



УДК 579.862.1'114.083

ОПРЕДЕЛЕНИЕ 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ И БИОТИН-СТРЕПТАВИДИНОВОЙ СИСТЕМЫ ДЕТЕКЦИИ

© 1996 г. И. С. Павлова[#], И. А. Любавина, Ю. В. ЛукинИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 03.10.95 г.

На основе иммунофильтрационного дот-анализа и конкурентного ИФА разработаны простые методы определения 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты при детекции биотинилированными моноклональными антителами к ней в комбинации с высокоактивным конъюгатом стрептавидин-пероксидаза. Предел обнаружения 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты для иммунофильтрации и ИФА составляет 2–3 нг/мл при общей продолжительности анализа 5 мин и 1.5 ч соответственно.

Ключевые слова: 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, моноклональные антитела, иммунофильтрация, конкурентный ИФА.

В последнее время в целях охраны окружающей среды все большее внимание уделяется контролю за загрязнением воды, почвы, продуктов питания различными гербицидами. Однако применяемые в настоящее время для этих целей методы газовой или жидкостной [1] хроматографии, радиоиммуноанализа [2], поляризационного флуороиммуноанализа [3] достаточно сложны, длительны и требуют использования дорогостоящего оборудования и специально обученного персонала.

Данная работа посвящена разработке простых методов определения одного из наиболее часто встречаемых гербицидов класса арилоксиалкилкарбоновых кислот – 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-D). В качестве биоспецифических реагентов были использованы биотинилированные моноклональные антитела (Bi-Mab) к 2,4-D и высокоактивный конъюгат стрептавидин-пероксидаза (Str-HRP).

Для быстрого полуколичественного определения 2,4-D был выбран принцип иммунофильтрационного дот-анализа. По сравнению с традиционным дот-анализом режим иммунофильтрации

позволяет сократить процедуру анализа до 5 мин без существенного снижения чувствительности [4, 5]. Для проведения анализа поливалентный антиген 2,4-D-OV (конъюгат 1 молекулы овальбумина с 10–12 молекулами 2,4-D) иммобилизовали на нитроцеллюлозной мембране, которую затем помещали в специальную микрофильтрационную ячейку. Далее сквозь мембрану последовательно пропускали растворы Bi-Mab, Str-HRP и субстрата HRP. На поверхности мембраны в области нанесения антигена появлялось ярко-синее пятно. При добавлении в систему образца, содержащего 2,4-D, свободный и иммобилизованный на полимерном носителе 2,4-D конкурируют за центры связывания антител, что приводит к ингибированию реакции (окрашенное пятно не образуется).

На первом этапе были установлены условия проведения анализа, обеспечивающие максимальную чувствительность определения 2,4-D. Оптимальные концентрации 2,4-D-OV, Bi-Mab и Str-HRP составили соответственно 1000, 8 и 2 мкг/мл. В указанных условиях полное ингибирование реакции наблюдалось при концентрации 2,4-D, равной или выше 2 нг/мл (рис. 1). Дополнительная преинкубация Bi-Mab и 2,4-D в течение 5 и 15 мин непосредственно перед стадией фильтрации через мембрану не повышала чувствительность анализа.

Для количественного определения 2,4-D был использован принцип конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА). Схема постановки аналогична предложенной для иммунофильтрационного анализа. Определение 2,4-D основано

Сокращения: 2,4-D – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, 2-CPA и 4-CPA – 2- и 4-хлорфеноксиуксусная кислота; OV – овальбумин; 2,4-D-OV – поливалентный конъюгат 2,4-D с овальбумином; Str – стрептавидин; HRP – пероксидаза хрена; Mab – моноклональные антитела; Bi-Mab – биотинилированные моноклональные антитела; PBS – фосфатно-солевой раствор, pH 7.4; PBST – PBS, содержащий 0.05% Твин 20; PBS(T)/OV – PBS(T), содержащий овальбумин (2 мг/мл).

[#] Автор для переписки.

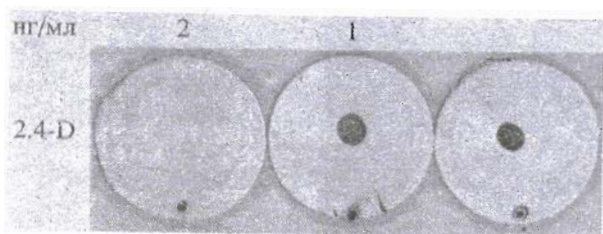


Рис. 1. Определение 2,4-D методом иммунофльтрации.

на конкуренции иммобилизованного на планшете и свободного 2,4-D, содержащегося в образце, за центры связывания антител, приводящей к уменьшению количества связавшегося конъюгата стрептавидин–пероксидаза и снижению сигнала продукта пероксидазной реакции.

На первом этапе были определены условия проведения анализа, обеспечивающие оптимальное соотношение сигнал/фон. Как следует из рис. 2, варьирование параметров реакции приводит к уменьшению угла наклона и сдвигу кривой относительно оси абсцисс, что позволяет увеличить область линейности (3–50 по сравнению с 50–200 нг/мл) и существенно снизить предел обнаружения 2,4-D (3 по сравнению с 50 нг/мл). Оптимальные концентрации 2,4-D-OV, Bi-Mab и Str-HRP составили соответственно 1, 4 и 1 мкг/мл. Калибровочная кривая для определения 2,4-D в этих условиях приведена на рис. 3.

Для определения специфичности разработанных тестов были исследованы перекрестные ре-

акции с некоторыми структурно родственными 2,4-D соединениями (таблица). Полученные данные позволяют сделать вывод о высокой специфичности предложенных методов.

Представленные в настоящей работе методы определения 2,4-D характеризуются также высокой чувствительностью. С помощью иммунофльтрации в течение 5 мин можно детектировать до 2 нг/мл 2,4-D. К преимуществам этого метода относятся доступность и простота, обеспечивающие возможность проведения анализа в нелабораторных условиях. При необходимости метод можно легко адаптировать для одновременного определения двух–четырёх соединений, для чего на мембране достаточно иммобилизовать несколько разных антигенов и использовать набор соответствующих антител. Конкурентный ИФА в течение 1.5 ч позволяет количественно определять 2,4-D в диапазоне 3–50 нг/мл. В отличие от иммунофльтрации ИФА сложнее в постановке, поскольку проводится в несколько стадий, а для регистрации сигнала используется спектрофотометр.

Оба разработанных метода имеют определенные преимущества по сравнению с ранее предложенными. Так, неинструментальный метод, основанный на ингибировании агглютинации полимерных дисперсий [3], позволяет полуколичественно определять до 0.6 нг/мл 2,4-D, однако анализ оказывается достаточно продолжительным (1.5 ч). С помощью поляризационного флуориметрического анализа [3] можно в течение 7 мин количественно проанализировать 10 образцов, однако

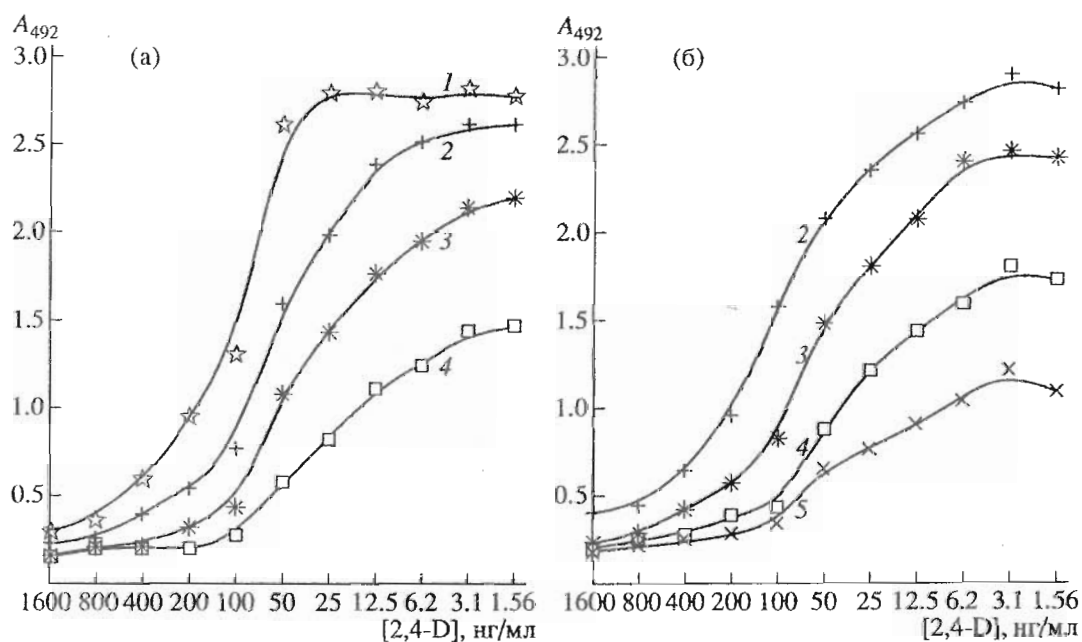


Рис. 2. Оптимизация условий конкурентного ИФА для определения 2,4-D. Концентрация Bi-Mab (мкг/мл): а – 4, б – 8. Концентрация 2,4-D-OV при сенсibilизации: 8 (1), 4 (2), 2 (3), 1 (4), 0.5 (5) нг/мл. [Str-HRP] – 1 мкг/мл.

предел обнаружения 2,4-D составляет только 100 нг/мл. К тому же для проведения этого анализа необходим поляризационный флуориметр – прибор, которым оснащено незначительное число лабораторий.

Разработанные методы могут представлять практический интерес при экспресс-мониторинге 2,4-D в питьевой воде, продуктах питания, контроле загрязнений почвы и водоемов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы 2,4-D, 2-CPA и 4-CPA (Sigma, США). Моноклональные антитела против 2,4-D (клон 4/E2/G2) и поливалентный конъюгат, полученный по методу [6], были любезно предоставлены С.А. Ереминым (МГУ, химический факультет).

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

Конъюгат стрептавидина с пероксидазой получали по методу [7] с некоторыми модификациями. Пероксидазу хрена (Центр агротехники, Львов, $R_2 = 3.0$) 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 0.1 М боратного буфера, pH 9.0, при 4°C. Добавляли стрептавидин (Sigma, США), предварительно отдиализованный против того же буфера, 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 mM NaOH), инкубировали 2 ч при 4°C и диализовали ночь против PBS при 4°C.

Определение 2,4-D методом иммунофильтрации. На поверхность нитроцеллюлозных фильтров (Schleicher und Schüll, ФРГ) с $d_{\text{пор}} 0.45$ мкм наносили 2 мкл 2,4-D-OV (1 мг/мл в воде), высушивали на воздухе и блокировали с помощью PBS/OV 30 мин при комнатной температуре. Фильтры снова высушивали на воздухе и хранили при 4°C в герметично закрытой упаковке. Для проведения анализа фильтры помещали в специальную микрофильтрационную 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

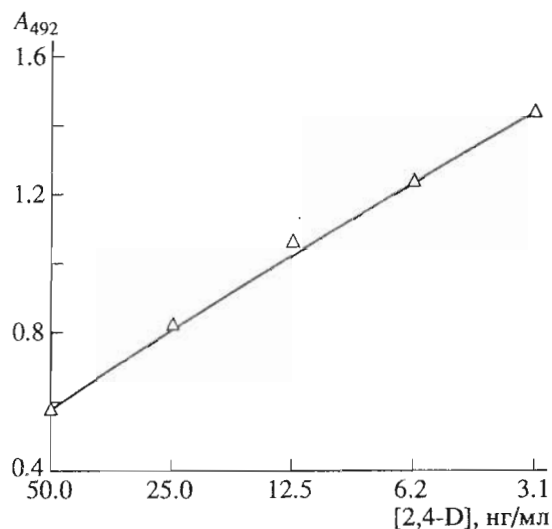


Рис. 3. Калибровочная кривая для определения 2,4-D методом конкурентного ИФА.

через мембрану за счет впитывания жидкости в адсорбент. Далее через мембрану с нанесенным поливалентным антигеном последовательно пропускали по 300 мкл следующих реагентов: PBST/OV; анализируемый образец (2,4-D или структурно родственные соединения) в PBST/OV, содержащий 8 мкг/мл Bi-Mab; 2.0 мкг/мл Str-HRP в PBST/OV; 50 mM имидазольный буфер, pH 7.5, содержащий 2.0 мг/мл 1,4-хлорнафтола и 0.02% H₂O₂ с добавлением 0.2 мг/мл N,N'-диметил-*n*-фенилендиамина и 0.1 мг/мл бисульфита натрия для повышения чувствительности реакции [8] и PBST. Время фильтрации составляло около 1 мин. При отрицательной реакции в области нанесения антигена появлялось синее пятно, при положительной пятно отсутствовало. Каждый анализ проводили трижды.

Определение 2,4-D методом конкурентного ИФА. В лунки планшеты DynaTech MicroELISA (DynaTech, ФРГ) вносили 100 мкл 2,4-D-OV (1–2 мкг/мл в 0.1 М NaHCO₃, pH 9.4) и инкубировали ночь при 4°C. Планшеты трижды промывали PBST и блокировали с помощью PBST/OV 30 мин

Определение 2,4-D и структурно родственных соединений различными методами

Соединение	Предел обнаружения, нг/мл	
	Имунофильтрация	ИФА
2,4-D	2	3
2-CPA	2500	5000
4-CPA	1250	2500

при 37°C. Далее готовили серию двукратных разведений 2,4-D или структурно родственных соединений в PBST/OV, добавляли Vi-Mab (4–8 мкг/мл в PBST/OV) и инкубировали 30 мин при 37°C. Планшеты 5 раз промывали PBST, добавляли Str-HRP (1.0 мкг/мл в PBST/OV) и инкубировали в том же режиме. Планшеты 5 раз промывали PBST. 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 *o*-фенилендиамина (Serva, ФРГ), инкубировали 5–10 мин в темноте и останавливали ферментативную реакцию добавлением 50 мкл 1.7 н. H₂SO₄. Измеряли оптическое поглощение при 492 нм на многоканальном спектрофотометре Multiscan (Titertek). Каждый анализ проводили трижды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smith A.E., Hayden B.J. // J. Chromatogr. 1979. V. 171. P. 482–495.
2. Ringer D.F., Fleeker J.R. // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1981. V. 26. P. 375–389.
3. Lukin Yu.V., Dokuchaev I.M., Polyak I.M., Eremin S.A. // Anal. Lett. 1994. V. 27. P. 2973–2982.
4. Новые методы иммуноанализа / Ред. А.М. Егоров. М.: Мир, 1991.
5. Павлова И.С., Лукин Ю.В., Коваленко В.А., Авдеев Д.Н., Кульшин В.А., Зубов В.П. // Биоорганич. химия. 1994. Т. 20. С. 731–739.
6. Еремин С.А., Лунская И.М., Егоров А.М. // Биоорганич. химия. 1993. Т. 19. С. 836–843.
7. Tijssen P., Kurstak E. // Anal. Biochem. 1984. V. 136. P. 451–457.
8. Kobayashi R., Tashima Y. // Anal. Biochem. 1989. V. 183. P. 9–12.

Determination of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Using Monoclonal Antibodies and Biotin–Streptavidin Detection System

I. S. Pavlova,¹ I. A. Lyubavina, and Yu. V. Lukin

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

Abstract—Simple methods to determine 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) using biotinylated monoclonal antibodies in combination with a highly active streptavidin–peroxidase conjugate were developed on the basis of the immunofiltration dot assay and competitive enzyme immunoassay (EIA). The detection limit of 2,4-D acid for immunofiltration and EIA was 2–3 ng/ml, the total assay duration being 5 min and 1.5 h, respectively.

Key words: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, monoclonal antibodies, immunofiltration, competitive EIA.

¹ To whom correspondence should be addressed.