

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНОГО *d*-БИОТИНА – СРАВНЕНИЕ ИНСТРУМЕНТАЛЬНОГО И НЕИНСТРУМЕНТАЛЬНОГО МЕТОДОВ АНАЛИЗА

© 1996 г. И. С. Павлова[#], И. А. Любавина, Ю. В. Лукин,
М. И. Цибульская, П. Н. Королев

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

*НПО "Витамины", 117842, Москва, ГСП-7, Научный проезд, 14А

Поступила в редакцию 19.05.95 г.

Разработаны простые методы определения свободного *d*-биотина на основе реакции ингибирования агглютинации латекса и конкурентного ИФА. В качестве биоспецифического маркера использовали биотинсвязывающий белок стрептавидин, который иммобилизовали на поверхности окрашенного полиакролеинового латекса или нитроцеллюлозной мембраны. Предел обнаружения свободного *d*-биотина в обоих методах составляет 1.0–3.0 нг/мл при общей продолжительности анализа 1.5 ч.

Ключевые слова: биотин, стрептавидин, полиакролеиновый латекс, ингибирование латексной агглютинации, конкурентный ИФА.

d-Биотин (витамин Н, далее – биотин) – водорастворимый витамин, один из факторов роста бактерий и млекопитающих, участвующий в биосинтезе жирных кислот и карбоксилировании белков. Биотин широко используется в сельском хозяйстве и здравоохранении в качестве пищевой добавки для ускорения роста животных, укрепления иммунитета, при лечении дерматитов, депрессий, в профилактике атеросклероза и гипертонической болезни человека [1–3].

Традиционные методы определения биотина – микробиологический [1], радиоизотопный [4] и ВЭЖХ [5, 6] – достаточно длительны (от 4 ч до 1 сут), сложны и требуют использования дорогостоящего оборудования. В то же время для контроля содержания биотина в кормовых добавках и витаминных препаратах необходим простой и быстрый метод, позволяющий проводить анализ в нелабораторных условиях. В настоящей работе представлены простые методы определения свободного биотина, основанные на ингибировании агглютинации дисперсных частиц и конкурент-

ном ИФА. В обоих методах в качестве биоспецифического маркера используется стрептавидин (Str) [7], образующий прочный нековалентный комплекс с биотином ($K_D = 10^{-15}$ М).

Реакция ингибирования агглютинации латекса (РИАЛ), успешно применяемая в отдельных случаях для анализа гаптен [8–10], основана на ингибировании свободным гаптенном агглютинации латексных частиц, сенсibilизированных специфическими антителами, в присутствии поливалентного конъюгата того же гаптена с белком-носителем. В данной работе в качестве твердой фазы был использован окрашенный полиакролеиновый латекс (PAL) с диаметром частиц 1.8 мкм, оптимальный для постановки реакции агглютинации в микропланшете [9, 11]. Высокая плотность полимера и относительно крупные частицы обеспечивают быструю седиментацию PAL в лунках, что позволяет проводить анализ в течение 1.5 ч. Окрашенные PAL, сенсibilизированные специфическими антителами, были успешно применены нами ранее при определении 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты [9] и группоспецифического полисахарида *Streptococcus pyogenes* (стрептококк группы А) [11].

В настоящей работе для определения биотина PAL сенсibilизировали стрептавидином. В качестве поливалентного конъюгата, вызывающего агглютинацию сенсibilизированного PAL, использовали полибиотин (биотинилированные

Сокращения: BSA – бычий сывороточный альбумин; OV – овальбумин; Str – стрептавидин; HRP – пероксидаза хрена; PBS – фосфатно-солевой раствор, pH 7.4; PBST – PBS, содержащий 0.05% Твин 20; PBS(T)/BSA – PBS(T), содержащий BSA (2 мг/мл); PBS(T)/OV – PBS(T), содержащий овальбумин (1 мг/мл); PAL – полиакролеиновый латекс; РАЛ – реакция агглютинации латекса; РИАЛ – реакция ингибирования агглютинации латекса.

[#] Автор для переписки.

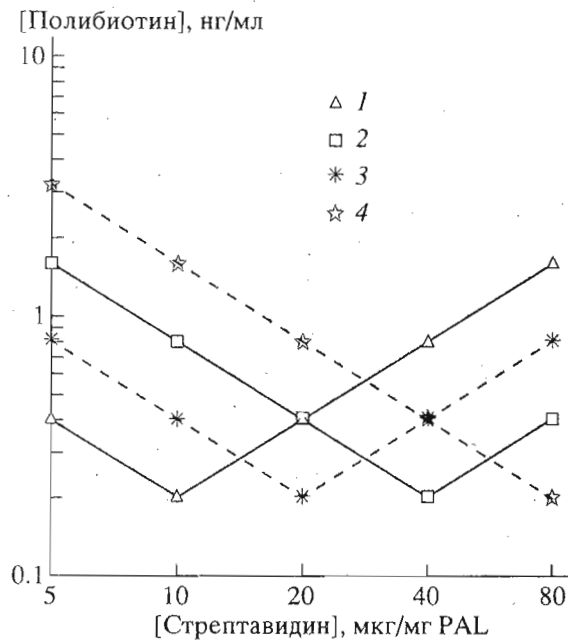


Рис. 1. Зависимость предела обнаружения полибиотина от условий иммобилизации стрептавидина на PAL. Условия иммобилизации – боратный буфер, pH 7.4 (1, 2) и 8.4 (3, 4), с добавлением 2.5 мМ аскорбата натрия (1, 3).

иммуноглобулины кролика, содержащие 10–12 остатков биотина на молекулу иммуноглобулина). При смешивании сенсibilизированной стрептавидином суспензии латекса с полибиотином наблюдается агглютинация латексных частиц. Добавление свободного биотина приводит к конкуренции гаптена и полибиотина за связывающие центры стрептавидина и ингибированию реакции агглютинации, причем степень ингибирования зависит от концентрации биотина в растворе.

Иммобилизацию стрептавидина на PAL проводили в одну стадию путем ковалентного связывания первичных аминогрупп белка и альдегидных групп латекса. На первом этапе определяли условия конъюгации – pH раствора и концентрацию аскорбата натрия, селективного восстановителя оснований Шиффа [12, 13] (рис. 1). Активность конъюгатов PAL–Str с нагрузкой стрептавидина 5–80 мкг/мг PAL определяли в реакции агглютинации (PAL) с полибиотином в диапазоне концентраций 0.1–20.0 нг/мл. Как следует из рис. 1, варьируя условия конъюгации, можно существенно уменьшить нагрузку стрептавидина – 10 мкг/мг PAL при pH 7.4 в присутствии 2.5 мМ аскорбата натрия (оптимальные условия) по сравнению с 80 мкг/мг PAL при pH 8.4 без аскорбата натрия [9]. Экстремальный характер зависимости минимальной определяемой концентрации полибиотина от сенсibilизирующей дозы стрептавидина, по-видимому, связан с существованием области эквивалентности между числом биотинсвязыва-

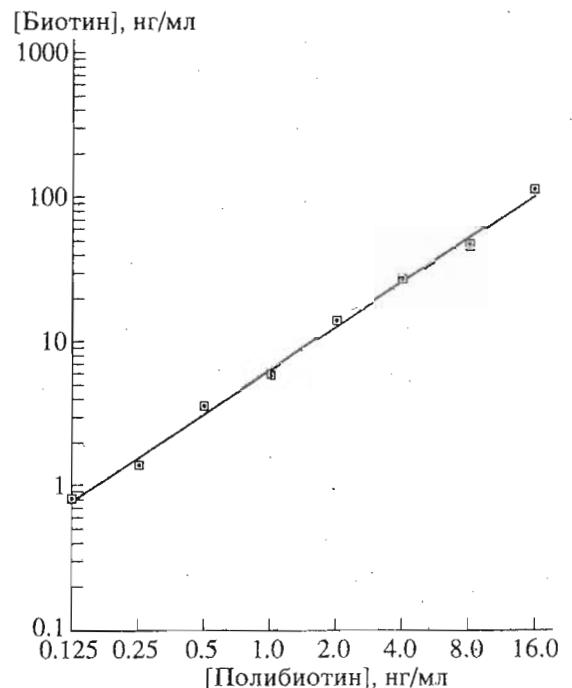


Рис. 2. Определение свободного биотина с помощью РИАЛ. Зависимость предела обнаружения биотина от концентрации полибиотина.

ющих центров стрептавидина и числом молекул биотина в составе полибиотинилированной матрицы. Конъюгаты PAL–Str с нагрузкой 10 мкг/мг были использованы для определения свободного биотина методом РИАЛ.

Для определения диапазона концентраций, в котором возможен количественный анализ биотина с помощью РИАЛ, использовали метод двойного титрования компонентов реакции (рис. 2). Для этого в вертикальных рядах планшеты готовили серию двукратных разведений полибиотина, начиная с концентрации 20 нг/мл, а в горизонтальных рядах – серию двукратных разведений биотина от 200 нг/мл. Далее добавляли конъюгат PAL–Str и после формирования агглютинационной картины учитывали реакцию по последней лунке, в которой прошло ингибирование агглютинации. Как видно из рис. 2, минимальная определяемая концентрация биотина составляет примерно 1.0 нг/мл, при этом чувствительность РИАЛ можно плавно регулировать в диапазоне 1.0–100.0 нг/мл биотина, варьируя концентрацию полибиотина. Такая же чувствительность была получена ранее при определении 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты [9] и теофиллина [10] с использованием полиакролеиновых и карбоксиллированных полистирольных латексов и поливалентного антигена на основе овальбумина и BSA или гемоцианина.

Определение концентрации биотина в пробах состояло в параллельном титровании раствора биотина с известной концентрацией (стандарт) и

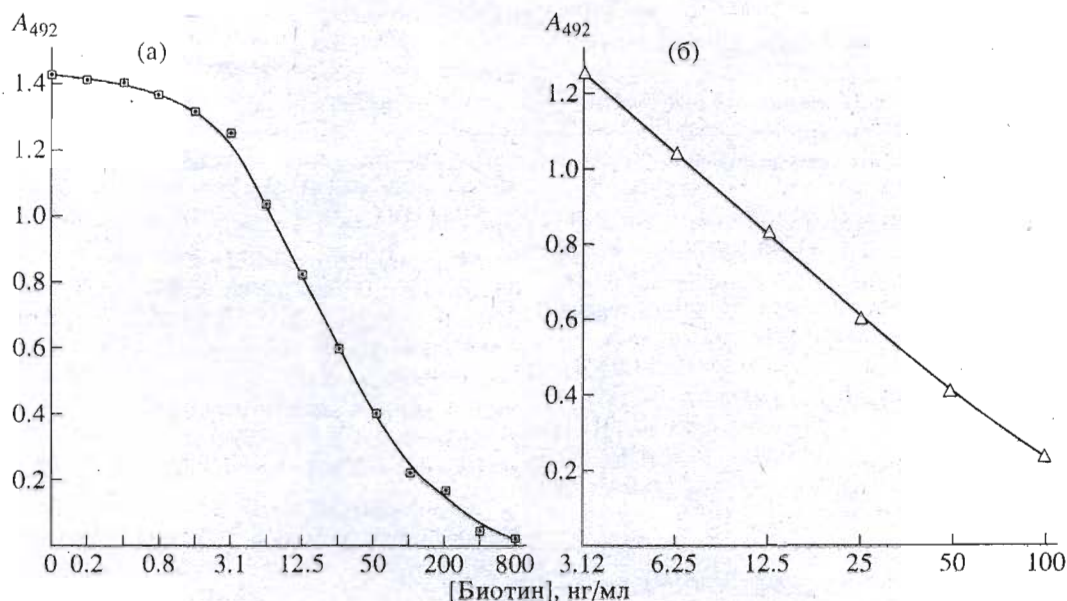


Рис. 3. Определение свободного биотина с помощью конкурентного ИФА. Зависимость оптического поглощения при 492 нм от концентрации биотина в широком (а) и узком (б) диапазоне концентрации.

анализируемого образца. Концентрацию биотина в анализируемом образце (*B*) рассчитывали по формуле

$$B = A2^{m-n}$$

где *A* – концентрация биотина в стандартном препарате, *m* и *n* – номер последней лунки, где произошло ингибирование агглютинации, для стандарта и образца соответственно.

Для более точного определения свободного биотина был выбран принцип конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА), где в качестве твердой фазы была использована нитроцеллюлозная мембрана с иммобилизованным стрептавидином. Сенсибилизированную мембрану последовательно помещали в раствор полибиотина, а затем в раствор конъюгата стрептавидин–пероксидаза (Str-HRP). Свободный биотин, добавленный в систему, конкурирует с полибиотином за центры связывания иммобилизованного стрептавидина, уменьшая количество связавшегося с мембраной полибиотина и снижая тем самым сигнал продукта пероксидазной реакции.

В предварительных опытах были определены условия проведения анализа, обеспечивающие максимальное соотношение сигнал/фон. Оптимальные концентрации иммобилизованного стрептавидина, полибиотина и конъюгата Str-HRP составили соответственно 10 мкг/мл, 200 и 50 нг/мл. Зависимость оптического поглощения при 492 нм от концентрации свободного биотина приведена на рис. 3. В диапазоне концентраций биотина 3–100 нг/мл она близка к линейной. Использование в качестве твердой фазы нитроцеллюлозы позволя-

ет проводить анализ в малооборудованных лабораториях с применением обычного спектрофотометра. При необходимости анализ можно легко адаптировать для 96-луночных иммунологических планшет. Этот формат позволяет анализировать одновременно большее число образцов, однако для регистрации сигнала требуется многоканальный спектрофотометр.

Для оценки разработанных методов мы провели определение общего биотина в нескольких образцах мочи и автолизата пекарских дрожжей с помощью РИАЛ, конкурентного ИФА и микробиологического метода [1] (таблица). Предварительно образцы гидролизовали 6 н. H₂SO₄ [1]. Данные таблицы подтверждают хорошую корреляцию между результатами измерений содержания общего биотина, полученными с помощью всех

Определение общего биотина в моче и автолизате пекарских дрожжей различными методами

Образец	РИАЛ	ИФА	Микробиологический метод
Биотин, нг/мл			
Моча			
1	40	40	42
2	20	30	28
3	5	6.5	6.6
4	5	4.5	4.4
Биотин, мкг/г			
Дрожжи			
1	0.40	0.40	0.39
2	0.20	0.30	0.32
3	0.20	0.30	0.29

грех использованных методов. Применение биоинсвязывающего белка стрептавидина в качестве биоспецифического маркера биотина обеспечивает высокую специфичность анализа, позволяющую с большой точностью определять биотин в присутствии естественных компонентов кормовых добавок – витаминов D₃, E, B₁, B₂, B₆, B₁₂, никотиновой, фолиевой и аскорбиновой кислот. К преимуществам РИАЛ и ИФА относится доступность и простота разработанных методов, позволяющих проводить анализ в нескольких пробах в течение 1.5 ч без использования сложного дорогостоящего оборудования в нелабораторных условиях. Предложенные методы РИАЛ и ИФА могут представлять практический интерес при экспресс-мониторинге биотина в кормовых добавках, витаминных препаратах, а также в практическом здравоохранении.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

PAL получали полимеризацией акролеина (Fluka, ФРГ) по методике [11]. Средний диаметр частиц PAL измеряли с помощью автоматического анализатора субмикронных частиц Coulter N4-MD (Coultronics, Франция).

Сенсибилизацию PAL проводили по методу [11] с некоторыми модификациями. К 1 мл 0.5% PAL в боратном буфере, pH 7.4 или 8.4, добавляли 5–100 мкг стрептавидина в том же буфере, инкубировали при постоянном перемешивании 2 ч при комнатной температуре и отмывали 3 раза тем же буфером с помощью центрифугирования (3000 об/мин, 5 мин). Далее PAL суспендировали в 0.5 мл PBS/OV и инкубировали в том же режиме. Аналогично сенсибилизацию проводили в тех же буферных растворах, но содержащих 2.5 мМ аскорбат натрия [12, 13]. Конъюгаты PAL–Str хранили при 4°C.

Биотинилирование иммуноглобулинов. К предварительно отдиализованным против 0.1 М бикарбонатного буфера, pH 8.6, растворам иммуноглобулинов кролика (2.0–3.0 мг/мл) добавляли 0.1 объема свежеприготовленного раствора N-оксисукцинимидного эфира аминокaproилбиотина (Sigma, США) в DMSO (1.0 мг/мл), инкубировали 2 ч при комнатной температуре и диализовали против PBS в течение ночи при 4°C.

Конъюгат стрептавидина с пероксидазой получали по методу [14] с некоторыми модификациями. Пероксидазу хрена (Центр агротехники, Львов, R_z = 3.0) 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 в течение ночи против 1 мМ натрий-ацетатного буфера, pH 4.5, при 4°C. pH раствора доводили 1.0 М карбонат-бикарбонатным буфером до значения 9.4, добавляли раствор

стрептавидина в 0.1 М карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9.4, и инкубировали в темноте 3 ч при комнатной температуре. Соотношение пероксидаза–стрептавидин составляло 3 : 1 по весу. Добавляли 0.1 объема свежеприготовленного раствора боргидрида натрия (4.0 мг/мл) в 10 мМ NaOH, инкубировали 2 ч при 4°C и диализовали против PBS при 4°C в течение ночи.

Определение общего биотина. К 1 г пекарских дрожжей добавляли 10 мл 6 н. H₂SO₄ и автоклавировали 1 ч при 1 атм. Гидролизат нейтрализовали 6 н. NaOH до pH 6.5, доводили объем до 25 мл водой и фильтровали. При определении общего биотина в моче к 1 мл мочи добавляли 1 мл 6 н. H₂SO₄, гидролиз и нейтрализацию образца проводили аналогично. Объем образца доводили до 5 мл.

Микробиологическое определение биотина проводили с использованием в качестве тест-микроорганизма *Lactobacillus plantarum*, штамм ВКМВ-578 [1]. Тест-культуру выращивали в течение 1 сут в жидкой среде при 37°C, центрифугировали, надосадочную жидкость сливали и суспендировали 0.2–0.5 мл клеток в 15 мл физиологического раствора. Готовили серию двукратных разведений биотина (стандартный и анализируемый образцы) в воде, смешивали равные объемы (1 мл) образца и среды для определения биотина (Vitamin biotin assay broth No 11989, Merck), стерилизовали 10 мин при 1 атм и добавляли каплю тест-культуры. Образцы инкубировали 18–20 ч при 37°C и определяли мутность суспензии по поглощению при 600 нм на спектрофотометре Ultrospec (LKB, Швеция). Концентрацию биотина определяли по калибровочной кривой с использованием стандартного раствора биотина. Все пробы ставили в двух повторах. Каждый анализ проводили трижды.

PAL проводили в U-образных 96-луночных планшетах для микротитрования Titertek (Flow, США). В лунки разливали по 25 мкл PBS/OV, далее готовили серию 2-кратных разведений полибиотина (20–0.05 нг/мл), добавляли равный объем 0.2% конъюгата PAL–Str в PBS/OV, встряхивали вручную и оставляли при комнатной температуре до образования четкой агглютинационной картины (около 1.5 ч). Результат оценивали визуально. Отрицательной реакцией считается в том случае, когда частицы латексного конъюгата оседают на дне лунки в виде компактной “пуговки”. При положительной реакции латексные частицы после осаждения должны покрывать не менее 1/3 поверхности лунки в виде перевернутого “зонтика”. Отрицательный контроль ставили в отсутствие полибиотина с PBS/OV. Каждый анализ проводили трижды.

При постановке РИАЛ в лунки планшеты разливали по 25 мкл PBS/OV, содержащего полибиотин в концентрации 0.1–20 нг/мл, готовили серию

2-кратных разведений биотина и добавляли равный объем конъюгата PAL-Str. Результат оценивали визуально по обратной схеме (положительная реакция – “пюговка”, отрицательная – “зонтик”). Для контроля ставили РИАЛ с PBS/OV, содержащим полибиотин, и PBS/OV. Каждый анализ проводили трижды.

ИФА проводили в 24-луночных планшетах для культивирования клеток Linbro (Flow, США) при комнатной температуре. Нитроцеллюлозные фильтры (диаметр пор 0.45 мкм, Schleicher und Schüll, ФРГ) в виде кружков диаметром 0.8 см помещали в 0.5 мл раствора стрептавидина (10 мкг/мл) в PBS и инкубировали при качании 30 мин при комнатной температуре.

Нитроцеллюлозу отмывали 5 раз PBS, блокировали 30 мин PBS/BSA при той же температуре, отмывали еще раз PBS, высушивали на воздухе и хранили при 4°C в герметично закрытой упаковке. Для получения калибровочной кривой в лунках планшета готовили серии 2-кратных разведений биотина в PBST/BSA, содержащем 200 нг/мл полибиотина. Для контролей использовали PBST/BSA, содержащий только полибиотин, и PBST/BSA (фон). Пробы объемом 500 мкл ставили в двух повторях. В каждую лунку вносили нитроцеллюлозу с иммобилизованным стрептавидином, инкубировали 30 мин при качании и отмывали 5 раз PBST. Затем добавляли 0.5 мл стрептавидин-пероксидазы (50 нг/мл) в PBST/BSA, инкубировали 30 мин при качании и отмывали 5 раз PBST. Добавляли 1 мл 50 мМ фосфат-цитратного буфера, pH 5.0, содержащего 0.02% H₂O₂ и 0.4 мг/мл орто-фенилендиамина (Serva, ФРГ), инкубировали 15 мин при качании в темноте и добавляли 1 мл 1.7 н. H₂SO₄. Измеряли оптическое поглощение при 492 нм на спектрофотометре Ultrospec (LKB, Швеция), вычисляли среднее значение, из которого вычитали

среднее значение “фона”, и строили калибровочную кривую.

Для определения концентрации биотина в анализируемых образцах готовили серию 2-кратных разведений образца, проводили анализ как описано выше и с учетом разведения вычисляли концентрацию в исходном образце. Каждый анализ проводили трижды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Экспериментальная витаминология (справочное руководство) / Ред. Ю.М. Островский. Минск: Наука и техника, 1979.
2. Mock D.M. // *Contemp. Issue Clin. Nutr.* 1992. V. 15. P. 211–222.
3. Gaudry M., Ploux O. // *Chromatogr. Sci.* 1992. V. 60. P. 441–467.
4. Hood R.L., Beales C.R. // *CSIRO Food Res. Quart.* 1988. V. 48. P. 3–4.
5. Przyjazny A., Ljellstrom Th.L., Bachas L.G. // *Anal. Chem.* 1990. V. 62. P. 2469–2483.
6. Iokyo T., Kinoshita T.J. // *J. Chromatogr.* 1991. V. 542. P. 365–372.
7. Green M. // *Meth. Enzymol.* 1990. V. 184. P. 51–67.
8. Craine J.E. // *Amer. Biotechnol. Lab.* 1987. V. 15. P. 34–41.
9. Lukin Yu.V., Dokuchaev I.M., Polyak I.M., Eremin S.A. // *Anal. Lett.* 1994. V. 27. P. 2973–2982.
10. Poncelet S.M., Limet J.N., Noel J.P., Kayaert M.C., Gialanti L., Collet-Cassart D. // *J. Immunol.* 1990. V. 11. P. 77–88.
11. Павлова И.С., Лукин Ю.В., Коваленко В.А., Авдеев Д.Н., Кульшин В.А., Зубов В.П. // *Биоорганическая химия.* 1994. Т. 20. С. 731–739.
12. Tuma D.J., Donohue T.M., Medina V.A., Jr., Sorrel M.F. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1984. V. 234. P. 377–381.
13. Hornsey V.S., Prowse C.V., Pepper D.S. // *J. Immunol. Meth.* 1986. V. 3. P. 83–88.
14. Tijssen P., Kurstak E. // *Anal. Biochem.* 1984. V. 136. P. 451–457.

Assay of Free *d*-Biotin: Comparison of Instrumental and Noninstrumental Methods

I. S. Pavlova,¹ I. A. Lyubavina, Yu. V. Lukin, M. I. Tsibul'skaya, and P. N. Korolev

Vitamins Research and Production Association, Nauchnyi proezd 14A, Moscow, 117842 Russia

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,

ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia

Abstract—Simple methods for determining free *d*-biotin were developed based on the latex agglutination reaction inhibition and competitive ELISA. Biotin-binding protein Str used as a biospecific marker was immobilized on the surface of colored polyacrolein latex particles or a nitrocellulose membrane. The sensitivity of both methods of the free *d*-biotin assay, which take 1.5 h, is 1.0–3.0 ng/ml.

Key words: biotin, Str, polyacrolein latex, latex agglutination reaction inhibition, competitive ELISA.

¹ To whom correspondence should be addressed.