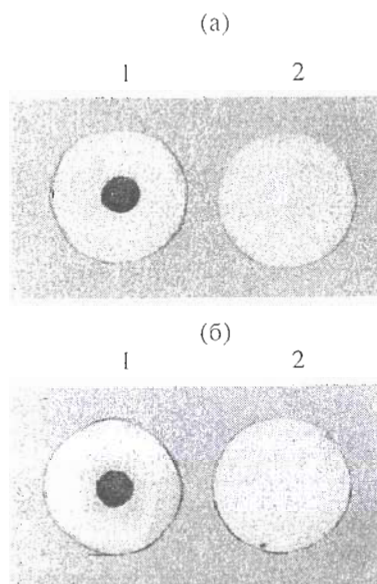


Рис. 4. Определение симазина (а) и 2,4-D (б) методом иммунофильтрации. 1 и 2 – концентрации пестицидов в нг/мл.

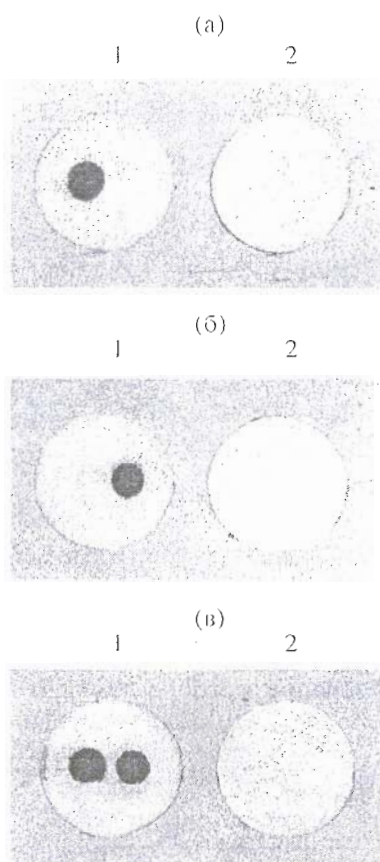


Рис. 5. Совместное определение пестицидов методом иммунофилтрации. Определение симазина в присутствии 1 мкг/мл 2,4-D (а), определение 2,4-D в присутствии 1 мкг/мл симазина (б), параллельное определение симазина и 2,4-D (в). 1 и 2 – концентрации пестицидов в нг/мл.

широко применяемыми в настоящее время хроматографическими методами определения пестицидов разработанные нами методы отличаются существенной простотой, не требуют применения дорогостоящего оборудования и специально обученного персонала, обеспечивают возможность проведения анализа во внелабораторных условиях и представляют несомненный практический интерес при экспресс-мониторинге симазина и 2,4-D в воде, почве, воздухе и продуктах питания.

Таблица 1. Определение пестицидов методом иммунофилтрации

Соединение	Предел обнаружения, нг/мл	
	STR-HRP	
	стандартный	предложенный
Симазин	8	2
2,4-D	8	2

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы симазин (Serva, ФРГ), 2,4-D, 2-CPA и 4-CPA (Sigma, США). Получение биоспецифических реагентов для определения симазина и 2,4-D подробно описано ранее: поливалентные конъюгаты – Sm-OVA – в работе [9] и 2,4-D-OVA – [10], моноклональные антитела против 2,4-D – [13], поликлональные кроличьи антитела против симазина – [15].

Получение конъюгата стрептавидин–пероксидаза

Метод 1 (олигомерный конъюгат). 40 мг пероксидазы хрена (Центр “Агротехника”, Львов, щелочная изоформа, $R_z = A_{403}/A_{280} = 3.0$) растворяли в 2 мл воды, добавляли 200 мкл 0.25 М NaIO₄ и инкубировали при комнатной температуре 20 мин в темноте. К раствору добавляли 1/3 объема сухого сефадекса G-15 fine [8] и перемешивали 10 мин в темноте при комнатной температуре. Полученную суспензию центрифугировали 5 мин со скоростью 4000 об/мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость отбирали, а осадок сефадекса G-15 fine промывали 0.5 мл воды и вновь центрифугировали. Надосадочные жидкости объединяли и диализовали против 0.1 М боратного буфера (pH 9.4) 2 ч при 4°C. Для аминирования пероксидазы к 1 мл окисленной пероксидазы (концентрация примерно 10 мг/мл) добавляли этилендиамин до концентрации 25 мМ и аскорбат натрия до концентрации 2.5 мМ, инкубировали 2 ч при комнатной температуре и диализовали ночь против 0.1 М боратного буфера, pH 9.4, при 4°C. Спектрофотометрически определяли концентрации аминированной и окисленной пероксидазы, смешивали в соотношении 3 : 1, 1 : 1 и 1 : 3 по массе и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. Добавляли стрептавидин, отдиализованный против 0.1 М боратного буфера, pH 9.4, в соотношении пероксидаза – стрептавидин 2 : 1–10 : 1 по массе и инкубировали 3 ч при комнатной температуре в темноте. Затем добавляли аскорбат натрия до концентрации 2.5 мМ, инкубировали 2 ч при комнатной температуре и диализовали против PBS ночь при 4°C. Конъюгат использовали без дальнейшего фракционирования.

Метод 2 (стандартный конъюгат). Стандартный конъюгат стрептавидин–пероксидаза получали по методу [8]. Для этого пероксидазу окисляли как в методе 1 и диализовали против воды в течение ночи при 4°C. pH раствора доводили до 9.4 бикарбонатным буфером (1 М), добавляли стрептавидин, предварительно отдиализованный против 0.1 М бикарбонатного буфера, pH 9.4, и инкубировали 3 ч при комнатной температуре в темноте. Соотношение пероксидаза–стрептавидин составляло 1 : 1 по массе. Добавляли 0.1 объ-

ема свежеприготовленного раствора боргидрида натрия (4.0 мг/мл в 10 мМ NaOH), инкубировали 2 ч при 4°C и диализовали ночь против PBS при 4°C.

Биотинилирование антител. Раствор антител (2.0–3.0 мг/мл) диализовали против 0.1 М бикарбонатного буфера, pH 8.6, добавляли 0.1 объема свежеприготовленного раствора N-оксисукцинимидного эфира N-биотинил-6-аминогексановой кислоты (Sigma, США) (1.0 мг/мл в DMSO), инкубировали 2 ч при комнатной температуре и диализовали против PBS в течение ночи при 4°C.

Определение молекулярной массы пероксидазных конъюгатов с помощью ВЭЖХ. 10 мкг конъюгата в объеме 2–20 мкл наносили на колонку Ultrarac TSK G4000SW (LKB, Швеция) и элюировали 40 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7.2, содержащим 0.2 М хлорид натрия и 10% метанола, со скоростью 0.7 мл/мин, регистрируя поглощение при 403 нм.

Определение активности конъюгатов STR-HRP методом сэндвич-ИФА. Планшеты DynaTech MicroELISA (DynaTech, ФРГ) сенсбилизировали стрептавидином (100 мкл на лунку; 5.0 мкг/мл в 0.1 М NaHCO₃, pH 9.4, ночь, 4°C), трижды промывали PBST и блокировали PBST/OVA 1 ч при 37°C. Далее готовили серию двукратных разведений биотинилированных иммуноглобулинов в диапазоне 200–0.2 нг/мл в PBST/OVA и инкубировали 30 мин при 37°C. Планшеты 5 раз промывали PBST и инкубировали с конъюгатами STR-HRP (0.25–2.0 мкг/мл в PBST/OVA) в том же режиме. Для определения связавшегося конъюгата в каждую лунку добавляли 100 мкл 50 мМ фосфат-цитратного буфера, pH 5.0, содержащего 0.02% H₂O₂ и 0.4 мг/мл орто-фенилендиамина (Serva, ФРГ), инкубировали 5–10 мин в темноте и останавливали ферментативную реакцию добавлением 50 мкл 1.7 н. H₂SO₄. Измеряли поглощение при 492 нм на многоканальном спектрофотометре Multiscan (Titertek). Каждый анализ проводили трижды.

Определение пестицидов методом конкурентного ИФА. В лунки планшеты DynaTech MicroELISA (DynaTech, ФРГ) последовательно вносили 100 мкл Sm-OVA или 2,4-D-OVA (1–2 мкг/мл в 0.1 М NaHCO₃, pH 9.4) и инкубировали ночь при 4°C. Планшеты трижды промывали PBST и блокировали PBST/OVA 1 ч при 37°C. Далее готовили серию двукратных разведений симазина, 2,4-D или структурно родственных соединений в PBST/OVA, добавляли биотинилированные антитела (1–10 мкг/мл в PBST/OVA) и инкубировали 30 мин при 37°C. Планшеты 5 раз промывали PBST, добавляли STR-HRP (1.0 мкг/мл в PBST/OVA), инкубировали в том же режиме и промывали 5 раз PBST. Определение связавшейся пероксидазы проводили как описано выше. Каждый анализ проводили трижды.

Таблица 2. Определение симазина, 2,4-D и структурно родственных соединений разработанными методами

Соединение	Предел обнаружения, нг/мл			
	Тест-система на симазин		Тест-система на 2,4-D	
	ИФА	Иммуно-фльтрация	ИФА	Иммуно-фльтрация
Симазин	3	2	–*	–**
2,4-D	–*	–**	4	2
2-CPA	Не определяли		5000	2500
4-CPA	То же		2500	1250

* Фоковые значения.

** Появляется окрашенное пятно.

Определение пестицидов методом иммунофльтрации. На поверхность нитроцеллюлозных фильтров (Schleicher & Schuell, ФРГ) с диаметром пор 0.45 мкм наносили 2 мкл водного раствора Sm-OVA или 2,4-D-OVA (1 мг/мл), высушивали на воздухе и блокировали PBST/OVA 30 мин при комнатной температуре, снова высушивали на воздухе и хранили при 4°C в герметично закрытой упаковке. Срок хранения фильтров – до 1 года. Для проведения анализа фильтры помещали в специальную микрофльтрационную ячейку (V. Tech, США), представляющую собой цилиндрический корпус с находящимся внутри адсорбентом и держателем для мембраны, расположенным в верхней части устройства. Конструкция устройства обеспечивает быструю фильтрацию реагентов через мембрану за счет впитывания жидкости в адсорбент. Через мембрану с нанесенным поливалентным антигеном последовательно пропускали по 250 мкл следующих реагентов: PBST/OVA; образец (анализируемый раствор симазина, 2,4-D или структурно родственных соединений, смешанный с равным объемом PBST/OVA, содержащим 10 (для симазина) и/или 20 мкг/мл (для 2,4-D) биотинилированных антител); STR-HRP (2.0 мкг/мл в PBST/OVA); 50 мМ имидазольный буфер, pH 7.5, содержащий 2.0 мг/мл 1,4-хлорнафтола, 0.2 мг/мл N,N'-диметил-*n*-фенилендиамина, 0.1 мг/мл бисульфата натрия и 0.02% H₂O₂ [17] и PBST. Время фильтрации каждого реагента составляло около 1 мин. При отрицательной реакции в области нанесения антигена появлялось синее пятно, при положительной не появлялось. Каждый анализ проводили трижды.

Авторы выражают глубокую признательность Б.Б. Дзантиеву (Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН) за содействие в проведении экспериментов и полезное обсуждение результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гербициды / Ред. В.А. Захаренко. М.: Агропромиздат, 1990.
2. Нок В. // *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 1993. V. 21. P. 71–83.
3. Кнопп Д. // *Anal. Chim. Acta.* 1995. V. 311. P. 383–392.
4. Marco M.-P., Gee S., Hammock B.D. // *Trends Anal. Chem.* 1995. V. 14. P. 341–350.
5. Green M. // *Meth. Enzymol.* 1990. V. 184. P. 57–67.
6. *Complementary Immunoassays* / Ed. W.P. Collins. N. Y.: Wiley, 1988.
7. Nakane P., Kawaoi A. // *J. Histochem. Cytochem.* 1974. V. 22. P. 1084–1091.
8. Tijssen P., Kurstak E. // *Anal. Biochem.* 1984. V. 136. P. 451–457.
9. Goodrow M.H., Harrison R.O., Hammock B.D. // *J. Agric. Food Chem.* 1990. V. 38. P. 990–996.
10. Еремин С.А., Лунская И.М., Егоров А.М. // *Биоорган. химия.* 1993. Т. 19. С. 836–843.
11. Кнопп Д. // *Occup. Environ. Med.* 1994. V. 51. P. 152–159.
12. Meulenberg E.P., Stoks P.G. // *Anal. Chim. Acta.* 1995. V. 311. P. 407–413.
13. Franek M., Kolar V., Granatova M., Nevorankova Z. // *J. Agric. Food Chem.* 1994. V. 42. P. 1369–1374.
14. Дзантиев Б.Б., Жердев А.В., Морева И.Ю., Романенко О.Г., Сапегова Л. А., Еремин С.А. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 1994. Т. 30. С. 931–939.
15. Дзантиев Б.Б., Жердев А.В., Романенко О.Г., Тутова Н.А., Трубачева Ж.Н., Чередникова Т.В., Еремин С.А. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 1995. Т. 31. С. 134–139.
16. Павлова И.С., Лукин Ю.В., Коваленко В.А., Авдеев Д.Н., Кульшин В.А., Зубов В.П. // *Биоорган. химия.* 1994. Т. 20. С. 731–739.
17. Kobayashi R., Tashima Y. // *Anal. Biochem.* 1989. V. 183. P. 9–13.

Simple Immunoassays of Pesticides Based on the Biotin–Streptavidin System

I. S. Pavlova*, I. A. Lyubavina*, A. V. Zherdev**, and A. A. Zinchenko*

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

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

Abstract—A simple method was developed for the preparation of a highly active streptavidin–peroxidase conjugate that enhances fourfold the sensitivity of bioassays. Using this conjugate, a quantitative assay of simazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (competitive ELISA) and a noninstrumental express method for simultaneous detection of these pesticides (dot-immunofiltration assay) were developed. The detection limit of the pesticides is 3–4 and 2 ng/ml and the duration of the assays is 1.5 h and 5 min for ELISA and dot-immunofiltration, respectively. The express method is easy and straightforward and enables the assay to be performed outside the laboratory.

Key words: *simazine, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, streptavidin–peroxidase conjugate, immunofiltration, competitive ELISA.*