



УДК 577.112.34.083.3

ПОЛИАКРОЛЕИНОВЫЙ ЛАТЕКС В КАЧЕСТВЕ ТВЕРДОФАЗНОГО НОСИТЕЛЯ ДЛЯ ИММУНОРАДИОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА. СРАВНЕНИЕ С МИКРОКРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗОЙ И ПОВЕРХНОСТЬЮ ПОЛИСТИРОЛЬНЫХ ПРОБИРОК

© 1995 г. О. В. Жоров, В. А. Прейгерзон, Ю. В. Лукин*, В. П. Зубов*, С. П. Марцев[#]*Институт биоорганической химии АНБ, 220141, Минск, Жодинская ул., 5/2;*** Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117871, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 31.05.94 г.

Иммуносорбент, полученный ковалентной иммобилизацией антител на полиакролеиновом латексе, исследован в сравнении с сорбентами на основе микрокристаллической целлюлозы и поверхностью полистирольных пробирок в двухцентровом иммунорадиометрическом анализе ферритина. Показано, что полиакролеиновый латекс обеспечивает ковалентное связывание до 75 мг белка на 1 г сухого полимера с эффективностью иммобилизации 50 - 70% и высокой эффективной константой ассоциации иммобилизованных антител ($K_a = 4.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$). Соответствующие характеристики для сорбента на основе микрокристаллической целлюлозы составляли 33 мг/г, 25 - 33% и $4.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. В иммунорадиометрическом анализе ферритина иммуносорбенты на основе полиакролеинового латекса и целлюлозы обеспечивают близкую по величине аналитическую чувствительность на уровне $(0.7 - 0.9) \times 10^{-13} \text{ M}$ ферритина и демонстрируют возможность устранения "хук-эффекта". По сравнению с иммуносорбентом на основе полистирольных пробирок преимущества полиакролеинового латекса заключаются в снижении минимальной определяемой концентрации (повышении аналитической чувствительности), в расширении динамического диапазона анализа и отсутствии "хук-эффекта".

Ключевые слова: иммуноанализ, полиакролеиновый латекс, иммуносорбенты, ферритин.

Иммобилизованные антитела являются одним из основных реагентов иммуноанализа. В качестве носителей для иммобилизации наиболее часто применяются либо пластиковые поверхности пробирок, шариков или лунок, либо мелкодисперсные суспензии микрочастиц различных полимеров [1, 2]. Основным преимуществом пластиковых поверхностей является простота адсорбционной иммобилизации и операционной схемы анализа, исключающей необходимость стадии центрифугирования. Недостаток таких твердофазных иммунореагентов – низкая емкость, ограниченная количеством антител в монослое и малой поверхностью линейных полимеров [3 - 5], а также невозможность проведения реакции в наиболее эффективном двухстадийном режиме с первоначальным взаимодействием антитела и антигена в растворе и последующим связыванием образовавшихся комплексов с иммуносорбентом [1]. Несмотря на то что использование мелкодисперс-

ных иммуносорбентов операционно усложняет анализ за счет необходимости центрифугирования, такие сорбенты обеспечивают высокие концентрации антител, вносимых в реакцию. Известно, что увеличение количества иммобилизованных антител улучшает ряд основных параметров иммуноанализа: сокращается время реакции, уменьшается величина минимальной определяемой концентрации антигена (C_{min}), повышается разрешающая способность анализа и величина максимального связывания меченых антител [6 - 8].

Следует особо отметить, что высокеемкие носители иммобилизованных антител необходимы для устранения такого негативного явления иммунометрического анализа, как "хук-эффект" [6, 8, 9], т.е. эффект парадоксального снижения фракции связанных с иммуносорбентом меченых антител при увеличении концентрации антигена выше некоторой критической. "Хук-эффект" характерен для всех двухцентровых иммунометрических систем в определенном диапазоне концентраций и приводит к тому, что в результате наличия восходящего и нисходящего сегментов

Сокращения: МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза, ПАЛ – полиакролеиновый латекс.

[#] Автор для переписки.

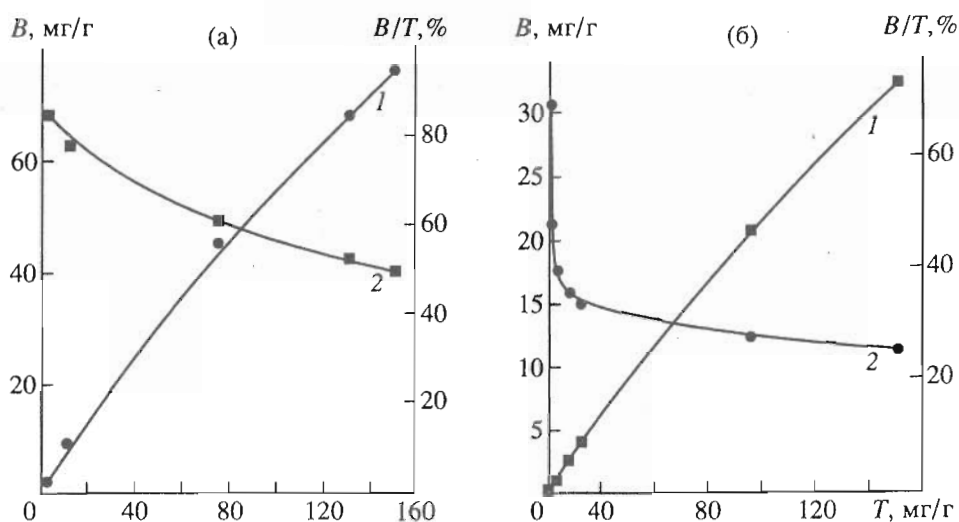


Рис. 1. Количественные характеристики иммобилизации белка антисыворотки на ПАЛ (а) и МКЦ (б): 1 – зависимость количества иммобилизованного белка (B) от внесенного в реакцию белка (T); 2 – выход реакции иммобилизации.

кривой “доза–эффект” одному значению сигнала связанных с иммуносорбентом меченых антител могут соответствовать две различные концентрации определяемого антигена, одна из которых является ложной.

В связи с перечисленными выше особенностями иммуноанализа получение высокочувствительных носителей для иммобилизации иммунореагентов (антигенов и антител) остается одной из актуальных задач в данной области исследований. Такие носители должны соответствовать одновременно нескольким критериям, в том числе обладать достаточной гидрофильностью, высокой концентрацией центров связывания иммунореагентов и простотой процедуры иммобилизации. Микросферы полиакролеинового латекса, впервые использованные в качестве твердой фазы в иммуноанализе в 1982 - 1985 гг. [10 - 12], до настоящего времени в достаточной степени не изучены как аналитический реагент. Ранее в одной из наших лабораторий разработан метод получения микросфер монодисперсного полиакролеинового латекса (ПАЛ), позволяющий получать легкодиспергируемые полимерные носители, различающиеся плотностью реакционных альдегидных групп, размером частиц и цветом реагентов [13, 14]. Концентрация поверхностных альдегидных групп на микросферах ПАЛ варьирует в пределах 1.5 - 4.5 ммоль/г в зависимости от диаметра (обычно d 0.1 - 1.5 мкм). Важно отметить, что ПАЛ не требует предварительной активации для иммобилизации белка. Эти твердофазные носители представляются перспективными для использования в тестах с визуальной детекцией латексной агглютинации, а также в количественном иммуноанализе.

Ферритин является металлопротеином с функцией хранения и запасаания железа, которое в сво-

бодном виде токсично для организма. Ферритин имеет молекулярную массу около 450 кДа и состоит из 24 субъединиц двух типов – Н и L [15, 16]. Уровень ферритина в сыворотке зависит от концентрации железа в организме [16, 17]. Отличительной особенностью клинического иммуноанализа ферритина является потребность определения белка в сыворотке крови в широком концентрационном диапазоне, от 2 нг/мл (концентрация ферритина в сыворотке при анемии) до 20 мкг/мл и более (при гемохроматозах различной этиологии) [18, 19]. Это приводит к необходимости использования иммуносорбентов с высокой антигенсвязывающей способностью для устранения “хук-эффекта” и обеспечения высокой аналитической чувствительности.

В данной работе исследован ПАЛ как твердофазный суспензионный носитель для иммобилизации антител и их последующего использования в иммунорадиометрическом анализе ферритина в сравнении с двумя широко распространенными носителями – микрокристаллической целлюлозой (МКЦ) и поверхностью полистирольных пробирок.

Нами использовано несколько критериев для оценки иммуносорбентов на основе ПАЛ и МКЦ: 1) емкость полимера по белку и эффективность (выход) иммобилизации; 2) значение максимального и неспецифического связывания меченых антител и отношение сигнал/шум; 3) наклон кривой “доза–эффект” и минимальная определяемая концентрация антигена; 4) степень проявления “хук-эффекта”.

Возможность получения высокочувствительных иммуносорбентов на основе ПАЛ показана на рис. 1а, отражающем результаты иммобилизации на латексе иммунной сыворотки кроликов, содержащей антитела к ферриту из селезенки человека.

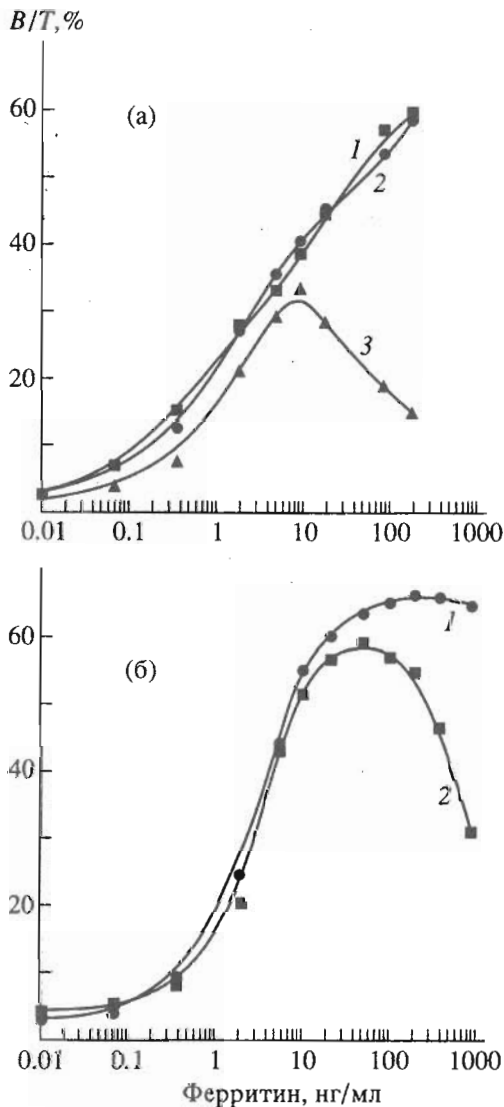


Рис. 2. Зависимость связывания ферритина в твердофазной иммунорадиометрической системе от емкости иммуносорбента. B/T – отношение связанных $[^{125}I]$ антител к их общему количеству в растворе. В пробирки вносили: а – 2 мг ПАЛ с общим содержанием иммобилизованного белка антисыворотки 75 (1), 45 (2) и 18 мг (3) на 1 г; б – 10 мг МКЦ с общим содержанием иммобилизованного белка 32 (1) и 18 мг (2) на 1 г.

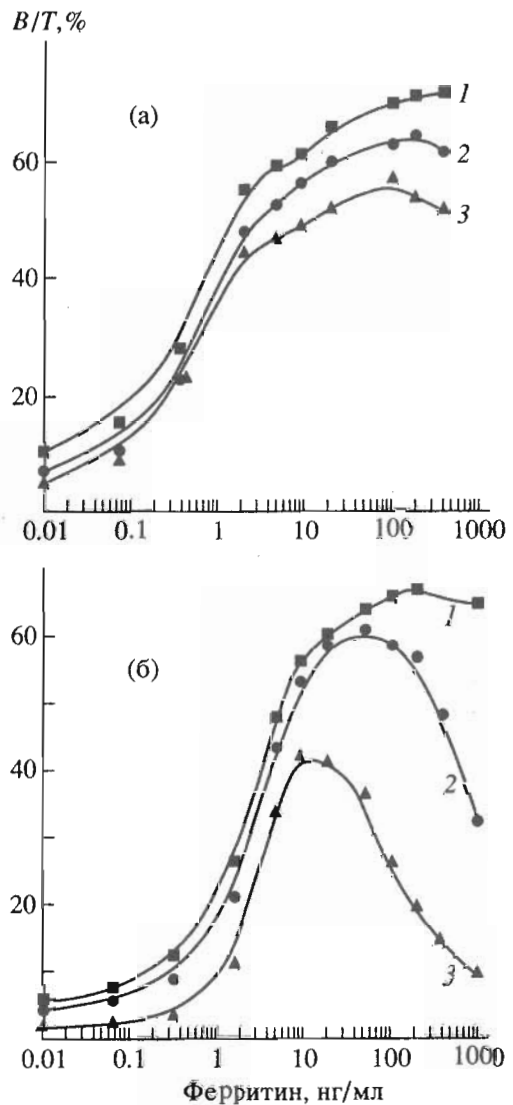


Рис. 3. Зависимость эффективности связывания ферритина в двухцентровом иммунорадиометрическом анализе от количества вносимого иммуносорбента. а – ПАЛ: 2 (1), 1 (2), 0,5 мг (3); б – МКЦ: 40 (1), 10 (2), 1 мг (3). Емкость иммуносорбентов: 57 мг/г ПАЛ и 32 мг/г МКЦ. Обозначение оси ординат – как на рис. 2.

Результат свидетельствует о высокой емкости полученного иммуносорбента (до 75 мг иммобилизованного белка на 1 г носителя) и высокой эффективности иммобилизации (выход иммобилизованного белка 50 - 70%). Для сравнения были получены иммуносорбенты на основе МКЦ (рис. 1б) и показано, что количество связанного с целлюлозой белка в 2 раза ниже при тех же экспериментальных условиях. Кроме того, выход иммобилизованного белка для целлюлозы примерно в 2 раза ниже аналогичного показателя для ПАЛ.

Важным преимуществом ПАЛ является тот факт, что при иммобилизации на нем антител их

инактивация происходит в меньшей степени, чем для МКЦ, что подтверждается данными определения эффективных констант ассоциации (таблица). Примерно на порядок большая аффинность антител, иммобилизованных на ПАЛ, наряду с повышенной емкостью носителя обеспечивает латексному иммуносорбенту дополнительные преимущества (рис. 1), которые были затем подтверждены в дальнейших исследованиях (рис. 2 - 4).

Исследование зависимости основных параметров иммуноанализа от концентрации иммобилизованных антител для ПАЛ и МКЦ (рис. 2) показывает заметный положительный эффект

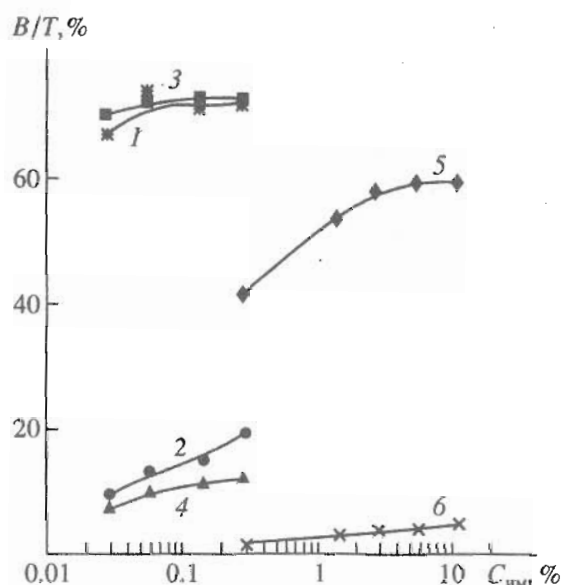


Рис. 4. Определение количества иммуносорбента, необходимого для эффективного связывания иммунных комплексов ферритина с $[^{125}\text{I}]$ антителами. Определяли специфическое связывание иммунных комплексов при концентрации ферритина 17.5 мкг/мл (кривые 1, 3, 5) и неспецифическое связывание $[^{125}\text{I}]$ антител в отсутствие ферритина (кривые 2, 4, 6). Емкость иммуносорбентов: 75 мг/г ПАЛ (1, 2), 16 мг/г ПАЛ (3, 4), 32 мг/г МКЦ (5, 6). $C_{\text{имм}}$ – концентрация суспензии иммуносорбента. Обозначение оси ординат – как на рис. 2.

высокой емкости ПАЛ и сохранения параметров аффинности иммобилизованных на твердой фазе антител. Увеличение количества твердофазных антител приводит к сдвигу зоны “хук-эффекта” в область высоких концентраций антигена, что расширяет динамический диапазон анализа. Одновременно с этим возрастает величина максимального связывания $[^{125}\text{I}]$ антител, а также соотношение максимального и фонового (шумового) сигналов, характеризующее способность аналитической системы дискриминировать две близкие концентрации антигена (рис. 2).

Увеличение количества твердофазных антител в реакционной среде альтернативно может быть достигнуто путем увеличения количества вносимого иммуносорбента с малой или умеренной емкостью. Однако, как показывают данные

Эффективные константы ассоциации для антител, иммобилизованных на ПАЛ и МКЦ

| Твердо-фазный носитель | Концентрация суспензии иммуносорбента, % | Количество иммобилизованного IgG, мг/г | K_a , M^{-1} |
|------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------|
| ПАЛ | 0.2 | 33 | 4.5×10^9 |
| МКЦ | 4.0 | 20 | 4.3×10^8 |

рис. 3, такой путь менее эффективен. Несмотря на то что увеличение дозы иммуносорбента в реакции сдвигает зону “хук-эффекта” вправо по шкале концентраций антигена и увеличивает наклон кривой, одновременное возрастание поверхности носителя приводит к опережающему росту неспецифического связывания (т.е. фонового, или шумового, сигнала) в результате гидрофобной адсорбции меченых антител на полимерных частицах. Это снижает предельные значения соотношения максимальный сигнал/шум (рис. 3), что закономерно связано с увеличением значений минимальной определяемой концентрации (C_{min}) [20], т.е. со снижением чувствительности анализа. Эти данные дополнительно подтверждают преимущества использования в анализе высокочувствительных иммуносорбентов, позволяющих вносить в реакцию ограниченные количества полимерных носителей, с целью достижения наилучших аналитических параметров кривой “доза-эффект”.

Определение количества иммуносорбента, оптимального с точки зрения основных аналитических характеристик, проведено нами в эксперименте, в котором антиген и $[^{125}\text{I}]$ антитела, взятые в неизменной концентрации, титровали иммуносорбентом в возрастающей концентрации (рис. 4). Результаты показывают, что для достижения максимального связывания меченых антител в случае ПАЛ необходима значительно меньшая его концентрация по сравнению с МКЦ. При емкости иммуносорбента на основе ПАЛ 70 мг белка антисыворотки на 1 г конечная концентрация суспензии иммуносорбента, обеспечивающая связывание не менее 90% $[^{125}\text{I}]$ антител, составляет всего 0.1 - 0.25%. Для иммуносорбента на основе МКЦ с емкостью 32 мг/г этот показатель равен 2.5 - 5%. Благодаря высокой антигенсвязывающей способности и большей емкости по иммобилизованному белку (рис. 4, таблица) иммуносорбент на основе ПАЛ требует в 10 раз меньших количеств антисыворотки на проведение одного анализа по сравнению с целлюлозным иммуносорбентом.

Сравнение параметров иммунорадиометрического анализа в оптимальных условиях с использованием целлюлозного и патексного иммуносорбентов, а также антител, иммобилизованных физической адсорбцией на поверхности полистирольных пробирок (рис. 5), демонстрирует как преимущества, так и недостатки ПАЛ. Преимущества заключаются в большем наклоне кривой “доза-эффект” и в устранении “хук-эффекта” во всем исследованном диапазоне концентраций антигена, что в свою очередь расширяет динамический диапазон анализа (несмотря на то что концентрация ПАЛ в пробе на порядок меньше, чем МКЦ).

Единственный выявленный нами недостаток анализа с использованием иммуносорбента на основе ПАЛ – это повышенные величины неспецифического связывания, что способно вызвать снижение аналитической чувствительности [20]. Для оценки негативного вклада повышенного неспецифического связывания латексного иммуносорбента мы использовали критерий чувствительности иммуноанализа, характеризуемый минимальной определяемой концентрацией антигена, C_{min} . Из полученных результатов (рис. 2, 3) видно, что увеличение наклона кривой “доза–эффект” – результат увеличения аффинности и концентрации антител, иммобилизованных на ПАЛ, что компенсирует отрицательное влияние высокого неспецифического связывания. Как следует из эмпирического уравнения, предложенного ранее [20], значение C_{min} прямо пропорционально значению неспецифического связывания и обратно пропорционально константе аффинности антител. В целях упрощения анализа C_{min} этот параметр определяли как концентрацию антигена, вызывающую двукратное превышение сигнала связанных [125 I]антител над фоном. Результаты показывают, что значения C_{min} для анализа на основе обоих иммуносорбентов близки и составляют для ферритина в данной иммунометрической системе 0.032 и 0.040 нг/мл (0.7×10^{-13} и 0.9×10^{-13} М) для латекса и целлюлозы соответственно. Таким образом, негативный вклад повышенного неспецифического связывания компенсируется высокой емкостью латексного иммуносорбента и увеличением аффинности иммобилизованных антител, что приводит в итоге к небольшому увеличению чувствительности иммуноанализа на основе ПАЛ.

Сравнение параметров иммунометрических систем на основе ПАЛ и полистирольных пробирок, содержащих адсорбционно иммобилизованные антитела, заслуживает специального рассмотрения (рис. 5). Считается, что процедура адсорбционной иммобилизации антител на полистироле наиболее “мягкая” и незначительно уменьшает константу связывания антигена с антителами [1, 2, 21]. В результате значительно меньшие количества антител позволяют достичь высокого уровня максимального сигнала, а низкий фоновый сигнал обеспечивает высокое значение показателя сигнал/шум, равное 94 (этот же параметр для полиакролеинового латекса равен 34). Однако сравнительно небольшое количество белка, адсорбированного на стенках полистирольных пробирок (максимально 300 – 500 нг на 1 см² поверхности), приводит, во-первых, к пологому начальному участку концентрационной кривой, в котором точное определение антигена невозможно, и, во-вторых, к выраженному “хук-эффекту”, что уменьшает динамический диапазон анализа.

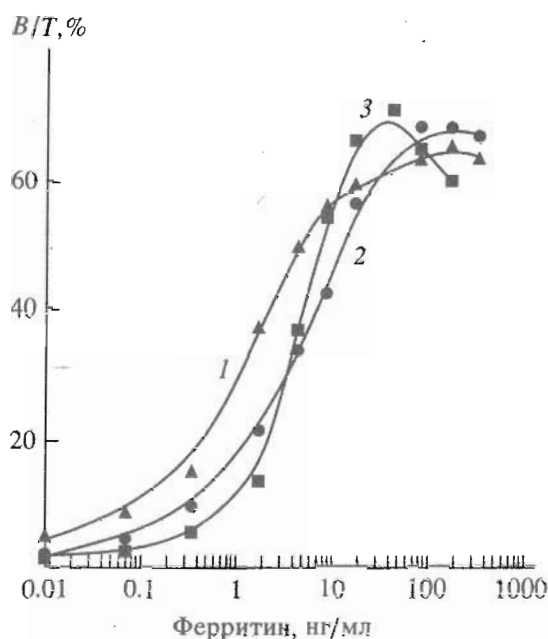


Рис. 5. Ход кривых “доза–эффект” в оптимизированном иммунорадиометрическом анализе ферритина с использованием антител, иммобилизованных на ПАЛ с емкостью 75 мг белка на 1 г носителя (1), на МКЦ с емкостью 32 мг/г (2), поверхности полистирольных пробирок с содержанием белка 380 нг на 1 см² (3). Обозначение оси ординат – как на рис. 2.

Суммируя полученные результаты, можно отметить, что мелкодисперсный иммуносорбент на основе ПАЛ обладает рядом преимуществ при создании иммуноаналитических систем по сравнению с широко используемыми иммуносорбентами на основе МКЦ и полистирольных поверхностей по параметрам аналитической чувствительности и проявлению “хук-эффекта”. Преимущества иммунорадиометрического анализа на основе ПАЛ в сравнении с МКЦ заключаются в простоте и удобстве иммобилизации антител без предварительной активации белка, которая необходима для целлюлозы, в значительно более высокой эффективности иммобилизации и константе аффинности иммобилизованных антител. По сравнению с иммуносорбентом на основе поверхностей полистирольных пробирок с адсорбированными антителами ПАЛ обеспечивает более высокую аналитическую чувствительность (т.е. снижение C_{min}) и широкий динамический диапазон анализа при отсутствии, вплоть до очень высоких концентраций антигена, “хук-эффекта”. Единственный недостаток иммунорадиометрического анализа на основе ПАЛ – относительно высокое неспецифическое связывание меченых антител. Однако этот недостаток не имеет критического значения в тех случаях, когда требуются прежде всего высокая концентрация и антигенсвязывающая активность иммобилизованных антител.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение селезеночного ферритина проводили по методу [22], включающему в себя стадии тепловой обработки тканевого экстракта, ионообменную и гель-хроматографию. Имунные сыворотки против человеческого селезеночного ферритина получали иммунизацией кроликов. Моноспецифические антитела к ферритину выделяли хроматографией сыворотки на имуносорбенте, содержащем ферритин, связанный с CNBr-активированной сефарозой 4В (Pharmacia, Швеция), используя элюцию кислым буфером (рН 2.3). Йодирование антител проводили так, как описано ранее [23], используя в качестве окислителя йодоген (Pierce, США). Модификацию ферритина реагентом Болтона-Хантера (Amersham, Англия), меченным йодом-125, проводили по методу [24].

Имуносорбент на основе МКЦ, содержащий 18 - 32 мг белка на 1 г сухого носителя, получали иммобилизацией антисыворотки к ферритину на окисленной NaIO_4 МКЦ (Chemapol, Чехия) [25]. Содержание ферритинспецифичных антител в сыворотке составляло 20 - 25% суммарного количества иммуноглобулина G, или примерно 3 - 4% общего белка сыворотки. Иммобилизацию ферритина на МКЦ проводили по методу [23].

Имуносорбент на основе ПАЛ. Суспензию латекса с диаметром частиц 0.8 - 1.0 мкм промывали дистиллированной водой до уменьшения оптического поглощения надосадочной жидкости $< 0.7 \text{ OE}_{280}$ в кювете с длиной оптического пути 1 см. Затем промывали 2 - 3 объемами 0.05 М натрий-фосфатного буфера, рН 7.4 (буфер А). Осадок ресуспендировали в том же буфере до концентрации латекса 10 - 30 мг/мл и при перемешивании добавляли отдиализованную против буфера А антисыворотку или раствор иммуноглобулина G в том же буфере. Инкубировали 1.5 - 2 ч при 20°C, отмывали от избытка белка и ресуспендировали в 1% растворе NaBH_4 в буфере А. После 3 ч инкубации при 4°C суспензию промывали буфером А. Количество связанного белка определяли по разнице между количеством белка, добавленного в реакционную смесь, и несвязавшимся белком. Иммобилизации подвергали антисыворотку; для определения эффективных констант ассоциации антител использован иммуноглобулин G кролика, выделенный стандартным методом фракционирования антисыворотки сульфатом аммония (33% насыщения) и иммобилизованный на ПАЛ либо МКЦ.

Имунорадиометрический анализ включал в себя следующие стадии: инкубацию ферритина в концентрациях 0.07 - 875 нг/мл в течение 3 ч при 20°C с моноспецифическими антителами, мечеными йодом-125 (8 - 12 нг антител на пробу с удельной активностью 3 - 5 Ки/г). Для отделения

образовавшихся иммунных комплексов в раствор вносили суспензию имуносорбента и инкубировали 2 ч при 20°C. После центрифугирования и двукратной промывки радиоактивность комплекса в осадке измеряли на автоматическом гамма-счетчике Riagamma (Wallac, Финляндия).

Для определения эффективных констант ассоциации иммобилизованных антител раствор [^{125}I]ферритина (удельная активность 0.8 Ки/г) в концентрациях 0.07 - 875 нг/мл инкубировали 3 ч при 20°C с имуносорбентом на основе ПАЛ или МКЦ. Образовавшиеся комплексы отделяли центрифугированием и после промывки измеряли радиоактивность в осадке на автоматическом гамма-счетчике. Эффективные константы ассоциации для двухцентровой модели взаимодействия рассчитывали из статистически достоверного количества экспериментальных данных, используя компьютерную программу, согласно которой приближенные параметры кривой связывания были оценены на первом этапе так, как описано ранее [26]. Затем параметры уточнялись и проверялись методом нелинейной минимизации для получения наиболее точного соответствия расчетных параметров и кривой связывания. Составление обеих программ и расчеты выполнены М.А. Родионовым (Институт биоорганической химии АН Беларуси, Минск).

Количество ферритинспецифичных антител в антисыворотке определяли имуноферментным анализом [27] с использованием иммобилизованного на МКЦ ферритина и антител к кроличьему иммуноглобулину G, конъюгированных с пероксидазой хрена. Пероксидазную активность регистрировали спектрофотометрически с использованием в качестве субстрата 2,2',5,5'-тетраметилбензидина при длине волны 655 нм.

Иммобилизация антител на полистирольных пробирках. 0.5 мл кроличьей антисыворотки к ферритину, разведенной буфером А в отношении 1 : 2000, помещали в стандартные полистирольные пробирки для радиоиммунанализа (12 × 75 мм, СЕА-Sorin, Франция) и инкубировали 3 ч при 20°C. Затем пробирки промывали 3 раза буфером А и блокировали остаток свободных центров адсорбции 1% раствором бычьего сывороточного альбумина в том же буфере.

Авторы выражают благодарность М.А. Родионову (Институт биоорганической химии АНБ, Минск) за расчеты констант ассоциации, выполненные по разработанным им программам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baker T.S., Abbot S.R., Daniel S.G., Wright J.F. // *Alternative Immunoassays* / Ed. Collins W.P. Chichester, New York: John Wiley & Sons, 1986. P. 59 - 77.

2. Nakamura R.M., Voller A., Bidwell D.E. // Handbook of Experimental Immunology. V. 1. Immunochemistry. / Ed. Weir D.M. Oxford; Blackwell Scientific Publication, 1984. P. 27.1 - 27.20.
3. Nakajima A., Hata Y. // Polymer. J. 1987. V. 19. № 3. P. 493 - 500.
4. Soos M., Taylor S.J., Gard T., Siddle K. // J. Immunol. Methods. 1984. V. 73. № 2. P. 237 - 249.
5. Young B.R., Pitt W.G., Cooper S.L. // J. Colloid and Interface Sci. 1988. V. 124. № 1. P. 28 - 43.
6. Perera P., Worwood M. // Ann. Clin. Biochem. 1984. V. 21. P. 393 - 397.
7. Rubin R.L., Hardtke M.A., Carr R.J. // J. Immunol. Methods. 1980. V. 33. № 3. P. 277 - 292.
8. Ryall R.G., Story C.J., Turner D.R. // Anal. Biochem. 1982. V. 127. № 2. P. 308 - 315.
9. Rodbard D., Foldman Y., Jaffe M.L., Miles L.E.M. // Immunochemistry. 1978. V. 15. № 1. P. 77 - 82.
10. Chang M., Richards G., Rembaum A. // Meth. Enzymol. 1985. V. 112. Part A. P. 150 - 164.
11. Pines M., Margel S. // J. Immunoassay. 1986. V. 7. № 1/2. P. 97 - 111.
12. Rembaum A., Yen R.C.K., Kempner D.H., Ugelstad J. // J. Immunol. Meth. 1982. V. 52. P. 341 - 351.
13. Лукин Ю.В., Бахарев В.Н., Заиченко А.С., Воронцов С.А., Зубов В.П., Грицкова И.А., Праведников А.Н. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 285. № 1. С. 159 - 161.
14. Павлова И.С., Лукин Ю.В., Коваленко В.А., Авдеев Д.Н., Кульшин В.А., Зубов В.П. // Биооргани. химия. 1994. Т. 20. № 7. P. 731 - 739.
15. Harrison P.M., Treffry A., Lilley T.H. // J. Inorg. Biochem. 1986. V. 27. P. 287 - 293.
16. Munro H.N., Linder M.C. // Physiol. Rev. 1978. V. 58. P. 317 - 397.
17. Lipshitz D.A., Cook J.D., Finch C.A. // New Engl. J. Med. 1974. V. 290. P. 1213 - 1220.
18. Fallas D.H. // New Z. J. Med. Lab. Technol. 1985. V. 39. № 1. P. 9 - 10.
19. Renevant M.C., Beadonnet A. // Clin. Chem. 1982. V. 28. P. 253 - 261.
20. Ekins R.P., Dakubu S. // Pure and Appl. Chem. 1985. V. 57. № 3. P. 473 - 482.
21. Рубцова М.Ю., Гаврилов У.М., Попова Н.Н., Сорокина Н.В., Егоров А.М. // Биотехнология. 1985. № 6. С. 125 - 131.
22. Crichton R.R., Millar J.A., Cumming L.C., Bryce C.F.A. // Biochem. J. 1973. V. 131. № 1. P. 51 - 59.
23. Жоров О.В., Кириллова Н.М., Марцев С.П. // Биохимия. 1991. Т. 56. № 5. С. 828 - 837.
24. Langone J.J. // Meth. Enzymol. 1980. V. 70. Part A. P. 221 - 247.
25. Flemming C., Gabert A., Roth R. // Acta. Biol. Med. Germ. 1973. V. 30. № 1. P. 177 - 182.
26. Klotz J.M., Huston D.L. // Biochemistry. 1971. V. 10. P. 3065 - 3069.
27. Эткин А.Ф., Кумарова Л.В., Левинц Г.М. // Иммунология. 1985. № 1. С. 74 - 76.

Polyacrolein Latex as a Solid-Phase Carrier for Radioimmunoassay: Comparison with Microcrystalline Cellulose and Polystyrene Test Tube Surface

O. V. Zhorov*, V. A. Preygerzon*, Yu. V. Lukin**, V. P. Zubov**, and S. P. Martsey*¹

*Institute of Bioorganic Chemistry, Belarussian Academy of Sciences, ul. Zhodinskaya 5/2, Minsk, 220141 Belarus'

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

Abstract – The immunosorbent obtained through a covalent immobilization of antibodies on a polyacrolein latex was studied in comparison with the sorbents based on microcrystalline cellulose and with the surface of polystyrene test tubes in a two-center radioimmunoassay for ferritin. It was shown that the polyacrolein latex provides a covalent binding of up to 75 mg protein per g dry polymer with an immobilization efficiency of 50 - 70% and a high effective association constant of immobilized antibodies ($K_a = 4.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$). The same parameters for the sorbent based on microcrystalline cellulose were 33 mg/g, 25 - 35%, and $4.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, respectively. In the radioimmunoassay for ferritin, the immunosorbents based on polyacrolein latex and cellulose ensured a nearly the same analytical sensitivity at the level of $(0.7 - 0.9) \times 10^{-13} \text{ M}$ ferritin and pointed to the possibility of eliminating the "hook-effect". Compared to the immunosorbent based on polystyrene test tubes, the advantages of the polyacrolein latex are the decrease in the minimum detectable concentration (increase in analytical sensitivity), the extension of the dynamical range of analysis, and the absence of the "hook-effect".

Key words: immunoassay; polyacrolein latex; immunosorbents; ferritin.

¹ To whom correspondence should be addressed.