



УДК 577.083.3

НЕИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ НА ОСНОВЕ КОЛЛОИДНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

© 2000 г. И. А. Любавина[#], И. С. Саломатина, А. А. Зинченко, А. В. Жердев*, Б. Б. Дзантиев**Институт 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 12.01.99 г. Принята к печати 29.06.99 г.

Разработаны детектирующие метки на основе водной дисперсии коллоидных текстильных красителей, которые могут применяться в различных аналитических и диагностических тест-системах для визуального способа оценки результатов определения. Окрашенные водонерастворимые частицы красителя использованы для сорбционной иммобилизации стрептавидина на их поверхности. Полученные комплексы стрептавидин-краситель (STR-DYE), обладающие высокой визуализирующей способностью, использованы для совместного определения пестицидов – симазина и 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты с помощью неинструментального иммуноаналитического метода – конкурентного дот-анализа, проводимого по предложенной нами модификации методики, – в формате гребенки. Проведено сравнение чувствительности предложенного метода дот-анализом с использованием ферментного конъюгата стрептавидин-пероксидаза (STR-HRP) и традиционным конкурентным ИФА. Чувствительность определения для обоих пестицидов составила (нг/мл) – 4 (дот-анализ, STR-DYE), 16 (дот-анализ, STR-HRP) и 12–16 (ИФА, STR-HRP) при продолжительности анализов – 20–25 мин (гребенка) и 1.5 ч (ИФА). Простота и доступность разработанного неинструментального метода позволяет обеспечить возможность проведения анализа во внелабораторных условиях.

Ключевые слова: симазин; 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; окрашенные коллоидные красители; дот-иммуноанализ; конкурентный ИФА.

ВВЕДЕНИЕ

Ведущая тенденция современного развития систем аналитического иммуноанализа – переход от методов, основанных на использовании приборов, к неинструментальным методам. Хотя инструментальные методы анализа характеризуются высокой степенью точности, но они трудоемки, сложны, занимают много времени, требуют высококвалифицированного персонала и дорогостоящего оборудования, что ограничивает возможность их применения кругом хорошо оснащенных центров и исследовательских лабораторий. В то же время растет потребность простых в исполне-

нии и доступных для широкого круга специалистов и пользователей методах иммуноанализа, позволяющих проводить определение в малооборудованных лабораториях, полевых и домашних условиях.

Для определения низкомолекулярных соединений, в частности пестицидов, обычно применяют физико-химические методы анализа – газовую, газо-жидкостную и высокоэффективную жидкостную хроматографию [1], а в последнее время – высокочувствительные иммунологические методы, такие как радиоиммуноанализ, иммуноферментный анализ и поляризационный флуороиммуноанализ [2–4]. Повсеместное применение пестицидов привело к их накоплению в объектах окружающей среды, что потребовало разработки простых аналитических методов анализа, позволяющих быстро и точно определять остаточные количества пестицидов в воде, почве, воздухе и продуктах питания.

Цель настоящей работы – создание простого в исполнении и высокочувствительного метода экспресс-определения широко распространенных пестицидов – симазина (2-хлор-4,6-ди(*N*-этиламино)-1,3,5-триазин) и 2,4-D (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота), принципиальная схема кото-

Сокращения: Sm – симазин; 2,4-D – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; OVA – овальбумин; Sm-OVA и 2,4-D-OVA – поливалентные конъюгаты овальбумина с симазиним и 2,4-D; STR – стрептавидин; HRP – пероксидаза хрена; Bi-IgG – биотинилированные иммуноглобулины; STR-HRP – конъюгат стрептавидина с пероксидазой; STR-DYE – комплекс стрептавидина с коллоидным красителем; PBS – фосфатно-солевой раствор, pH 7.4; BB – боратный буфер, pH 7.4; PBST – PBS, содержащий 0.05% Твин-20; PBS/OVA – PBS, содержащий овальбумин (2 мг/мл); PBST/OVA – PBST, содержащий овальбумин (2 мг/мл); BB/OVA – BB, содержащий овальбумин (2 мг/мл); HEPES – *N*-(2-гидроксиэтил)пиперазин-*N'*-2-этансульфоновая кислота, pH 7.4; MOPS – 3-(*N*-морфолино)пропансульфоновая кислота, pH 7.4.

[#] Автор для переписки (e-mail: ALEZIN@IBCH.SIOBC.RAS.RU).

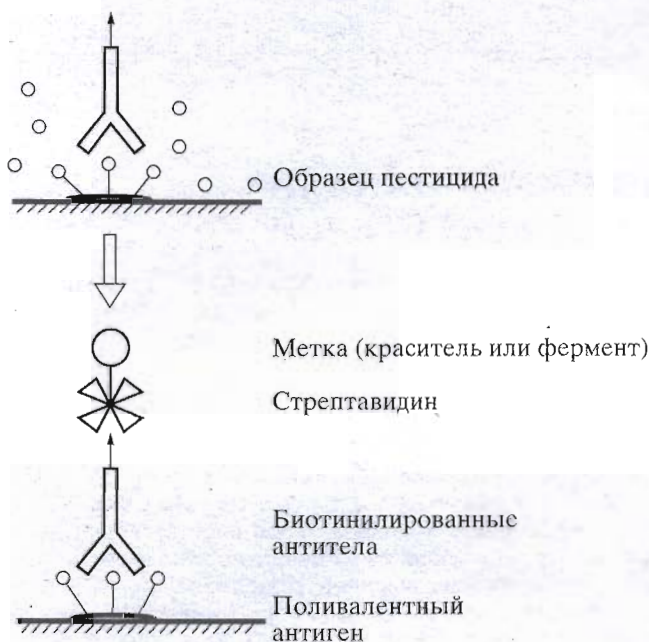


Рис. 1. Схема определения гербицидов, основанная на принципе конкурентного взаимодействия.

рого впоследствии могла бы быть использована при разработке аналитических систем для определения других низкомолекулярных соединений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предложенный нами метод иммуноаналитического определения пестицидов основан на принципе конкуренции за центры связывания антител между пестицидом, иммобилизованным на поверхности твердой фазы, и свободным пестицидом, содержащимся в образце [5]. Количество антител, связавшихся с твердой фазой, находится в обратной зависимости от количества определяемого пестицида (рис. 1). Для оценки степени связывания антител, предварительно меченных биотином, используют комплекс стрептавидина с одной из визуализирующих меток. Использование биотин-стрептавидиновой пары, основанное на высоком сродстве биотина (витамин Н) и бактериального белка стрептавидина ($K_d \cdot 10^{-15}$ М) [6], позволяет значительно увеличить чувствительность и специфичность определения. Стрептавидин может быть помечен ферментом (например, щелочной фосфатазой, пероксидазой хрена) или различными корпускулярными метками, такими, как коллоидное золото, латексы, коллоидные красители [6].

С целью упрощения анализа и сокращения времени его проведения нами предложены комплексы с неферментными метками, которые смогут не только конкурировать по чувствительности с пероксидазными конъюгатами, но и позволят избе-

жать основных недостатков работы с ферментными метками: необходимости дополнительной стадии обнаружения самого фермента, использования токсичных хроматогенов, нестабильности субстратов, высокой стоимости конъюгата.

В качестве альтернативных неферментных меток, пригодных для применения в различных аналитических и диагностических тест-системах с визуальным способом оценки результатов, ранее предложены окрашенные полимерные дисперсии водонерастворимых частиц коллоидных красителей [7]. При выборе дисперсии нами в свою очередь предъявлены следующие требования: хороший показатель цветности, гидрофобность для дальнейшей сенсibilизации поверхности красителя биополимерами, высокая стабильность, доступность; полученный на ее основе комплекс должен позволять детектировать требуемое соединение с высокой чувствительностью и специфичностью. Такими характеристиками, по нашему мнению, обладают водные дисперсии коллоидных текстильных красителей черного, синего, красного, малинового и желтого цвета, любезно предоставленные АО "Колорит", Россия.

На первом этапе исследования проведена стандартизация дисперсий красителей всех цветов для получения дисперсий определенного размера с минимальным молекулярно-массовым распределением частиц, так как в ходе предварительных исследований показано, что размер частиц, соответствующий 250 нм с небольшим разбросом, оптимален и имеет определяющее значение для получения высокочувствительного комплекса красителя со стрептавидином. Для этого, а также для перевода дисперсий из одной среды в другую и ее концентрирования, использовали метод центрифугирования, который по сравнению с методом гель-фильтрации позволяет уменьшить время и сократить потери реагента. Средний размер частиц дисперсий всех используемых цветов после центрифугирования, определенный с помощью счетчика Coulter N4M, составил 250 ± 30 нм. На рис. 2 приведено распределение диаметра частиц красителя анилиновый черный. Для дальнейших исследований применяли дисперсии со стандартизированными частицами.

Иммобилизацию стрептавидина проводили в одну стадию путем физической сорбции белка на поверхности частиц. На первом этапе оптимизированы условия получения комплекса стрептавидин-коллоидный краситель, а именно определена оптимальная нагрузка стрептавидина (соотношение белок/краситель) и оптимальная среда реакции. Для выбора наилучших условий получения комплекса сопоставлены несколько отличающихся по ионному составу буферов: боратный, Трис, Нерес, цитратный, MOPS, PBS. Активность полученных комплексов сравнивали методом дот-иммуноанализа на модельной системе, определяя Bi-IgG, Fo-

товя серию его двукратных разведений, затем точно нанесенных на полоски нитроцеллюлозной мембраны. Было установлено, что в диапазоне нагрузок по стрептавидину 0.125–2.0 мг/мл оптимальной является нагрузка 1 мг/мл. Уменьшение нагрузки приводило к снижению чувствительности определения Vi-IgG, увеличение, не влияя на чувствительность определения вещества, – к избыточному расходу реагента. Наилучшим буфером, позволяющим достичь минимального неспецифического связывания и максимальной активности комплексов, оказался боратный, хотя хорошие результаты получены и для Hepes. Наибольшая стабильность комплексов и чувствительность определения достигается при нейтральном рН буферов (7.2–7.4), что связано с физическими свойствами дисперсных частиц, начинающих коагулировать как в кислой, так и в щелочной среде. Сравнение комплексов различного цвета, синтезированных в оптимальных условиях, показало, что чувствительность определения Vi-IgG убывала согласно цветовому ряду: черный, синий, малиновый, красный, желтый. В дальнейшем при определении пестицидов использовали комплекс стрептавидина с черным красителем, характеризующимся наилучшей цветностью и, следовательно, максимальной визуализирующей способностью.

Сравнение визуализирующей способности разработанных ферментных комплексов проводили при определении Vi-IgG, используя в качестве контроля ферментный конъюгат STR-HRP, полученный по стандартной методике [8]. Было показано (рис. 3), что чувствительность определения с помощью комплексов STR-DYE в 4 раза превышает чувствительность определения с помощью ферментного конъюгата.

Важная характеристика полученного иммунореагента – его стабильность, определение которой проводили при сравнении активности комплексов, предварительно хранившихся при 4 и 22°C в течение 1, 4, 8, 12 месяцев. Как в модельной, так и в реальной системах комплексы не потеряли активности на протяжении всего срока хранения при 4°C. При 22°C, начиная с 8 месяцев, наблюдалось некоторое снижение интенсивности окраски дотов.

Для неинструментального определения низкомолекулярных соединений, в частности пестицидов, мы использовали метод конкурентного дот-иммуноанализа, проводимый в предложенном нами формате гребенки, являющемся модификацией традиционного дот-анализа и отличающемся от него методикой тестирования: полоски (стрипы) с точно нанесенными образцами жестко скрепляют между собой параллельно друг другу, после чего они напоминают гребенку для заливки геля в электрофорезе. В качестве подложки был использован твердый непористый материал (полистирол), отличающийся высокой прочностью.

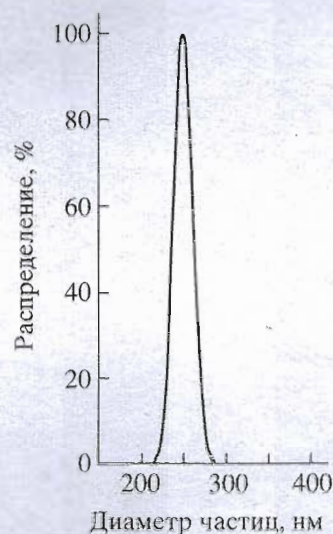


Рис. 2. Распределение частиц водной дисперсии текстильного красителя анилинового черного по размерам.

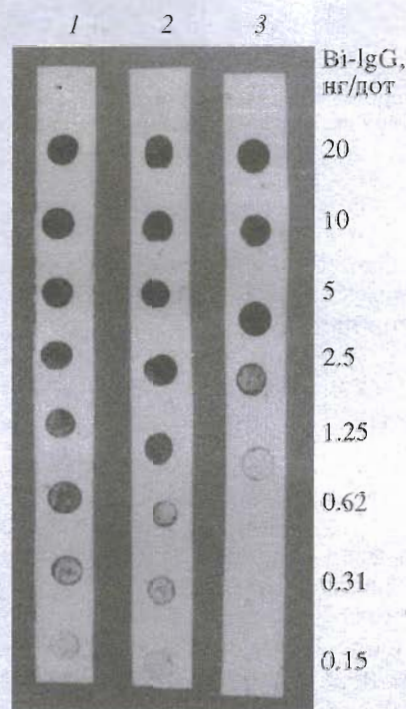


Рис. 3. Определение Vi-IgG методом дот-иммуноанализа, используя комплексы STR-DYE (1 – краситель анилиновый черный, 2 – синий антрохинон В) и конъюгат STR-HRP (3).

Дальнейшие манипуляции с полосками проводились в лунках иммунологических планшет. Объем лунок и расстояние между ними определяли размер полосок и расстояние между ними в гребенке. При использовании планшет с объемом лунок 400 мкл размер стрипа позволяет осуществлять точечное нанесение сразу двух антигенов, т.е. возможно совместное определение в об-

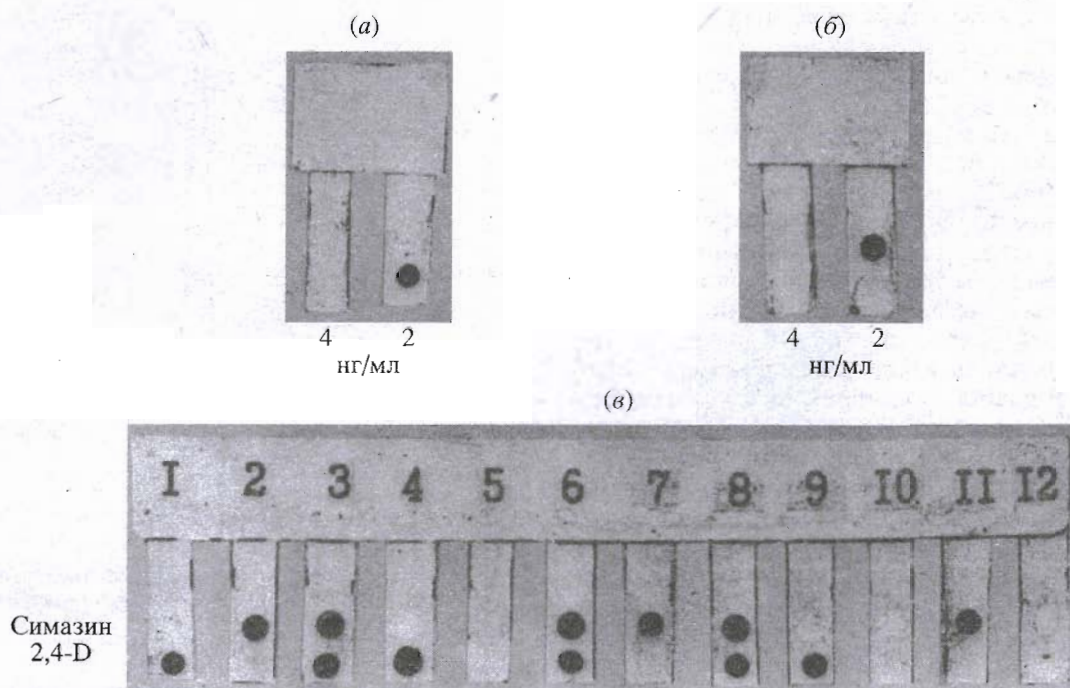


Рис. 4. Определение симазина (а), 2,4-D (б) и совместное определение симазина и 2,4-D (в) в разных опытных образцах методом дот-иммуноанализа в формате гребенки с использованием комплекса STR-DYE (анилиновый черный).

разце двух пестицидов, в данном случае 2,4-D и симазина, при наличии соответствующих специфических антител. Очевидно, что использование такого формата проведения анализа значительно упрощает процедуру определения, особенно если речь идет о большом числе тестируемых образцов, позволяя в то же время существенно сократить расход реагентов.

Определение пестицидов базировалось на следующем принципе. Поливалентный антиген, конъюгат овальбумина с пестицидом (в соотношении 1 моль овальбумина к 5–10 молям пестицида) иммобилизовали на поверхности зубцов гребенки, число которых соответствовало числу определяемых образцов. Зубцы гребенки последовательно инкубировали с раствором анализируемого водного образца, содержащего биотинилированные антитела против определяемого пестицида, а затем с визуализирующим комплексом стрептавидина с полимерными красителями или конъюгатом стрептавидина с пероксидазой хрена. В случае использования пероксидазных конъюгатов проводили дополнительную стадию инкубации с раствором субстрата. При отсутствии в образце определяемого пестицида на поверхности полистирола в области нанесения антигена появлялось ярко окрашенное пятно соответствующего цвета: черного для STR-DYE и синего для STR-HRP. При наличии в пробе определяемого пестицида он конкурировал с иммобилизованным на полимерном носителе антигеном за центры связывания анти-

тел, что приводило к ингибированию реакции (окрашенное пятно не образовывалось). Использование окрашенных коллоидных комплексов позволило упростить методики и сократить время проведения анализа, не требующего применения хромофорных субстратов.

При оптимизации параметров дот-анализа в формате гребенки оказалось, что чувствительность метода зависит от соотношения концентраций поливалентного антигена и антител. Показано, что для поливалентного конъюгата, иммобилизованного на полистироле, оптимальна концентрация 1 мг/мл. Уменьшение концентрации поливалентного конъюгата приводило к снижению чувствительности определения, увеличение же усиливало яркость пятна, однако дальнейшего возрастания чувствительности не происходило.

Далее установлено, что оптимальными для проведения анализа оказались следующие концентрации антител: 10 (симазин) и 20 мкг/мл (2,4-D). Уменьшение концентрации антител сопровождалось заметным снижением интенсивности окрашивания пятна, увеличение нагрузки по антителам к усилению яркости пятна и в то же время к снижению чувствительности определения. Оптимальная концентрация коллоидного красителя оказалась равной 0.1%. Ее уменьшение приводило к снижению интенсивности окрашивания пятна и, соответственно, к уменьшению чувствительности определения, а увеличение выше 0.3% – к возникновению высокого неспецифического фона. В итоге были

выбраны следующие условия проведения дот-иммуноанализа: концентрации поливалентного антигена – 1 мг/мл, биотинилированных антител – 20 для 2,4-D и 10 мкг/мл – для симазина, комплекса STR-DYE – 0.1%, конъюгата STR-HRP – 10 мкг/мл. В указанных условиях полное ингибирование реакции происходило при концентрации 4 нг/мл как для симазина, так и для 2,4-D (таблица). На рис. 4а, б приведены типичные результаты по определению симазина и 2,4-D методом дот-иммуноанализа в формате гребенки. В качестве контроля за чувствительностью определения параллельно проводили иммуноаналитическое дот-определение пестицидов в формате гребенки с использованием в качестве детектирующего маркера стандартного конъюгата STR-HRP. Из таблицы видно, что использование в качестве детектирующей метки коллоидного окрашенного красителя позволило повысить чувствительность определения в 4 раза по сравнению с пероксидазной меткой.

Дальнейшее развитие предложенного метода позволяет проводить совместное одновременное определение нескольких пестицидов посредством совместной иммобилизации на зубцах гребенки различных антигенов и применения набора соответствующих антител. Для этого на зубцы гребенки были раздельно точно нанесены два поливалентных антигена – Sm-OVA и 2,4-D-OVA, затем определение проводили по описанной выше схеме с использованием ранее приведенных концентраций реагентов. Анализируемый образец вносили вместе с антителами двух типов против симазина и против 2,4-D. Чувствительность анализа, как и в случае тестирования одного пестицида, составила 4 нг/мл. В качестве примера на рис. 4в показано совместное определение пестицидов в различных водных образцах. Окрашенное пятно не появляется в области нанесения поливалентного антигена при содержании этого пестицида в образце (верхний ряд – симазин, нижний – 2,4-D) выше 4 нг/мл.

Результаты неинструментального определения пестицидов сопоставлены с традиционным конкурентным ИФА. Для ИФА была также проведена оптимизация условий анализа с целью достижения наилучшего соотношения сигнал/фон. Оптимальные концентрации реагентов составили (мкг/мл): поливалентный антиген – 1, биотинилированные антитела – 1 (для симазина) и 4 (для 2,4-D) и STR-HRP – 1. Чувствительность ИФА составила 12 для симазина и 25 нг/мл для 2,4-D (рис. 5), т.е. она в несколько раз ниже, чем при неинструментальном определении.

Таким образом, проведенные исследования продемонстрировали эффективность нового класса меток для диагностических систем с визуаль-

Результаты определения симазина и 2,4-D методом неинструментального конкурентного дот-иммуноанализа в формате гребенки и методом конкурентного ИФА (приведена чувствительность определения, нг/мл)

Пестицид	Дот-иммуноанализ		ИФА
	DYE	HRP	HRP
Симазин	4	16	12
2,4-D	4	16	25

ной оценкой результатов. Новые метки представляют собой окрашенные водонерастворимые коллоидные частицы с размером около 250 нм, пригодные для иммобилизации различных высокоспецифичных лигандов (белок А, стрептавидин, поликлональные и моноклональные антитела, биотинилированные белки, пептидные и другие антигены и т.д.) и обладающие хорошей визуализирующей активностью.

Предложенный нами неинструментальный метод полуколичественного определения симазина и 2,4-D на основе неферментативного комплекса STR-DYE характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью определения, позволяет детектировать пестицид с высокой степенью достоверности в широком диапазоне концентраций, не занимая много времени и отличаюсь простотой в постановке, и поэтому представляет несомненный практический интерес при экспресс-мониторинге воды, почвы и продуктов питания. Данный метод дот-анализа, проводимый в формате гребенки, может быть использован в качестве базовой схемы при разработке биоаналитических методов определения любых других низкомолекулярных соединений (пестициды, наркотики, стероидные гормоны, витамины и др.), к которым получены антитела.

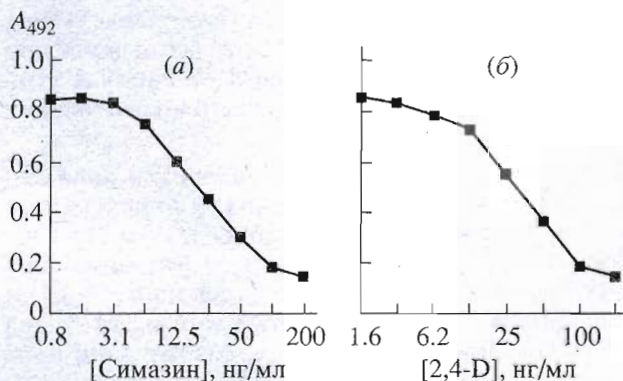


Рис. 5. Зависимость оптического поглощения от концентрации симазина (а) и 2,4-D (б) в конкурентном ИФА.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы симазин (Serva, ФРГ) и 2,4-D (Sigma, США), стрептавидин (ИБХ, из *Streptomyces avidinii*, аффинно очищенный, лиофилизированный, активность не менее 14 ед./мг белка), пероксидаза хрена (Центр агротехники, Львов, R_z 3.0). Получение специфических реагентов для определения симазина и 2,4-D подробно описано ранее: поливалентные конъюгаты – Sm-OVA [11] и 2,4-D-OVA [12], моноклональные антитела против 2,4-D [10]; поликлональные кроличьи антитела против симазина [13].

Получение комплекса стрептавидин-краситель. Использованы водные дисперсии пяти различных по цвету текстильных красителей – анилиновый черный, кислотный ярко-красный 4Ж, красный 5СХ, желтый 3ХД, синий антрахинон В (АО “Колорит”, Россия). Дисперсии красителей этих цветов для очистки от продуктов синтеза центрифугировали 3 раза по 30 мин (20°C , 20000 g). После каждого центрифугирования дисперсию частиц промывали водой и подвергали ультразвуковому воздействию в ультразвуковой бане для разрушения образовавшихся конгломератов. Для удаления агрегированных частиц и получения дисперсий частиц размером 250 ± 30 нм 5% водную суспензию красителей центрифугировали 30 мин (20°C , 125 g). Концентрацию дисперсий красителя определяли с помощью гравиметрического метода. Распределение и размер частиц определяли на автоматическом анализаторе субмикронных частиц Coulter N4-MD (Coultronics, Франция).

Для иммобилизации стрептавидина на поверхности частиц красителей к 1% суспензии красителя в одном из буферов с pH 7.4 (ВВ, Трис, Перес, дитратный буфер, MOPS, PBS) добавляли 125–1000 мкг/мл стрептавидина в том же буфере и инкубировали 5 ч при комнатной температуре или 2 ч при 37°C при постоянном перемешивании, а затем отмывали три раза тем же буфером с помощью центрифугирования в режиме, использованном для подготовки красителя к работе. Далее дисперсию красителя суспендировали в 0.5 мл того же буфера, содержащего 2 мг/мл овальбумина, и инкубировали 2 ч при 37°C , а затем ночь при 4°C . Комплексы хранили при 4°C . Рабочая концентрация комплекса краситель-стрептавидин составила 0.1%.

Получение конъюгата стрептавидин-пероксидаза. Конъюгат стрептавидина с пероксидазой получали по методу [6]. Пероксидазу хрена растворяли в воде до концентрации 10 мг/мл, добавляли 0.1 объема свежеприготовленного 0.25 М периодата натрия, инкубировали в темноте 20 мин при комнатной температуре и диализовали ночь против 0.1 М ВВ, pH 9.0, при 4°C , добавляли стрептавидин в том же буфере и инкубировали 3 ч при комнатной температуре. Соотношение пероксидаза–стрептавидин составляло 3 к 1 (по мас-

се). Добавляли 0.1 объема 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 иммуноглобулинов. Раствор иммуноглобулинов (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 биотинамидокапроновой 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 . Bi-IgG хранили при 4°C .

Определение чувствительности комплексов стрептавидин-краситель. На поверхность полосок нитроцеллюлозы (Schleicher and Schuell, ФРГ) точно наносили по 2 мкл Bi-IgG, готовили серию двукратных разведений от 160 мкг/мл до 0.07 мкг/мл в воде, полоски высушивали на воздухе и блокировали PBS/OVA 30 мин при комнатной температуре. Полоски вновь высушивали на воздухе и хранили при 4°C в герметично закрытой упаковке. Для проведения анализа полоски помещали в суспензию STR-DYE (0.1% в PBST/OVA) или в раствор STR-HRP (2.0 мкг/мл в том же буфере), инкубировали 30 мин при комнатной температуре при постоянном перемешивании и трижды промывали PBST. При использовании конъюгата STR-HRP полоски дополнительно инкубировали в 50 мМ имидазольном буфере, pH 7.5, содержащем 2.0 мг/мл 1,4-хлорнафтола и 0.02% H_2O_2 с добавлением 0.2 мг/мл *орто*-фенилендиамина и 0.1 мг/мл бисульфита натрия [9]. Каждый анализ проводили трижды.

Определение пестицидов методом дот-иммуноанализа в формате гребенки. Для приготовления гребенки полистирол нарезали на полоски размером 5×15 мм и жестко скрепляли 12 полосок между собой на расстоянии 5 мм. На поверхность зубцов гребенки наносили по 2 мкл водного раствора конъюгата Sm-OVA или 2,4-D-OVA (1 мг/мл, 5–10 моль/моль), полоски высушивали на воздухе, затем опускали в раствор PBS/OVA на 30 мин при комнатной температуре. Полученную гребенку снова высушивали на воздухе и хранили при 4°C в герметично закрытой упаковке. Срок хранения фильтров до 6 месяцев. В лунки иммунологической или культуральной микропланшеты четырьмя рядами добавляли: 1) аликвоты двукратных разведений раствора анализируемого образца (симазин или 2,4-D) в PBST/OVA-буфере, содержащем 10 (для симазина), 20 мкг/мл (для 2,4-D) биотинилированных антител; 2) PBST; 3) визуализирующая метка – 0.1% суспензия комплекса STR-DYE или 2.0 мкг/мл конъюгата STR-HRP в PBST/OVA) и 4) PBST. Зубцы гребенки последовательно помещали (окунали) в лунки рядов 1–4 и инкубировали в 1 и 3 ряду по 30 мин, а во 2 и 4 по 3 мин при комнатной температуре. При использовании конъюгата STR-HRP для определения свя-

завшейся пероксидазы в 5 дополнительный ряд микропланшеты добавляли 50 мМ имидазольный буфер, pH 7.5, содержащий 2.0 мг/мл 1,4-хлорнафтола и 0.02% H_2O_2 с добавлением 0.2 мг/мл орто-фенилендиамин и 0.1 мг/мл бисульфита натрия, а само определение проводили как в случае определения активности конъюгатов. При отрицательной реакции, т.е. в отсутствие в образце пестицида, в области нанесения антигена появлялось окрашенное пятно, при положительной – отсутствовало. Цвет пятна соответствовал цвету используемого красителя или был синим в случае STR-HRP. Интенсивность окрашивания пятна определялась концентрацией раствора комплекса STR-DYE. Каждый анализ проводили трижды.

Определение пестицидов методом конкурентного ИФА. В лунки микропланшета для ИФА (DynaTech, ФРГ) последовательно вносили 100 мкл Sm-OVA или 2,4-D-OVA (1–2 мкг/мл в 0.1 М $NaHCO_3$, pH 9.4) и инкубировали ночь при 4°C. Планшеты трижды промывали PBST и блокировали PBST/OVA 30 мин при 37°C. Далее готовили серию двукратных разведений анализируемых образцов симазина или 2,4-D (от 0.2 мкг/мл до 0.008 мкг/мл) в PBST/OVA, 50 мкл которых добавляли к равному объему биотинилированных антител (1–4 мкг/мл в PBST/OVA), и инкубировали 30 мин при 37°C. Планшеты 5 раз промывали 250 мкл PBST, добавляли по 100 мкл STR-HRP (1.0 мкг/мл) в PBST/OVA и инкубировали в том же режиме, затем планшеты промывали 250 мкл PBST 5 раз. Для определения связавшегося конъюгата в каждую лунку добавляли по 100 мкл 50 мМ фосфат-цитратного буфера, pH 5.0, содержащего 0.02% H_2O_2 и 0.4 мг/мл орто-фенилендиамин

(Serva, ФРГ), инкубировали 5–10 мин в темноте и останавливали ферментативную реакцию добавлением 50 мкл 1.7 Н H_2SO_4 . Каждый анализ проводили трижды. Измеряли оптическое поглощение при 492 нм на многоканальном спектрофотометре Multiscan (Titertek).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гербициды / Ред. В.А. Захаренко. М.: Агропромиздат, 1990.
2. Hock B. // Acta Hydrochim. Hydrobiol. 1993. V. 21. P. 71–83.
3. Knopp D. // 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. Павлова И.С., Любавина И.А., Жердев А.В., Зинченко А.А. // Биоорганич. химия. 1997. Т. 23. С. 832–838.
6. Complementary Immunoassay / Ed. W.P. Collins. N. Y.: Wiley, 1988.
7. Hsu Y. // Anal. Biochem. 1984. V. 142. P. 221–225.
8. Tijssen P., Kurstak E. // Anal. Biochem. 1984. V. 136. P. 451–457.
9. Kobayashi R., Tashima Y. // Anal. Biochem. 1989. V. 183. P. 9–13.
10. Goodrow M.H., Harrison R.O., Hammock B.D. // J. Agric. Food Chem. 1990. V. 38. P. 990–996.
11. Еремин С.А., Лунская И.М., Егоров А.М. // Биоорганич. химия. 1993. Т. 19. С. 836–843.
12. Franek M., Kolar V., Granatova M., Neverkova Z. // J. Agric. Food Chem. 1994. V. 42. P. 1369–1374.
13. Дзантиев Б.Б., Жердев А.В., Романенко О.Г., Титова Н.А., Трубочева Ж.Н., Чередникова Т.В., Еремин С.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 1994. Т. 20. С. 731–739.

A Noninstrumental Immunoassay Based on Colloidal Dyes

I. A. Lubavina^{*#}, I. S. Salomatina^{*}, A. A. Zinchenko^{*}, A. V. Zherdev^{**}, and B. B. Dzantiev^{**}

^{*}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, Moscow

Detecting labels based on water dispersions of colloidal textile dyes were developed that are useful in various analytical and diagnostic test systems for a simple visual assessment of the assay. Colored water-insoluble particles of dyes were used for the sorptional immobilization of streptavidin on their surface. The resulting streptavidin-dye (STR-DYE) complexes possessed a high visualizing capacity and were used for the combined detection of pesticides (simazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid) by noninstrumental immunoassay (DYE-comb-assay, competitive dot-immunoassay in the comb format). The detection limits and the duration of our DYE-comb-assay (4 ng/ml, 20–25 min), HRP-comb-assay (competitive dot-immunoassay in the comb format using the enzymic conjugate of STR with horseradish peroxidase) (16 ng/ml), and the traditional competitive ELISA (12–16 ng/ml, 1.5 h) were compared. This DYE-comb-assay is simple enough and can be used under field conditions.

Key words: competitive ELISA, colored colloidal dyes, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, dot-immunoassay, simazine

[#] To whom correspondence should be addressed; e-mail: alezin@ibch.siobc.ras.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 3. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.