

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ НЕИОННЫХ ПОВЕРХНОСТНО АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ВОДЕ

Н. Ф. СТАРОДУБ¹, Н. В. ПИВЕНЬ², А. В. ДЕМЧЕНКО¹, А. В. ГОНЧАРИК², Е. Е. ОРЛОВА²,
А. И. БУРАКОВСКИЙ², А. А. МАРТЬЯНОВ³, А. В. ЖЕРДЕВ³, Б. Б. ДЗАНТИЕВ³

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск;

³Институт биохимии им. А. Н. Баха АН России, Москва;

e-mail: starodub@biochem.kiev.ua

Розроблено основні етапи високочутливого, специфічного визначення нонілфенолу за допомогою імуноферментного аналізу. Детально описано приготування кон'югатів нонілфенолу із білками, одержання антисироваток, виділення тотальної фракції імуноглобулінів, вивчення специфічності одержаних препаратів антитіл. Показано, що за специфічністю і здатністю до зв'язування з кон'югованим антигеном антисироватки і тотальні фракції імуноглобулінів не розрізняються. Відпрацьований алгоритм проведення "конкурентного" імуноферментного аналізу здатний виявляти нонілфенол із чутливістю в межах 20–50 нг/мл і з робочим діапазоном концентрацій, що визначаються від 20–50 до 1000 нг/мл.

К л ю ч о в і с л о в а: нонілфенол, кон'югати нонілфенолу із білками, антисироватки, "конкурентний" імуноферментний аналіз.

В последние годы поверхностно активные вещества (ПАВ) заняли одно из ведущих мест среди загрязнителей окружающей среды [1]. Нонилфенол (НФ, $C_6H_4(OH)C_9H_{19}$, молекулярная масса 250 кДа), как стабильный конечный продукт деградации многих неионных ПАВ, попадает в окружающую среду в основном с промышленными сточными водами и обнаруживается в воде, воздухе, почве, подземных водах и осадочных породах. Данное ПАВ характеризуется негативным влиянием как на иммунную и гормональную системы [2, 3], так и на другие функции организма, реализуя его через связывание с эстрогенными рецепторами и посредством индукции различных эстрогеноподобных ответов [4]. НФ обладает способностью имитировать эффекты природных биологически активных соединений даже в сравнительно низких дозах и вызывать нарушение различных функций живых организмов, приводя чаще всего к развитию хронических токсических эффектов [5]. Для обнаружения и изучения механизмов воздействия таких веществ на организм и окружающую среду необходимы высокочувствительные и специфические методы идентификации и определения количества соединений этой группы, особенно если они находятся в низких концентрациях.

Для оценки влияния ПАВ на людей и различных видов животных, которые находятся в зоне загрязнения воды, применяют методы биотестирования ПАВ, которые базируются на ис-

пользовании в качестве объектов исследования рыб или водных беспозвоночных. Как правило, эти тесты являются слишком дорогими и занимают много времени, чтобы на их основе создавать систему контроля обширных территорий или большого количества образцов. Так, например, наиболее часто применяемый и довольно точный тест, основанный на использовании рыб, стоит приблизительно 700 \$ за 1 анализ и требует 48–96 ч для его выполнения [6]. Для определения токсичности НФ также используют субмитохондриальные электронно-транспортные системы [7], а с целью определения его концентрации в воде и продуктах применяют методы газовой хроматографии и масс-спектрометрии [8]. Однако они являются довольно дорогими, сложными в выполнении, требуют высокой квалификации исполнителей и занимают много времени. Поэтому для изучения биологической активности ксенобиотиков и контроля их количественного содержания в окружающей среде весьма важным и перспективным является разработка новых методов, основанных на принципах иммунохимического анализа (ИХА) и, в частности, иммуноферментного анализа (ИФА). Такие методы могут позволить с высокой степенью чувствительности (10^{-9} – 10^{-12} моль/дм³) и специфичностью оценивать как концентрацию этих соединений, так и проводить экспрессный мониторинг содержания их в воде рек, водоемов, очистных сооружений, в продуктах питания и т.д.

Высокая специфичность и аффинность ан-

тител во многом определяют эффективность иммунохимических систем детекции биологически активных веществ. Вместе с тем, получение антисывороток для целей ИХА представляет собой достаточно сложную задачу, успешное решение которой зависит от природы и свойств иммуногена, вида используемого адьюванта, схемы иммунизации, характера химической связи гаптена с носителем, иммуногенности конъюгатов и т.д. [9].

Учитывая изложенное выше, целью настоящей работы явилось получение антисывороток, специфичных к НФ, изучение их аналитических характеристик, а также разработка методов его иммуноанализа. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- синтезировать иммуногенные конъюгаты НФ с белками-носителями;
- разработать схемы иммунизации животных и получить антисыворотки к НФ;
- изучить аналитические параметры полученных антисывороток: специфичность, связывающую активность (титр);
- разработать и оптимизировать иммуноферментную тест-систему.

Материалы и методы

Для детекции НФ был выбран “конкурентный” ИФА с непрямой мечением специфических антител в образованном иммунном комплексе. Принцип его состоит в конкуренции молекул свободного НФ, содержащегося в тестируемой пробе, с конъюгатом НФ–белок, иммобилизованным на поверхности, за связывание со специфическими антителами. Результат такой конкурентной реакции определяли с помощью “антивидовых” антител, меченных пероксидазой хрена (ПХ). Для выполнения работы использовали реактивы фирмы «Sigma» (США): НФ, овалбумин (ОВА), соевый ингибитор трипсина (СИТ), бычий сывороточный альбумин (БСА), “антивидовые” антитела, меченные пероксидазой хрена.

Синтез иммуногенных конъюгатов НФ с белками-носителями. НФ является низкомолекулярным соединением и не обладает иммуногенными свойствами. Поэтому необходимо было конъюгированием НФ с белковыми носителями вызвать у них иммуногенную активность. Это достигалось двумя путями. В первом случае НФ связывали с белком в реакции Манниха с помощью формальдегида [10], а во втором – структурный аналог НФ, содержащий карбоксильную группу, а именно 7-(*p*-гидроксифенил)гептановую кислоту (ГГК), конъюгировали карбодиимидным/сукцинимидным способом [11]. Ниже приведена структура гаптенного компонента синтезируемых

конъюгатов (рис. 1). В результате получены конъюгаты НФ с БСА, ОВА и СИТ, которые затем использовали в качестве иммуногенов при иммунизации животных, а также в качестве антигенов при проведении иммуноанализа. Состав конъюгатов контролировали спектрофотометрически.

Получение антисывороток к НФ. Кроликов иммунизировали согласно трем разработанным схемам, которые различались по: 1 – типу используемых конъюгатов (ГГК–БСА, ГГК–СИТ и НФ–БСА, НФ–СИТ); 2 – концентрации конъюгата (0,1 или 0,5 мг/см³); 3 – адьюванту (полный адьювант Фрейнда, неполный адьювант Фрейнда, коклюшная моновакцина); 4 – интервалам между циклами иммунизации.

Первый цикл иммунизации 1,5 см³ раствора иммуногена (ГГК–БСА) проводили в соответствии со следующими схемами:

1 – 0,5 мг/см³ с полным адьювантом Фрейнда вводили внутривенно во множество точек спины и подкожно в 2–4 точки спины;

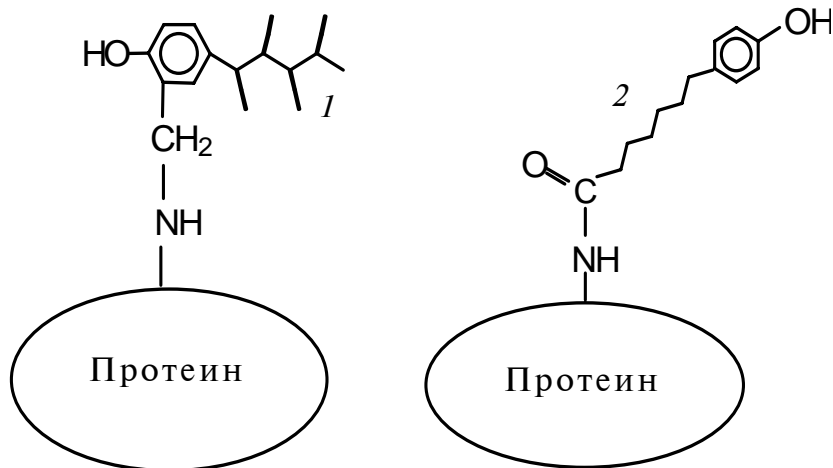
2 – в количестве 0,1 мг/см³ с полным адьювантом Фрейнда вводили в области спины внутривенно во множество точек и подкожно в 2–4 точки, а также 0,5 см³ коклюшной вакцины вводили подкожно в 2–4 точки;

3 – в количестве 0,5 мг/см³ с полным адьювантом Фрейнда вводили внутривенно во множество точек спины.

Последующие циклы иммунизации осуществляли конъюгатами немодифицированного НФ с БСА и СИТ, т.е. теми, в которых гаптен был НФ, а не ГГК. Через каждые четыре недели проводили второй и последующие циклы иммунизации. Для контроля уровня антител кровь брали через восемь дней после введения антигена.

Антисыворотки получали, помещая образцы крови в термостат на 30 мин при 37 °С, а затем на 2 ч при +4 °С. После этого их центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин, антисыворотку разделяли на аликвоты и хранили при –20 °С.

Оценка титра антисывороток в динамике иммунизации. Для этой цели использовали “непрямой” метод ИФА [12]. Растворы конъюгатов гаптен – белок в фосфатно-солевом растворе (ФСР) (НФ–БСА, НФ–СИТ, НФ–ОВА, ГГК–БСА, ГГК–СИТ, ГГК–ОВА) при концентрации 5 мкг/см³ вносили по 0,1 см³ в лунки полистироловых микропланшетов и инкубировали в течение 18 ч при +4 °С. Затем лунки промывали четыре раза ФСР, содержащим 0,05%-й твин 80 (ФСРТ). Далее анализ продолжали согласно стандартному методу выполнения ИФА [12], используя антикроличьи антитела («Sigma», США),



Конъюгаты белка с нонилфенолом (1) и 7-(*p*-гидроксифенил)гептановой кислотой.

Рис. 1. Структура гаптенового компонента конъюгатов.

меченные ПХ. Активность ПХ определяли, добавляя в лунки по 0,1 см³ субстратного раствора, содержащего 2,2-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) – АБТС-тест (0,7 мМ) и Н₂О₂ (1,8 мМ) в 30 мМ Na⁺-ацетатном буфере, рН 4,5. После инкубации в течение 30 мин при комнатной температуре регистрировали оптическую плотность в лунках при 405 нм с помощью вертикального спектрофотометра АС-8К («Оптон», Беларусь) или Multiscan EX («Labsystems», Финляндия). По полученным данным строили кривые связывающей способности (титра) иммунных сывороток в динамике иммунизации.

Определение специфичности антисывороток.

Антисыворотки, реагирующие с конъюгатами, содержащими в качестве гаптена немодифицированный НФ, отбирали для последующего изучения их кросс-реактивности в ИФА. Последнюю определяли с помощью панели поверхностно активных веществ различных классов, структурных аналогов и метаболитов НФ: фенола, 4-аминофенола, 4-хлор-3-метилфенола, 2,4-диметилфенола, 4-хлорфенола, 2-амино-4-хлорфенола, 2,4-динитрофенола, ГГК, 4-*n*-нонилфенола, 4-додecil-бензоилсерной кислоты, октилфенола, динонилфенола, *p*-додecilфенола, тритона X-100, РОЕ (1–2) нонилфенола, РОЕ (6) нонилфенола, РОЕ (10–11) нонилфенола, РОЕ (20) нонилфенола (всего 19 соединений).

Кросс-реактивность (КР, %) характеризовали как концентрацию антигена, которая вызывает 50%-е ингибирование связывания антител с конъюгатом [13]. Эту величину выражали в процентном отношении и вычисляли по формуле:

$$КР = 100 \cdot IC_{50 \text{ НФ}} / IC_{50 \text{ кросс-реактанта}}$$

Результаты и обсуждение

В ходе исследований была дана характеристика почти девяноста образцам антисывороток относительно их связывающей способности (титра) и специфичности (кросс-реактивности со структурно-родственными аналогами).

Титр антисыворотки отражает ее связывающую способность и определяет наибольшее ее разведение, которое способно связать 40% конъюгированного НФ в тест-системе. Величина титров антисывороток, полученных с помощью ИФА, варьирует в интервале 1/3000 – 1/10000. Данный уровень активности антител достигается уже после первой реиммунизации и впоследствии практически не изменяется. Анализ кривых титрования анализируемых антисывороток, полученных по трем схемам иммунизации (рис. 2), выявил пригодность использования для дальнейших исследований восьми образцов иммунных сывороток, полученных к конъюгатам НФ и ГГК с СИТ и БСА. Что касается отдельных схем иммунизации, то они все эффективны для наработки необходимого уровня антител. Рекомендация для дальнейшего их использования заключается в том, что с целью упрощения процедуры иммунизации следует пользоваться схемой 3.

Отобранные образцы иммунных сывороток оценивали на кросс-реактивность с помощью панели ПАВ (всего 19 соединений) различных классов, структурных аналогов и метаболитов НФ, а также других загрязнителей, потенциально содержащихся в тестируемых пробах.

Обнаружено отсутствие перекрестных реакций антисыворотки с фенолами и их производными – наиболее распространенными видами загрязнителей, структурно близких к алкил-

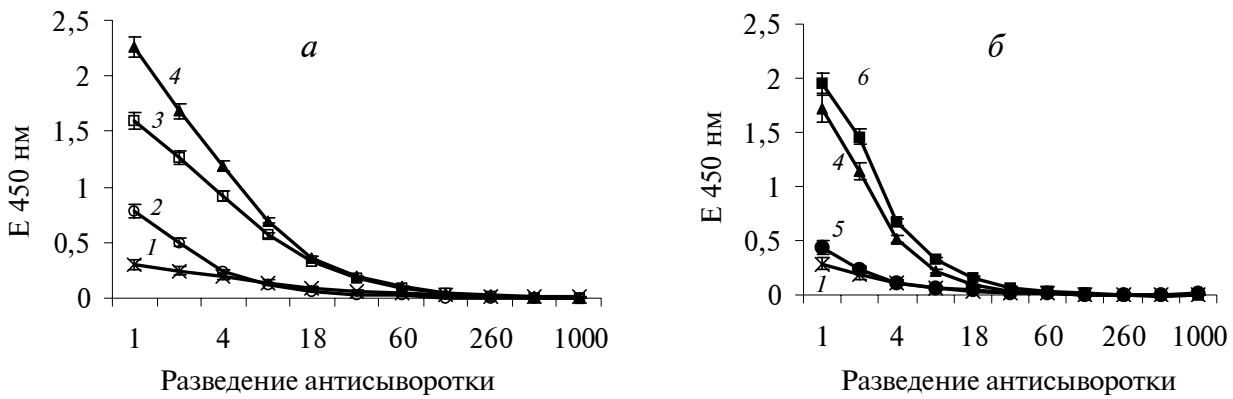


Рис. 2. Специфичность связывания отдельных видов конъюгатов и антисывороток, полученных к конъюгатам НФ–БСА (а) и НФ–СИТ (б), где в качестве конъюгатов использовали: АФ–ОВА (1), ГГК–СИТ (2), НФ–СИТ (3), НФ–ОВА (4), ГГК–ОВА (5), НФ–БСА (6).

фенолам. Максимальные перекрестные реакции отмечены с тритоном X-100, 4-аминофенолом (АФ), 4-додецилбензосульфоновой кислотой. Это дает возможность с помощью ИФА эффективно определять не только нонилфенол, но и алкилфенолэтоксилаты – исходную форму неионных

Кросс-реактивность полученной к нонилфенолу антисыворотки в отношении ряда подобных по структуре веществ

Исследуемые соединения	Кросс-реактивность, %
Нонилфенол	100
Фенол	< 0,1
4-Аминофенол	2,5
4-Хлор-3-метилфенол	< 0,1 – 0,01
2,4-Диметилфенол	< 0,1 – 0,01
4-Хлорфенол	< 0,1 – 0,01
2-Амино-4-хлорфенол	< 0,1 – 0,01
2,4-Динитрофенол	< 0,1 – 0,01
7-(<i>p</i> -Гидроксифенил)гептановая кислота	0,15
4- <i>n</i> -Нонилфенол	0,25
4-Додецил-бензоилсерная кислота	1,5
Октифенол	< 0,1 – 0,01
Дионилфенол	< 0,1 – 0,01
<i>p</i> -Додецилфенол	< 0,1 – 0,01
Тритон X-100	20
РОЕ (1–2) нонилфенол	< 0,1 – 0,01
РОЕ (6) нонилфенол	< 0,1 – 0,01
РОЕ (10–11) нонилфенол	< 0,1 – 0,01
РОЕ (20) нонилфенол	< 0,1 – 0,01

ПАВ. По признаку специфичности (кросс-реактивности) антисыворотки не отличались от выделенных препаратов иммуноглобулинов.

В процессе оптимизации протокола конкурентного ИФА нонилфенола с непрямой меченной антител показано, что оптимальная концентрация сорбируемого антигена – НФ–ОВА – на стадии адсорбции составляет 5 мкг/см³, длительность иммунохимической реакции – 60 мин, рабочее разведение антисыворотки – 1:3000 – 1:10000. Критерием оптимизации является максимальная чувствительность определения НФ при условии, что приемлемая точность анализа сохраняется на необходимом уровне. Последнее требование означает, что регистрируемое оптическое поглощение в отсутствие конкурирующего антигена составляет не менее 0,5.

Конечный процесс конкурентного варианта оптимизированной тест-системы для определения НФ включает следующие этапы анализа. Конъюгаты гаптен – носитель: НФ–СИТ, НФ–ОВА, НФ–БСА адсорбировали в лунках планшета из раствора 5 мкг/см³ (по 100 мкл на 1 лунку) и инкубировали в течение 18 ч при +4 °С. Затем планшет четырехкратно отмывали буфером ФСР. Для блокирования потенциальных мест неспецифической сорбции в лунки вносили по 150 мкл 0,1%-го раствора желатина в ФСР и инкубировали в течение 30 мин при +37 °С. После четырехкратного промывания лунок вносили в них по 50 мкл специфической антисыворотки (в разведении 1:3000 в К⁺-фосфатном буфере, рН 7,4, содержащем 0,05 М NaCl и 0,05% желатина), а также по 50 мкл НФ (ряд концентраций от 0,1 нг до 100 мкг/см³ в метанол-водном (v/v) растворе 1:4). Смесь инкубировали в течение 1 ч при +37 °С, а после четырехкратного промывания лунок с помощью ФСРТ в них добавляли анти-

кроличьи антитела, меченные ПХ (разведение 1:1000). После выдерживания плашек в течение 1 ч при +37 °С лунки подвергали четырехкратной промывке с помощью ФСРТ и однократной – дистиллированной водой. Активность ПХ измеряли, добавляя в лунки по 0,1 см³ субстратного буферного раствора, содержащего 0,7 мМ АБТС и 1,8 мМ Н₂О₂ в 30 мМ Na⁺-ацетатном буфере, рН 4,5. Спустя 30 мин инкубации при комнатной температуре и при постоянном встряхивании измеряли оптическую плотность продукта ферментативной реакции при 405 нм на вертикальном спектрофотометре АС-8К («Оптон», Беларусь) или Multiscan EX («Labsystems», Финляндия).

Сопоставление калибровочных кривых «конкурентного» ИФА, полученных для различных сочетаний антисывороток (против НФ–СИТ и НФ–БСА) и иммобилизованных антигенов (НФ–ОВА, НФ–СИТ и НФ–БСА) позволило считать, что оптимальной парой для детекции НФ является антисыворотка против НФ–БСА и иммобилизованный антиген НФ–ОВА (рис. 3). С помощью антисыворотки против НФ–БСА удалось достичь чувствительности анализа НФ на уровне 20–50 нг/см³ с рабочим диапазоном определяемых концентраций 50–1000 нг/см³. Длительность анализа составляет около 4 ч. Такая чувствительность анализа вполне достаточна при определении потенциально опасных для организма концентраций НФ (острые токсические эффекты). Следует отметить, что для обнаружения с помощью предложенного варианта конкурентного

ИФА более низких концентраций сурфактантов, которые, аккумулируясь в организме, могут вызывать патологические эффекты, необходимо проведение дополнительных процедур по обработке анализируемых образцов в виде их предварительной экстракции или концентрирования.

Разработанный вариант ИФА тест-системы для детекции НФ был апробирован при определении его концентрации в модельных (содержащих известные концентрации НФ) и в реальных образцах воды (водопроводная вода, сточные и речные воды и др.). Тестируемый уровень сурфактантов в образцах воды из различных источников, оцененный с помощью данной тест-системы, колеблется от 20 до 400 нг/см³.

Таким образом, нами разработаны принципиальные подходы приготовления конъюгатов НФ с белками. Кроме того, отработаны пути получения антисывороток, специфичных к НФ и пригодных для последующей постановки ИФА. Установлена специфичность полученных препаратов антител. Максимальные перекрестные реакции отмечены с тритоном X-100, 4-аминофенолом (АФ), 4-додецилбензосульфоновой кислотой. Это дает возможность с помощью ИФА эффективно определять не только нонилфенол, но и алкилфенолэтоксилаты – исходную форму неионных ПАВ. Также были выделены тотальные фракции Ig и показано, что по специфичности и связывающей способности они не отличаются от антисывороток. Отработан вариант конкурентного ИФА с чувствительностью выявления НФ в пределах 20–50 нг/см³ с рабочим диапазоном опре-

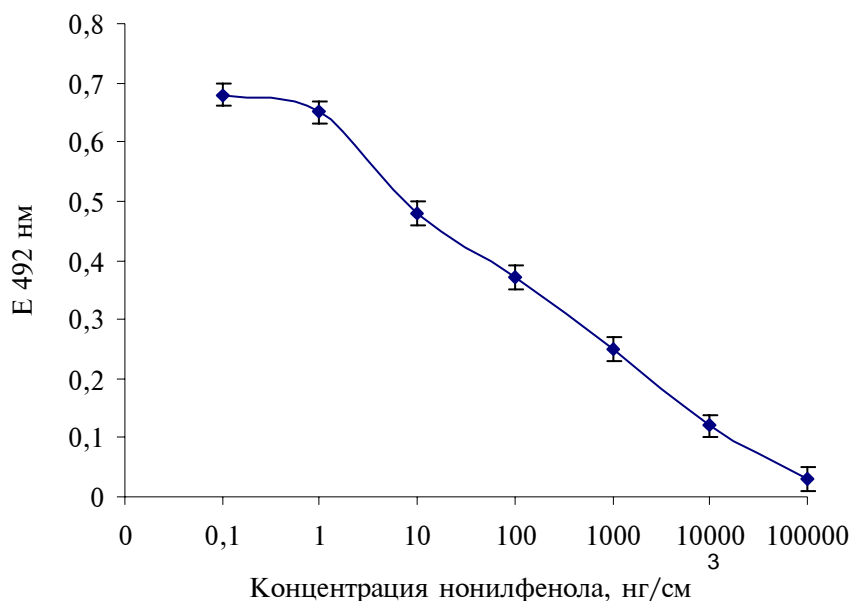


Рис. 3. Определение НФ методом ИФА с использованием иммобилизованного НФ–ОВА и антисыворотки, полученной к конъюгату НФ–БСА.

деляемых концентраций от 20–50 до 1000 нг/см³.

Выполнение данного исследования было поддержано Министерством образования и науки Украины в рамках программы русско-украинского сотрудничества (проект № М/176-2004), а также Европейским ИНКО-Коперникус фондом (контракт ICA2-СТ-2001-10007).

IMMUNE ENZYMATIC ANALYSIS OF NON-IONIC SURFACTANTS IN WATER

*N. F. Starodub¹, N. V. Piven²,
A. V. Demchenko¹, A. V. Goncharik²,
E. E. Orlova², A. I. Burakovskij²,
A. A. Martjanov³, A. V. Gerdev³,
B. B. Dzantiev³*

¹Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

²Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk;

³A. N. Bakh Biochemical Institute, Russia, Moscow;
e-mail: starodub@biochem.kiev.ua

S u m m a r y

The approaches for high sensitive and specific determination of nonylphenol (NP) with the help of immune enzymatic (ELISA) method have been developed. The process of preparation of conjugates of NP with proteins, antiserum obtaining, purification of immunoglobulin (Ig) fractions and study of specificity of the obtained antibodies were described in detail. It was shown that the antiserum and total Ig fraction do not differ in respect of specificity and binding abilities. The developed algorithm of ELISA method fulfillment is able to provide NP revealing with the sensitivity in the range of 20–50 ng/ml and working controlled concentrations – from 20–50 to 1000 ng/ml.

К e y w o r d s: nonylphenol (NP), conjugates of NP with proteins, antisera, “competitive” immune enzymatic (ELISA) method.

1. Oosterkamp A. J., Hock B., Seifert M., Irth H. // Trends Anal. Chem. – 1997. – **16**. – P. 544–553.
2. Masuyama H., Hiramatsu Y., Kunitomi M. et al. // Mol. Endocrinol. – 2000. – **14**. – P. 421–428.
3. Ahel M., Molnar E., Ibric S., Giger W. // Water Sci. and Tech. – 2000. – **42**. – P. 15–22.
4. Routledge E. J., Sumpter J. P. // The J. Biol. Chem. – 1997. – **272**. – P. 3280–3288.
5. Goda Y., Kobayashi A., Fukuda K. et al. // Water Sci. and Devel. – 2000. – **42**. – P. 81–88.
6. Soto A. M., Justicia H., Wray J. W. and Sonnenschein C. // Environmental Health Perspectives. – 1991. – N 92. – P. 167–173.
7. White R., Sobling S., Hoare S. A., Sumpler J. P. // Endocrinology. – 1994. – N 135. – P. 175–182.
8. Dzantiev B. B., Zherdev A. V., Romanenko O. G., Sapegova L. A. // Intern. J. Environ. Anal. Chem. – 1996. – **65**. – P. 95–111.
9. Пивень Н. В. // Мед. радиология. – 1986. – **12**. – P. 87–92.
10. Hirose K., Akizawa T., Yoshioka M. // Anal. Chim. Acta. – 1998. – **365**. – P. 129–135.
11. Mikhura I. V., Formanovsky A. A., Nikitin A. O. et al. // Mendeleev Commun. – 2000. – **10**. – P. 1–2.
12. Jakovleva J., Zherdev A. V., Popova V. A. et al. // Anal. Chim. Acta. – 2003. – **491**. – P. 1–13.
13. Иммуноферментный анализ / Под ред. Т. Т. Нго и Г. Ленгоффа. – М.: Мир, 1988. – 444 с.

Получено 13.07.2005