

УДК: 577.152.321.088.1: 579.852.2

ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ БИСФЕНОЛА А: ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ ИММУНОРЕАГЕНТОВ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНАЛИЗА

А.С. Крапивин, Ж.В. Самсонова, Н.А. Ускова, Н.Л. Иванова, А.М. Егоров

(кафедра энзимологии; e-mail: nettlex@yandex.ru)

Прямая и непрямая схемы твердофазного иммуноферментного анализа были разработаны для определения бисфенола А. В качестве иммунореагентов использовали конъюгаты карбоксиметилового эфира бисфенола А, карбоксипропилового эфира бисфенола А и 4,4-бис(4-оксифенил)валериановой кислоты с бычьим сывороточным альбумином (иммуногены для получения поликлональных антител), овальбумином и пероксидазой хрена. Проведено сравнение аналитических параметров для гетерологических и гомологических комбинаций иммунореагентов. Установлено, что непрямая схема анализа более чувствительна и специфична, чем прямая. Использование гетерологических комбинаций иммунореагентов позволило увеличить чувствительность и специфичность в непрямом анализе. Наибольшая чувствительность была достигнута для антител, полученных против конъюгата карбоксипропилового эфира бисфенола А с бычьим сывороточным альбумином и конъюгата 4,4-бис(4-оксифенил)валериановой кислоты с овальбумином. Предел обнаружения бисфенола А в фосфатном буфере составил 0,03 нг/мл. Эта комбинация иммунореагентов продемонстрировала лучшую специфичность к бисфенолу А, так как антитела показали перекрестное реагирование только с 4-кумилфенолом (11%), бисфенолом *E* (5%) и бисфенолом *S* (2%).

Бисфенол А — 2,2-бис(4-гидроксифенил)пропан (БФА) — используется в качестве мономера при производстве поликарбонатов и эпоксидных смол, поэтому входит в состав большого числа промышленных продуктов. Присутствие БФА было обнаружено в таких объектах, как порошковое молоко (от 45 до 113 нг/г [1]), поверхностная вода (до 0,41 нг/мл [2]), сточная вода (от 1,3 до 17200 нг/мл [3]).

Сравнительно недавно БФА был отнесен к группе соединений, негативно влияющих на эндокринную систему животных, так как данное вещество обладает эстрогенной активностью и способно имитировать действие половых гормонов [4]. Было показано, что БФА способен оказывать воздействие на организмы мышей и крыс в концентрациях от 0,23 пг/мл [5].

Активное изучение БФА, а также необходимость определения его содержания вызвало потребность в создании высокочувствительных методов анализа. В настоящий момент для определения БФА в таких объектах, как молоко, вода и сыворотки крови, широко используются различные хроматографические методы [1, 6–7]. Помимо этого, для определения БФА было разработано несколько схем твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием поликлональных [8–10], моноклональных

[11–12] и рекомбинантных антител [13]. Несмотря на то, что каждый из представленных методов ИФА является достаточно чувствительным, ни в одном из них в полной мере не изучено влияние схемы анализа и структуры иммунореагентов на характеристики анализа. Целью настоящей работы было получение иммунореагентов, антител и конъюгатов гаптен-овальбумин и гаптен-пероксидаза хрена на основе гаптен-БФА, изучение влияния схемы ИФА и структуры иммунореагентов на чувствительность и специфичность анализа.

Материалы и методы

В работе использовали следующие реагенты: бисфенол А (БФА), *N*-гидроксисукцинимид, *N,N*-дициклогексилкарбодиимид, полный адъювант Фрейнда, бычий сывороточный альбумин (БСА) и овальбумин (ОВА) (“Sigma”, США); структурные аналоги БФА и 4,4-бис(4-оксифенил)валериановая кислота (БФА-ВК) (“Aldrich”, США); диметилформамид (“Lancaster”, Англия); пероксидаза хрена (ПХ) (“Яринвест”, Россия); неорганические соли и серная кислота (“Химмед”, Россия); готовый субстратный раствор, содержащий 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (“Иммунотех”, Россия); конъюгат вторичных антител осла против кролика с ПХ от института эпиде-

миологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалея (Россия). Исходные растворы БФА и его структурных аналогов (1 мг/мл) в метаноле хранили при 20°C. Стандартные растворы веществ готовили путем разведения исходных растворов в 0,01 М фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 0,15 М NaCl, и хранили при 4°C. Для измерения оптической плотности использовали планшетный фотометр фирмы "Molecular Devices" (США).

Синтез карбоксиалкиловых эфиров бисфенола А. Синтез карбоксиметилового (БФА-КМЭ) и карбоксипропилового (БФА-КПЭ) эфиров бисфенола А (рис. 1, вещество 1) был осуществлен согласно методике описанной в работе [9].

Синтез конъюгатов гаптен-белок. БФА-КМЭ, БФА-КПЭ и БФА-ВК были ковалентно связаны с белками, БСА и ОВА – методом активированных эфиров. Гаптен (50 мг), *N*-гидроксисукцинимид (45 мг) и *N,N*-дициклогексилкарбодиимид (72 мг) были растворены в 1 мл диметилформамида. Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре, после чего оставили на ночь при 4°C. Образовавшийся осадок декантировали центрифугированием (2 мин, 16000 g). Затем 0,5 мл супернатанта при перемешивании медленно по каплям добавляли к раствору 50 мг БСА (или ОВА) в 3,5 мл 0,1 М карбонатного буфера (рН 9,5), смесь перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре и оставили на ночь при 4°C. Полученный раствор конъюгата гаптен-белок чистили диализом против фосфатного буфера в течение двух дней, после чего лиофильно высушили. Синтез конъюгатов БФА-ВК с белками проводили в течение одного дня, при этом реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре на первой и второй стадиях.

Синтез конъюгатов гаптен-пероксидаза хрена. 10 мг гаптена (БФА-КМ, БФА-КПЭ или БФА-ВК), 7 мг *N*-гидроксисукцинимид и 13 мг *N,N*-дициклогексилкарбодиимид растворили в 0,5 мл диметилформамида. Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч, после чего оставили на ночь при 4°C. Образовавшийся осадок декантировали центрифугированием (2 мин, 16000 g). Раствор ПХ готовили растворением 2 мг фермента в 0,9 мл карбонатного буфера. После этого 100 мкл раствора активированного гаптена добавляли по каплям при перемешивании к 0,9 мл охлажденного на льду раствора ПХ. Смесь перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Раствор конъюгата гаптен-фермент чистили гель-фильтрацией на колонке PD-10 (Amersham Bio-

sciences, США) при комнатной температуре в фосфатном буфере. Полученный раствор конъюгата смешали с глицерином в объемном соотношении 1:1 и хранили при 20°C. Синтез конъюгатов БФА-ВК с ферментом проводили в течение одного дня, при этом реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре на первой и второй стадиях.

Получение поликлональных антител. Для иммунизации использовали кроликов породы шиншилла (3 кролика на иммуноген). Смесь 1:1 (v/v) 0,5 мл раствора иммуногена (2 мг/мл в фосфатном буфере) и 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда вводили подкожно кроликам один раз в неделю в течение месяца. На пятой неделе раствор иммуногена (1 мг/мл в фосфатном буфере) использовали для бустерных инъекций, по одной инъекции в день в течение 3 дней. После этого раз в неделю проводили отбор крови. Бустерные инъекции повторяли каждые 5–6 недель. Титры полученных антител определяли методом непрямого ИФА.

Непрямая схема ИФА. Раствор конъюгата гаптен-ОВА в фосфатном буфере наносили на 96-луночный планшет (Nalge-Nunc, Дания, 150 мкл в лунку), после чего планшет инкубировали в течение ночи при 4°C. Затем планшет промывали три раза 0,05% раствором детергента Твин-20 в фосфатном буфере (3 150 мкл в лунку). Далее на планшет вносили стандартные растворы БФА (50 мкл в лунку) и раствор антител в рабочем разведении в 0,05% растворе Твин-20 в фосфатном буфере (50 мкл в лунку), после чего планшет инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После промывания 100 мкл раствора конъюгата вторичных антител с ПХ (разведение 1/10000) в 0,05% растворе Твин-20 в фосфатном буфере добавляли в каждую лунку, далее планшет инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После промывания в каждую лунку вносили по 100 мкл субстратной смеси. На 15-й минуте ферментативную реакцию останавливали 0,2 М раствором серной кислоты (100 мкл в лунку). Измерение оптической плотности проводили при длине волны 450 нм.

Прямая схема ИФА. Раствор антител в 0,1 М карбонатном буфере наносили на планшет (150 мкл в лунку), после чего планшет инкубировали в течение ночи при 4°C. Затем планшет промывали три раза 0,05%-м раствором Твин-20 в фосфатном буфере (3 150 мкл в лунку). Далее вносили стандартные растворы БФА (50 мкл в лунку) и раствор конъюгата гаптен-ПХ в рабочем разведении в 0,05%-м растворе Твин-20 в фосфатном буфере

(50 мкл в лунку), после чего планшет инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. После промывания в каждую лунку вносили по 100 мкл субстратной смеси. На 15-й минуте ферментативную реакцию останавливали 0,2 М раствором серной кислоты (100 мкл в лунку). Измерение оптической плотности проводили при длине волны 450 нм.

Определение аналитических параметров. Величину сигнала, соответствующую пределу обнаружения (ПО), определяли по формуле:

$$ОП = ОП_0 - 2\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (i - 0)^2}{n-1}},$$

где $ОП_i$ и $ОП_0$ – это i -е и среднее значения оптической плотности нулевого стандарта БФА при числе измерений (n), равном 20. Коэффициент вариации (КВ) определяли по формуле:

$$КВ = \frac{100}{[БФА]_{cp}} \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n ([БФА]_i - [БФА]_{cp})^2}{n-1}},$$

где $[БФА]_i$ и $[БФА]_{cp}$ – i -е и среднее значения концентраций в контрольной пробе БФА при $n = 3$.

Обсуждение результатов

Получение иммунореагентов. Все конъюгаты карбоксильных производных БФА с белками и пероксидазой хрена были получены традиционным методом активированных эфиров. Схема модификации БФА представлена на рис. 1.

В предыдущих работах были описаны в основном два подхода к получению карбоксильных производных БФА. Первый из них основывался на взаимодействии между одной из гидроксильных

групп БФА и производными карбоновых кислот. В настоящей работе для синтеза карбоксиалкиловых эфиров БФА был использован подход, описанный в работе [9]. В этом случае гидроксильная группа БФА взаимодействует с бромом в бромкарбоновой кислоте с образованием вещества **1** (рис. 1). Второй подход был предложен в работе [10]. Коммерчески доступный БФА–ВК использовался в качестве карбоксильного производного БФА, когда карбоксильная группа присоединяется через один из метилов (рис. 1, вещество **2**). Использование обоих подходов в настоящей работе позволяет сравнить их между собой.

Конъюгаты БФА с БСА использовали далее для получения трех серий поликлональных антител. Все антитела были охарактеризованы значениями титров при взаимодействии с гомологичными им по структуре ОВА-конъюгатами в непрямом ИФА. Нужно отметить, что для антител, полученных против карбоксиалкиловых эфиров бисфенола А, значения титров (1/150000–1/200000) оказались более высокими, чем для антител, полученных против БФА–ВК–БСА (1/15000–1/20000).

Чувствительность непрямой и прямой схем ИФА БФА в буфере. Для прямого и непрямого ИФА на БФА было изучено влияние структуры иммунореагентов на чувствительность анализа. Для всех комбинаций антител с ОВА- и ПХ-конъюгатами были получены калибровочные кривые БФА в буфере. Основные аналитические параметры представлены в таблице.

Из представленных данных следует, что для непрямого ИФА более чувствительными являются гетерологичные по структуре комбинации иммунореагентов, а именно те комбинации, в которых иммуноген и конъюгат гаптен–ОВА получены при использовании разных по структуре гаптенов. Так,

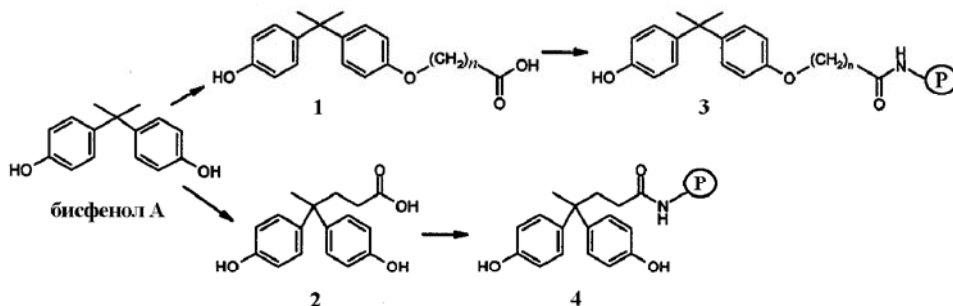


Рис. 1. Схема модификации БФА: **1** – $n=1$ (БФА–КМЭ), $n=3$ (БФА–КПЭ); **2** – БФА–ВК; **3, 4** – конъюгаты гаптен–белок или гаптен–фермент (P = БСА, ОВА или ПХ)

Основные параметры ИФА бисфенола А в фосфатном буфере (рН = 7,4)

Пол/Аг	Конъюгат с ОВА или ПХ	IC ₅₀ , нг/мл	ПО*, нг/мл	ДОК*, нг/мл	КВ*, %
непрямой ИФА					
БФА-КПЭ-БСА	БФА-КПЭ-ОВА	53,5	0,2	0,5-2000	2,4
	БФА-КМЭ-ОВА	53,8	0,6	1-2000	3,1
	БФА-ВК-ОВА	1,6	0,03	0,05-100	2,9
БФА-КМЭ-БСА	БФА-КПЭ-ОВА	159,7	0,8	1,2-7000	3,7
	БФА-КМЭ-ОВА	152,5	0,4	0,7-10000	1,7
	БФА-ВК-ОВА	нет взаимодействия			
БФА-ВК-БСА	БФА-КПЭ-ОВА	26,3	0,2	0,4-1500	2,4
	БФА-КМЭ-ОВА	63,7	0,3	0,6-700	1,2
	БФА-ВК-ОВА	144,7	0,7	1,3-10000	1,7
прямой ИФА					
БФА-КПЭ-БСА	БФА-КПЭ-ПХ	6,1	0,1	0,4-800	3,2
	БФА-КМЭ-ПХ	15,6	0,5	0,8-900	2,3
	БФА-ВК-ПХ	126,0	8,0	10-5000	2,2
БФА-КМЭ-БСА	БФА-КПЭ-ПХ	27,9	0,5	0,8-900	4,3
	БФА-КМЭ-ПХ	47,8	0,7	1,1-1000	1,5
	БФА-ВК-ПХ	90,8	4,0	5,0-1000	2,6
БФА-ВК-БСА	БФА-КПЭ-ПХ	12,5	0,3	1,0-500	5,5
	БФА-КМЭ-ПХ	29,8	0,4	1,0-1000	1,9
	БФА-ВК-ПХ	118,0	2,0	4,0-1000	4,6

*ПО – предел обнаружения; ДОК – диапазон определяемых концентраций, КВ – коэффициент вариаций.

лучшая чувствительность была получена для антител против БФА-КПЭ-БСА и конъюгата БФА-ВК-ОВА (ПО = 0,03 нг/мл). При этом нужно отметить, что чувствительность для комбинаций с антителами, полученными против карбоксиалкиловых эфиров бисфенола А, сильно зависит от структуры ОВА конъюгата, с которыми они используются. Действительно, оба антитела БФА-КМЭ-БСА и БФА-КПЭ-БСА хорошо взаимодействуют с гомологичными им конъюгатами БФА-КМЭ-ОВА и БФА-КПЭ-ОВА. При этом в данных комбинациях были получены близкие по величине пределы обнаружения (таблица). В то время как с конъюгатом БФА-ВК-ОВА взаимодействие антител против БФА-КПЭ-БСА было более слабым по сравнению со свободным БФА. Поскольку непрямой ИФА является конкурентным методом, для данной комбинации достигается максимальная чувствительность. Для антител против БФА-КМЭ-БСА взаимодействие с конъюгатом БФА-ВК-ОВА не было обнаружено. Возможно, в данном случае антитела в основном нарабатывались против антигенных детерминант

БФА расположенных вблизи БСА, поскольку химический мостик между БФА и белком в данном случае является самым коротким. Антитела против БФА-ВК-БСА также показали лучшую чувствительность в комбинации с гетерологичным ОВА конъюгатом, а именно с БФА-КМЭ-ОВА (ПО = 0,3 нг/мл) и БФА-КПЭ-ОВА (ПО = 0,1 нг/мл). Для прямого ИФА наблюдается обратная ситуация. Более чувствителен анализ с использованием гомологичных комбинаций, когда иммуноген и конъюгат гаптен-фермент получены на один и тот же гаптен, за исключением систем с антителами БФА-ВК-БСА. Лучшая чувствительность достигается при использовании тех же антител против БФА-КПЭ-БСА в комбинации с конъюгатом БФА-КПЭ-ПХ (ПО = 0,1 нг/мл). При этом нужно отметить, что в тех случаях, когда использовались комбинации антител с конъюгатом БФА-ВК-ПХ, чувствительность значительно падала по сравнению с непрямой схемой анализа для аналогичных ОВА конъюгатов. Так, предел обнаружения для комбинации антител против БФА-КПЭ-БСА с

конъюгатом БФА–ВК–ПХ составил 8,0 нг/мл, для сравнения для аналогичной комбинации в непрямой схеме предел обнаружения был 0,03 нг/мл. Мы сократили время синтеза для конъюгатов БФА–ВК с белками и ПХ, потому что, когда синтез проводился в течение двух дней, полученные ОВА- и ПХ-конъюгаты не взаимодействовали с антителами (данные не представлены). Очевидно, активированный гаптен БФА–ВК нестабилен и разлагается при хранении в течение ночи. Возможно, сокращение времени синтеза было наиболее критично в случае синтеза с ПХ, так как фермент обладает меньшим числом свободных NH_2 -групп по сравнению с белками, БСА и ОВА. По всей видимости, полученный конъюгат БФА–ВК–ПХ обладал более низкой плотностью гаптена на поверхности фермента по сравнению с другими ПХ-конъюгатами.

Сравнивая две схемы анализа, мы можем сделать вывод, что наилучшую чувствительность к БФА показал метод непрямого ИФА с использованием антител против БФА–КПЭ–БСА и конъюгата БФА–ВК–ОВА (ПО = 0,03 нг/мл). В ранее опубликованных работах конъюгат БФА–КПЭ–БСА уже использовался для получения антител (ПО = 0,18 нг/мл [13], ПО = 0,3 нг/мл [9]), а конъюгат БФА–ВК–ОВА при оптимизации непрямого ИФА (ПО = 0,1 нг/мл [10]). Однако в данных работах

при разработке ИФА рассматривались лишь гомологичные комбинации иммунореагентов. В нашей работе было показано, что объединение этих реагентов в гетерологичной комбинации приводит примерно к десятикратному улучшению чувствительности по сравнению с данными, опубликованными ранее.

Специфичность не прямой и прямой схем ИФА бисфенола А в буфере. Каждая комбинация иммунореагентов была охарактеризована значениями перекрестного реагирования ($\text{ПР} = \text{IC}_{50}(\text{БФА}) / \text{IC}_{50}(\text{аналог})$) с 8 структурными аналогами БФА (рис. 2) в прямой и не прямой схемах ИФА.

На основании полученных данных (рис. 3) можно сделать три основных вывода. Во-первых, все антитела показали значительное перекрестное реагирование с бисфенолом Е и с 4-кумилфенолом в обеих схемах ИФА. Это неудивительно, поскольку данные соединения являются ближайшими структурными аналогами БФА (рис. 2). В ранее опубликованных работах также отмечалось значительное перекрестное реагирование антител против БФА с бисфенолом Е и 4-кумилфенолом [8, 13].

Во-вторых, специфичность анализа зависела от структуры иммуногена, против которого были получены антитела. В целом антитела, полученные против конъюгатов карбоксиалкиловых эфиров с БСА, были более специфичными, чем антитела, полученные против БФА–ВК–БСА (рис. 3, а, б). Структу-

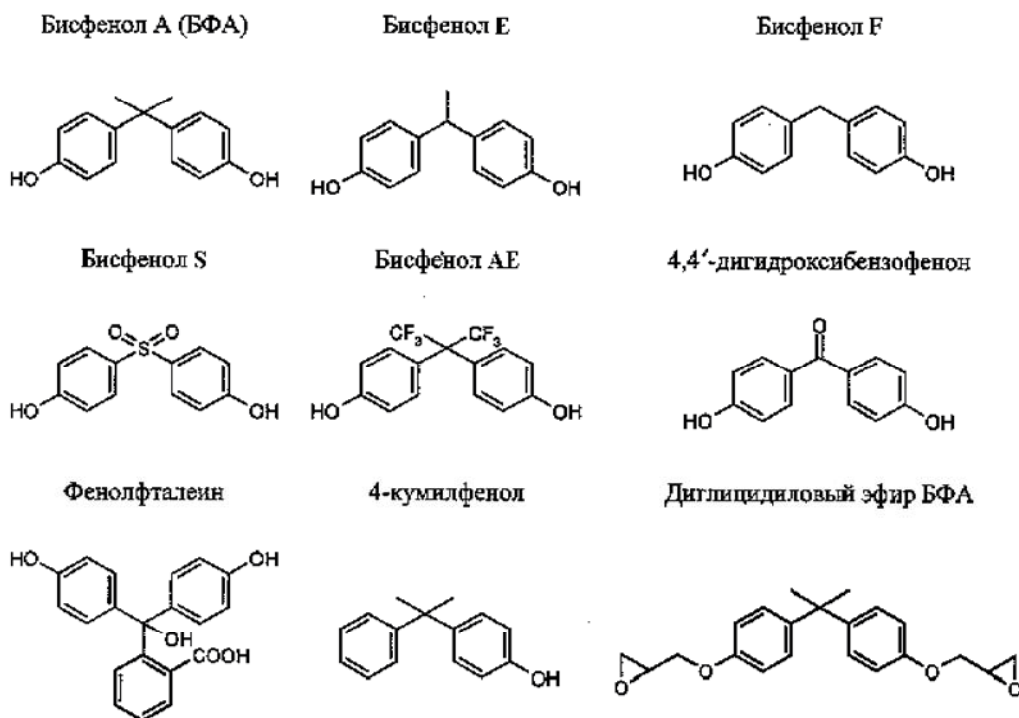


Рис. 2. Структуры аналогов

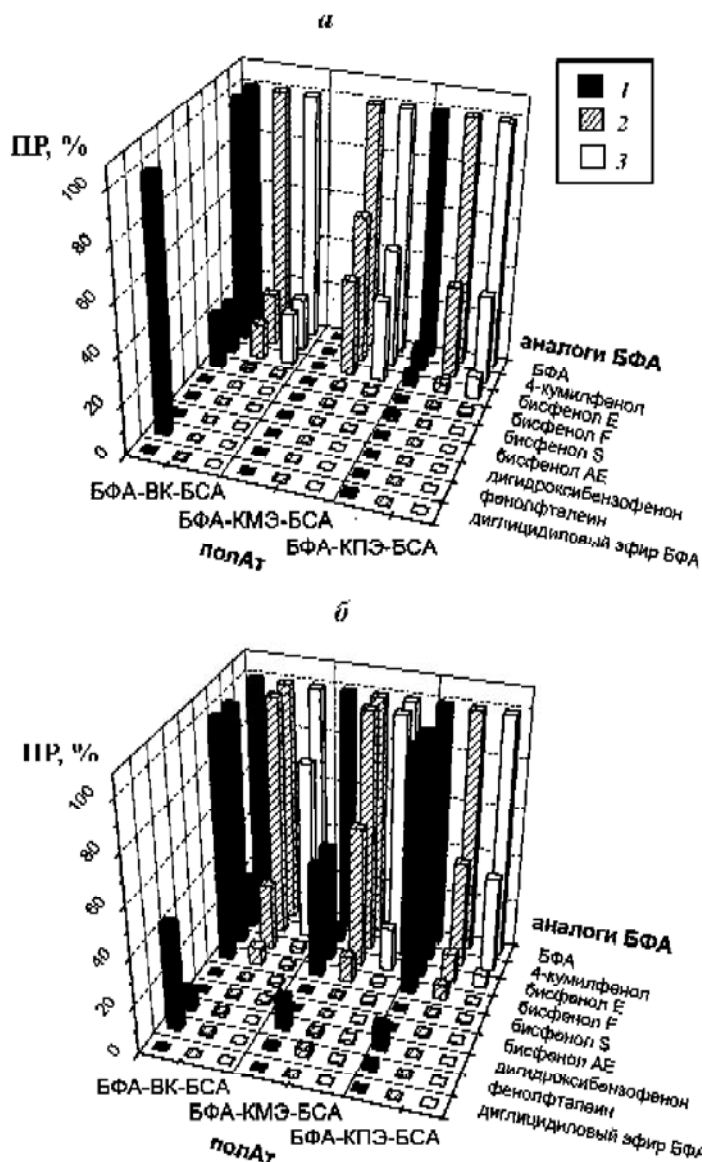


Рис. 3. Диаграммы величин перекрестного реагирования аналогов БФА: *а* – непрямая схема (конъюгаты: 1 – БФА–ВК–ОВА, 2 – БФА–КМЕ–ОВА, 3 – БФА–КПЭ–ОВА); *б* – прямая схема (конъюгаты: 1 – БФА–ВК–ПХ, 2 – БФА–КМЭ–ПХ, 3 – БФА–КПЭ–ПХ)

ры иммуногенов в данном случае отличались местом пришивки БСА к молекуле БФА. В случае конъюгатов карбоксиалкиловых эфиров БФА с БСА белок присоединялся через одну из гидроксильных групп (рис. 1, вещество 1), при этом алкановая часть БФА оставалась неизменной. В конъюгате БФА–ВК–БСА белок пришивался через одну из метильных групп, и неизменными оставались фенольные кольца БФА (рис. 1, вещество 4).

В-третьих, специфичность анализа зависела от структуры конъюгатов гаптен–ОВА или гаптен–ПХ, в комбинации с которыми использовались антитела, а также от схемы анализа. Так, в непрямом ИФА все антитела в комбинациях с БФА–КПЭ–ОВА и

БФА–КМЭ–ОВА показали близкие значения перекрестного реагирования с бисфенолом Е и 4-кумилфенолом (рис. 3, *а*). При этом в прямой схеме комбинации антител с БФА–КМЭ–ПХ были менее специфичными, наблюдалось увеличение перекрестного реагирования с бисфенолом Е и 4-кумилфенолом, а также значительное перекрестное реагирование с бисфенолом F (рис. 3, *б*). Конъюгаты БФА–КПЭ–ПХ и БФА–КМЭ–ПХ отличаются лишь длиной химической ножки между БФА и ферментом. Отсюда можно сделать вывод, что увеличение длины ножки в конъюгатах карбоксиалкиловых эфиров БФА с ПХ приводит к увеличению специфичности анализа в прямом ИФА. Аналогичные выводы

были получены ранее в работе [12]. Для комбинаций, включающих конъюгаты БФА–ВК–ОВА или БФА–ВК–ПХ, непрямая схема была также более специфичной, чем прямая (рис. 3, а, б).

Суммируя полученные результаты, мы можем заключить, что наиболее специфичной являлась непрямая схема ИФА с использованием антител против БФА–КПЭ–БСА и конъюгата БФА–ВК–ОВА. В данном случае среди исследуемых веществ значительное перекрестное реагирование (выше 1%) показали лишь 4-кумилфенол (11%), бисфенол Е (5%) и бисфенол S (2%). Эта же комбинация иммунореагентов показала лучшую чувствительность (ПО = 0,03 нг/мл). На основании это-

го мы можем сделать вывод, что разработанная нами непрямая схема ИФА является очень чувствительным и специфичным инструментом для определения БФА.

Список сокращений

БФА – бисфенол А; ИФА – иммуноферментный анализ; БСА – бычий сывороточный альбумин; ОВА – овальбумин; ПХ – пероксидаза хрена; БФА–КМЭ – карбоксиметилловый эфир бисфенола А; БФА–КПЭ – карбоксипропиловый эфир бисфенола А; ПО – предел обнаружения; ДОК – диапазон определяемых концентраций; КВ – коэффициент вариаций; ПР – перекрестное реагирование.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuo H.W., Ding W.H. // J. Chromatogr. A. 2004. **1027**. P. 67.
2. Fromme H., Kechler Th., Otto Th., Pilz K. et al. // Water Res. 2002. **36**. P. 1429.
3. Yamamoto T., Yasuhara A., Shiraiishi H., Nakasugi O. // Chemoshere. 2001. **42**. P. 415.
4. Krishnan A.V., Stathis P., Permuth S.F., Tokes L. et al. // Endocrinology. 1993. **132**. P. 2279.
5. Wozniak A.L., Bulayeva N.N., Watson Ch.S. // Environ. Health Perspect. 2005. **113**. P. 431.
6. Watabe Y., Kondo T., Imai H., Morita M. et al. // Anal. Chem. 2004. **76**. 105.
7. Watanabe T., Yamamoto H., Inoue K., Yamaguchi A. // J. Chromatogr. B. 2001. **762**. P. 1.
8. De Meulenaer B., Baert K., Lanckriet H., van Hoed V. et al. // Agric. Food Chem. 2002. **50**. P. 5273.
9. Ohkuma H., Abe K., Ito M., Kokado A., Kambegawa A. et al. // Analyst. 2002. **127**. P. 93.
10. Zhao M.-P., Li Y.-Z., Guo Zh.-Q., Zhang X.-X. et al. // Talanta. 2002. **57**. P. 1205.
11. Goda Y., Kobayashi A., Fukuda K., Fujimoto Sh. et al. // Water Sci. Technol. 2000. **42**. P. 81.
12. Matsunaga T., Ueki F., Obata K., Tajima H. et al. // Anal. Chimica Acta. 2003. **475**. P. 75.
13. Nishi K., Takai M., Morimune K., Ohkawa H. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2003. **67**. P. 1358.

Поступила в редакцию 10.04.06

SOLID-PHASE IMMUNOFERMENT ANALYSIS OF BISPHENOL A: INFLUENCE OF IMMUNOREAGENT STRUCTURES ON SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF ANALYSIS

A.S. Krapivin, Zh.V. Samsonova, N.A. Uskova, N.L. Ivanova, A.M. Yegorov

(Division of Chemical Enzymology)

A range of ELISAs in indirect and direct formats for the determination of bisphenol A was developed. Bisphenol A carboxymethyl ether, bisphenol A carboxypropyl ether and 4,4-bis(4-hydroxyphenyl)valeric acid were coupled with bovine serum albumin (immunogens for the production of polyclonal antibodies), ovalbumin and horseradish peroxidase. Analytical parameters of heterologous and homologous combinations of immunoreagents were compared. In general the indirect assay was more sensitive and specific than the direct one. Additionally, in the indirect assay using of heterologous combinations of immunoreagents allowed to increase assay sensitivity and specificity. The highest sensitivity was obtained for the antibodies produced against a conjugate of bisphenol A carboxypropyl ether with bovine serum albumin and a conjugate of 4,4-bis(4-hydroxyphenyl)valeric acid with ovalbumin. The detection limit of bisphenol A in phosphate buffer was 0.03 ng ml^{-1} . This combination of immunoreagents also demonstrated the highest specificity to bisphenol A since the antibodies cross-reacted only with 4-cumilphenol (11%), bisphenol E (5%) and bisphenol S (2 %).