

УДК 543.066; 57.083.3; 546.723'722-31

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ИММОБИЛИЗАЦИИ АНТИТЕЛ НА ПОВЕРХНОСТИ МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ В ПСЕВДОГОМОГЕННОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ АФЛАТОКСИНА В1

А.В. Петракова, А.Е. Урусов, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев

(Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru)

С использованием конъюгатов моноклональных антител против афлатоксина В1 (АФВ1) и магнитных частиц (МЧ) реализован псевдогомогенный иммуноферментный анализ (ИФА) АФВ1, включающий концентрирование АФВ1 из пробы на поверхности конъюгата МЧ-антитела, связывание конъюгата АФВ1-пероксидаза со свободными сайтами антител, отделение с помощью магнитного поля сформированных комплексов от непрореагировавших компонентов и регистрацию ферментативной активности связанной с МЧ пероксидазы. Сопоставлены препараты конъюгатов антител, полученные тремя способами – физической адсорбцией на нативных МЧ и ковалентным связыванием с оболочками МЧ, сформированными либо из олеиновой кислоты, либо из полистирола. Показано, что для этих препаратов ИФА характеризуется пределами обнаружения АФВ1 2,6; 0,4 и 0,6 нг/мл соответственно. Псевдогомогенный формат ИФА обеспечивает сокращение времени инкубации иммунореагентов до 5 мин (общая длительность анализа 20 мин) и позволяет концентрировать определяемый аналит из проб, что обуславливает его преимущества как средства высокочувствительного контроля токсичных контаминант в пищевой продукции.

Ключевые слова: магнитные частицы, иммуноферментный анализ, иммобилизация антител, афлатоксин В1.

В настоящее время конъюгаты магнитных частиц (МЧ) с антителами широко применяются в аналитической химии как для разделения сложных смесей, так и для специфической детекции разнообразных соединений [1–4]. Данные конъюгаты являются крайне эффективным аналитическим реагентом. Их диспергирование в большом объеме пробы обеспечивает быстрое связывание детектируемого соединения без диффузионных ограничений, характерных для гетерогенных биоаналитических систем. Последующее наложение магнитного поля позволяет быстро отделить сформировавшиеся иммунные комплексы от непрореагировавших компонентов и после отмывки количественно оценить содержание аналита. Такое сочетание преимуществ гомогенного (малая продолжительность аналитических стадий) и гетерогенного (отсутствие влияния матрикса на заключительный этап измерений) иммуноанализа позволяет говорить о псевдогомогенном формате иммуноанализа, основанного на использовании МЧ.

Антитела на поверхности МЧ иммобилизуют с использованием различных методик, которые имеют свои преимущества и недостатки и основыва-

ются как на более простой физической адсорбции, так и на более прочном ковалентном связывании [5]. Для проведения конъюгации поверхность частицы магнетита (смешанный оксид железа (II, III), являющийся наиболее распространенным материалом МЧ) может оставаться как свободной, так и покрытой различными соединениями – поверхностно-активными веществами (ПАВ), полимерами и др. [6]. В качестве реагентов, модифицирующих МЧ, проявили эффективность амфифильные органические молекулы, формирующие полислои на поверхности частиц, например, олеиновая кислота [7]. Для стабилизации МЧ в водном растворе активно используют создание полимерной оболочки [8]. Это связано с тем, что полимерные покрытия по сравнению с покрытиями на основе ПАВ обеспечивают большие силы отталкивания между частицами (минимизируют их агрегацию), а также проявляют меньшую чувствительность к изменениям pH и ионной силы среды.

Задача данной работы состояла в сравнении адсорбционной и ковалентной иммобилизации антител на поверхности МЧ как способов получения реагентов для иммуноанализа. В качестве объек-

тов выбраны нативные (немодифицированные) МЧ, а также МЧ, покрытые олеиновой кислотой или полистиролом. Эффективность получаемых конъюгатов оценивали на основании аналитических характеристик иммуноферментного определения афлатоксина В1 (АФВ1) – токсичного контаминанта продовольственной продукции [9].

Экспериментальная часть

Материалы и реагенты. В работе использованы хлориды железа (II) и железа (III), детергент тритон X-100, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), олеиновая кислота, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид, N-гидроксисукцинимид, этаноламин, конъюгат афлатоксина В1 с бычьим сывороточным альбумином (АФВ1-БСА) производства «Sigma-Aldrich» (США), афлатоксин В1 производства ООО «Хромресурс» (Россия), бычий сывороточный альбумин (БСА) («MP Biomedicals», США), магнитные частицы, покрытые полистиролом («Magsphery», США). Моноклональные антитела против афлатоксина В1 предоставлены ОАО «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения», Россия. Конъюгат АФВ1 с пероксидазой хрена (АФВ1-ПХ) предоставлен ООО «ИЛ-Тест Пушино», Россия. Остальные реагенты (растворители, компоненты буферных растворов и др.) имели марку «ч.д.а.» и выше.

Буферы для иммуноанализа: 50 мМ калий-фосфатный буфер, содержащий 100 мМ NaCl, pH 7,4 (ФБ); ФБ, содержащий 0,05% Тритон X-100 (ФБТ); ФБТ с 0,1% БСА (ФБТ-БСА).

Гетерогенный и псевдогомогенный ИФА проводили в оптически прозрачных 96-луночных полистироловых микропланшетах производства «Медполимер» (Россия). Для отмывки микропланшетов использовали промыватель Fluido 2 («Biochrom Anthos», Великобритания), оптическую плотность продуктов ферментативной реакции измеряли с помощью микропланшетного фотометра «Zenyth 3100» («Anthos Labtec Instruments», Австрия). Для магнитной сепарации применяли постоянный неодимовый магнит 30×30 мм («Мир магнитов», Россия) и магнит для микропланшетов «Magnetopure 96» («Chemicell», Германия). Регистрацию размеров частиц методом динамического светорассеяния проводили с использованием оптического анализатора «Zetasizer» («Malvern Instruments Ltd.», Великобритания).

Гетерогенный ИФА АФВ1. В лунках микропланшета в течение ночи при +4°C сорбировали антитела против АФВ1 в концентрации 1 мкг/мл

из 100 мкл ФБ. После четырехкратной отмывки лунок ФБТ вносили по 50 мкл раствора АФВ1, разбавленного до 150 мкл (0,3 нг/мл в ФБТ), добавляли по 50 мкл раствора АФВ1-ПХ в ФБТ в концентрации 300 нг/мл и инкубировали 1 ч при 37°C. Затем микропланшет четырежды отмывали ФБТ.

Для определения активности пероксидазы, связанной с поверхностью лунок, вносили раствор субстрата – 0,42 мМ ТМБ и 1,8 мМ H₂O₂ в 0,1 М натрий-цитратном буферном растворе, pH 4,0 (100 мкл на лунку). После 15 мин инкубации при комнатной температуре реакцию останавливали добавлением 100 мкл 1 М H₂SO₄. Оптическую плотность продукта окисления ТМБ измеряли при 450 нм.

Синтез МЧ [10]. К водному раствору, содержащему 1,4 мг/мл FeCl₂ и 3,6 мг/мл FeCl₃, по каплям добавляли 30%-й гидрат аммиака до концентрации 2,4%. Смесь инкубировали 15 мин при комнатной температуре и интенсивном перемешивании. Частицы осаждали магнитным полем, и после удаления надосадка ресуспендировали в исходном объеме в ФБ. Отмывку повторяли 5 раз. Конечную концентрацию суспензии контролировали взвешиванием аликвоты препарата, отмывого пятикратным осаждением в дистиллированной воде и полностью высушенного. Суспензии НЧ, а также их конъюгатов (см. ниже) хранили при +4°C.

Адсорбционная иммобилизация антител на МЧ. К 500 мкл полученной суспензии МЧ с концентрацией 3 мг/мл в ФБ добавляли раствор антител против АФВ1 (4,2 мг/мл) до их конечного содержания 60 мкг/мл. Раствор инкубировали 30 мин при интенсивном перемешивании. Модифицированные частицы осаждали магнитным полем и трижды промывали ФБ.

Получение МЧ, покрытых олеиновой кислотой ([11] с модификациями). 2 мл полученной суспензии МЧ с концентрацией 3 мг/мл в ФБ осаждали магнитным полем, добавляли 2 мл олеиновой кислоты и инкубировали 30 мин при комнатной температуре и перемешивании. Модифицированные частицы осаждали магнитным полем и трижды промывали ФБ.

Ковалентная иммобилизация антител на МЧ ([12] с модификациями). К 500 мкг МЧ, покрытых олеиновой кислотой или полистиролом, добавляли раствор 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида и N-гидроксисукцинимид в бидистиллированной воде до конечной концентрации каждого из активаторов 2,5 мг/мл. При комнатной температуре и перемешивании инкубировали 15 мин. Далее вносили раствор антител

против АФВ1 до конечной концентрации 500 мкг/мл и в том же режиме инкубировали 2 ч. Для блокировки непрореагировавших активированных групп на поверхности МЧ добавляли раствор 100 мМ этаноламина и в том же режиме инкубировали 10 мин. Частицы осаждали магнитным полем и трижды промывали ФБ.

Просвечивающая электронная микроскопия.

Для характеристики НЧ применяли описанную ранее [13] методику с использованием микроскопа «СХ-100» («Jeol», Япония). Фотографии в цифровой форме анализировали с помощью программы TotalLab v2.01 («Nonlinear Dynamics», Великобритания).

Псевдогомогенный ИФА АФВ1. АФВ1 в объеме 50 мкл вносили в лунки микропланшета в ряде разведений от 100 до 0,005 нг/мл в ФБТ-БСА. Добавляли по 50 мкл конъюгата АФВ1-ПХ в концентрации 300 нг/мл в ФБТ-БСА. Полученный раствор перемешивали в течение 10 с и приливали по 50 мкл конъюгата МЧ с антителами, концентрация которого в ФБТ-БСА составляла соответственно 56, 30 и 56 мкг/мл для МЧ, покрытых олеиновой кислотой, полистиролом, и не имеющих покрытия. Реагенты инкубировали при комнатной температуре и интенсивном перемешивании в течение 5 мин. Затем МЧ осаждали магнитным полем и промывали 4 раза ФБТ-БСА. Детекцию связанной ферментной метки проводили так же, как и в гетерогенном ИФА (см. выше).

Количественная обработка результатов ИФА. Зависимость оптической плотности (y) от концентрации антигена в пробе (x) аппроксимировали при помощи программы Origin 7.5 («Origin Lab», США), используя четырехпараметрическую функцию

$$y = (A - D)/(1 + (x/c)^B) + D.$$

С помощью полученной функции рассчитывали значения концентрации свободного антигена (АФВ1), при которых происходит ингибирование связывания на 10, 20 и 80% (IC_{10} , IC_{20} , IC_{80}). В соответствии с практикой интерпретации результатов ИФА [14] IC_{10} рассматривали как предел обнаружения метода, а IC_{20} и IC_{80} – как границы диапазона количественного определения содержания анализа.

Результаты и их обсуждение

Причина значительной (несколько часов) продолжительности микропланшетного ИФА – гетерогенное взаимодействие между иммунореагентами, находящимися в растворе и иммобилизованными на поверхности носителя (лунки микро-

планшета). Медленный диффузионный обмен слоев жидкости, находящихся на разных расстояниях от носителя, препятствует сокращению времени анализа [15, 16]. Гомогенные системы иммуноанализа лишены данного недостатка, но в них образовавшиеся иммунные комплексы не отделяются от непрореагировавших молекул, поэтому влияние матрикса проб препятствует высокочувствительному выявлению анализа [15, 17].

С учетом преимуществ и недостатков гомогенных и гетерогенных иммуноаналитических методов представляется целесообразным объединить в одной схеме быстрое образование иммунных комплексов в растворе и их эффективную детекцию в гетерогенных системах. Использование МЧ дает возможность значительно увеличить площадь поверхности для иммобилизации реагентов, равномерно распределить их по объему реакционной среды, тем самым ускоряя иммунохимические взаимодействия.

Характеристика антител. Антитела против АФВ1 были предварительно охарактеризованы методом гетерогенного ИФА, оптимизированным для достижения минимального предела детекции АФВ1. При оптимальных параметрах проведения анализа (концентрация реагентов, продолжительность стадий) предел детекции АФВ1 составил 2,5 нг/мл (рис. 1).

Определение размерных характеристик МЧ. Просвечивающая электронная микроскопия нативных и покрытых олеиновой кислотой МЧ показала, что в обоих случаях препарат состоит из мелких частиц, формирующих агрегаты и цепочки. При выделении на микрофотографиях изображений индивидуальных МЧ установлено, что их средний диаметр равен $9,1 \pm 3,2$ нм, а форма близка к сферической (коэффициент эллиптичности 1,4).

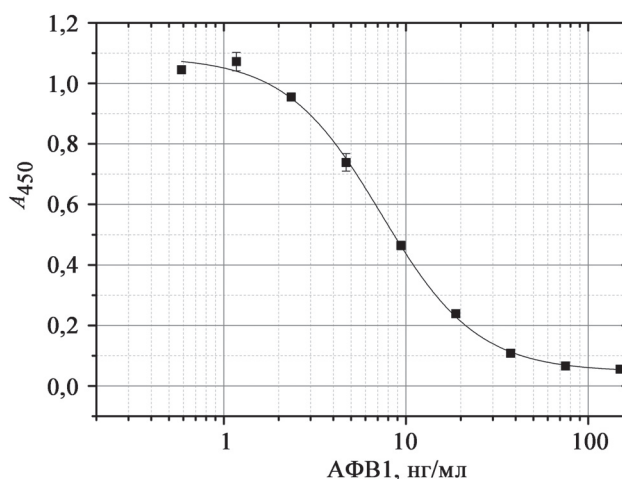


Рис. 1. Градуировочная кривая гетерогенного ИФА АФВ1 ($IC_{10} = 2,5$; $IC_{20} = 3,2$; $IC_{50} = 7,3$; $IC_{80} = 16,9$ нг/мл)

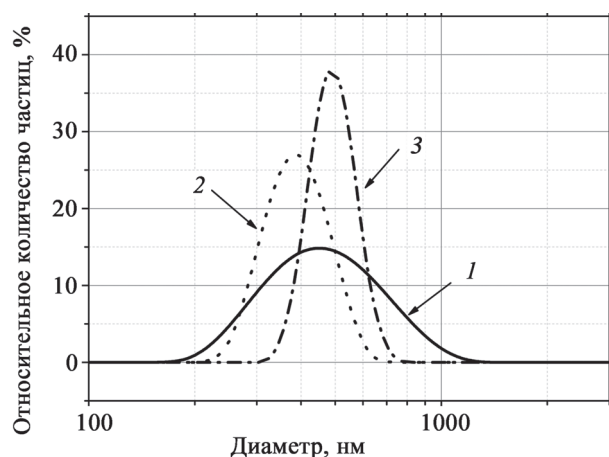


Рис. 2. Распределение МЧ по среднему диаметру, измеренному методом динамического светорассеяния: 1 – нативные МЧ; 2 – МЧ, покрытые олеиновой кислотой; 3 – МЧ, покрытые полистиролом

Размеры агрегатов существенно варьировали – от десятков до сотен нанометров.

Учитывая, что при проведении электронной микроскопии возможна артефактная агрегация детектируемых частиц, происходящая при их иммобилизации на подложке, дополнительно было охарактеризовано состояние частиц в растворе с использованием метода динамического светорассеяния (ДСР). Для нативных, покрытых олеиновой кислотой и покрытых полистиролом МЧ средние диаметры, определенные методом ДСР, составили 489, 393 и 493 нм соответственно (рис. 2). Полученные результаты отражают высокую степень агрегации МЧ в исходных суспензиях, которые, однако, существенно (в 70–100 раз) разбавляются при проведении ИФА.

Адсорбционная иммобилизация антител. Физическая адсорбция основана на гидрофобных, электростатических, водородных и ван-дерваальсовых силах, возникающих между антителами и поверхностью МЧ. Она является наиболее простым методом иммобилизации, не требующим модификации ни антител, ни МЧ.

Важная задача при получении конъюгатов – определение количества добавляемых при адсорбции антител, обеспечивающего лучшие аналитические результаты и в то же время исключающего перерасход реагента.

Связывание антител с поверхностью МЧ оценивали по разнице между количеством антител, добавляемых в начале иммобилизации, и количеством несвязавшихся антител, оставшихся в растворе после завершения иммобилизации и магнитной сепарации носителя со связанными антителами. Определение содержания антител в надосадочных жидкостях проводили методом

гетерогенного ИФА, сравнивая концентрационные зависимости связывания тестируемых и стандартного препаратов антител против АФВ1 с иммобилизованным конъюгатом АФВ1-БСА.

Концентрацию антител, добавляемых для иммобилизации, варьировали от 8 до 60 мкг/мл. На основании полученной зависимости (таблица) была выбрана концентрация антител, равная 60 мкг/мл, что при синтезе соответствует добавлению 1 мкг антител к 50 мкг МЧ. Полученные препараты не агрегируют в растворе и не изменяют иммунохимических свойств при хранении в течение ≥ 3 месяцев при $+4^{\circ}\text{C}$.

Ковалентная иммобилизация антител. Ковалентное связывание – более сложный, многостадийный способ иммобилизации антител, однако он обеспечивает получение конъюгатов с более стабильными свойствами [5]. Мы использовали наиболее часто применяемый для МЧ подход, основанный на образовании связей между первичными аминами антител и карбоксильными группами, введенными в покрытие частицы. Для повышения скорости реакции и обеспечения высокого выхода продукта использовали активаторы – N-гидроксисукцинимид и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид [18].

Сопоставлены два варианта покрытия МЧ. Первый тип оболочки формировали из адсорбированных молекул олеиновой кислоты. Второй тип оболочки представлял собой слой полистирола, имеющий карбоксильные группы на поверхности (коммерческий препарат МЧ).

На основании анализа концентрационных зависимостей связывания показано, что количество антител, оптимальное для получения стабильных конъюгатов методом физической адсорбции, недостаточно при ковалентном связывании. В качестве оптимальной для иммобилизации на МЧ, покрытых как олеиновой кислотой, так и карбоксилированным полистиролом, была выбрана концентрация антител, равная 500 мкг/мл.

Характеристика степени связывания антител на поверхности МЧ при адсорбционной иммобилизации

Концентрации антител, мкг/мл		Степень связывания антител, %
добавленных	связанных	
8	3,7	46
15	8,9	59
30	13,4	45
60	17	28

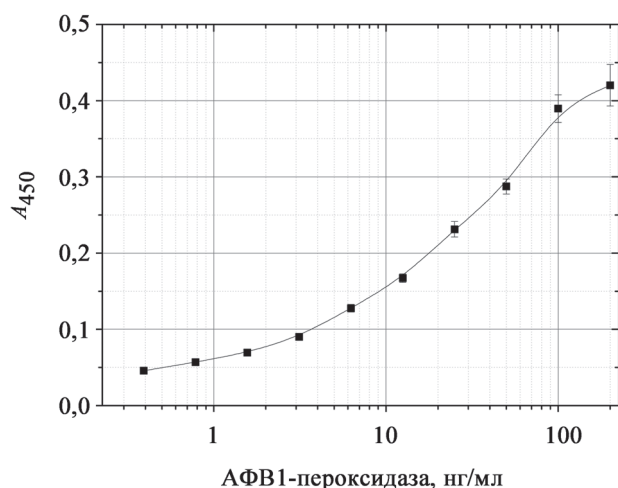


Рис. 3. Связывание конъюгата АФВ1-пероксидаза с конъюгатом МЧ-антитела, полученным методом адсорбции (по оси ординат – оптическая плотность продукта пероксидазной реакции)

Определение антигенсвязывающих свойств полученных конъюгатов. К суспензиям конъюгатов в постоянной концентрации добавляли растворы конъюгата АФВ1-пероксидаза в разных концентрациях и после инкубации и отмывки регистрировали каталитическую активность связавшейся ферментной метки. На рис. 3 в качестве примера представлена концентрационная зависимость для конъюгата, полученного методом адсорбции. Все три концентрационные зависимости подтверждают иммобилизацию антител на поверхности МЧ и сохранение у них антигенсвязывающих свойств.

Применение конъюгатов МЧ в псевдогомогенном ИФА АФВ1. В предлагаемом псевдогомогенном иммуноанализе все иммунохимические взаимодействия происходят на поверхности МЧ, равномерно распределенных в реакционной среде.

Приложение магнитного поля разделяет реагенты так же, как и отмывка в обычном ИФА (рис. 4). На первой стадии анализа происходит конкуренция свободного АФВ1 и конъюгата АФВ1-пероксидаза за сайты связывания антител (рис. 4, а). Последующие стадии включают магнитную сепарацию, отмывку комплексов МЧ-антитела-антиген от непрореагировавших компонентов (рис. 4, б, в) и взаимодействие с субстратом для определения активности связанной пероксидазной метки (рис. 4, г). Оптимизированная длительность конкурентной стадии ИФА благодаря исключению диффузионных затруднений составляет 5 мин для всех трех используемых конъюгатов МЧ. Суммарная продолжительность ИФА для всех трех препаратов составляет 20 мин. Использование в анализе МЧ обеспечило четырехкратное ускорение этого процесса по сравнению с гетерогенным ИФА.

Проведена оптимизация концентрации специфических компонентов, направленная на максимальное снижение предела детекции при сохранении значимой амплитуды градуировочной кривой. В выбранных условиях получены зависимости величины оптической плотности от концентрации свободного АФВ1 (рис. 5). При использовании конъюгатов, синтезированных методом физической адсорбции, предел обнаружения АФВ1 составил 2,6 нг/мл (рис. 5, а), что принципиально не отличается от гетерогенного ИФА. Варианты ИФА с ковалентной иммобилизацией антител характеризовались близкими величинами предела обнаружения АФВ1 – 0,4 и 0,6 нг/мл для частиц, покрытых олеиновой кислотой (рис. 5, б) и карбоксилированным полистиролом (рис. 5, в) соответственно. Как видим, использование ковалентной иммобилизации антител на поверхности МЧ

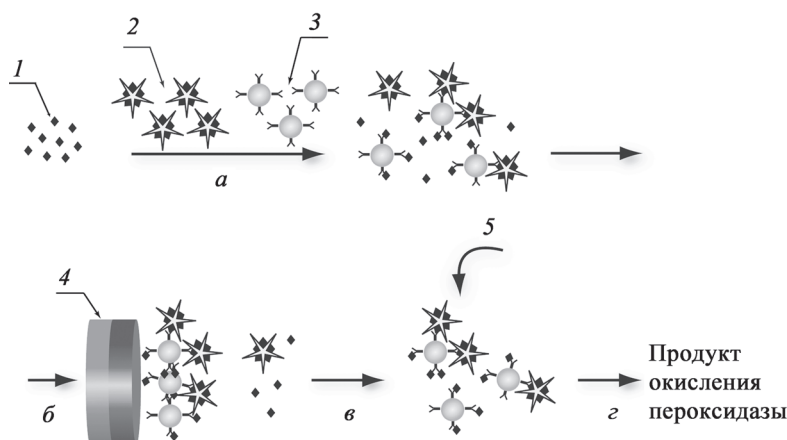


Рис. 4. Схема ИФА с использованием МЧ: 1 – проба, содержащая АФВ1; 2 – конъюгат АФВ1 с пероксидазой; 3 – конъюгат МЧ с антителами против АФВ1; 4 – магнит; 5 – субстрат пероксидазы. Стадии ИФА (а–г) охарактеризованы в тексте статьи

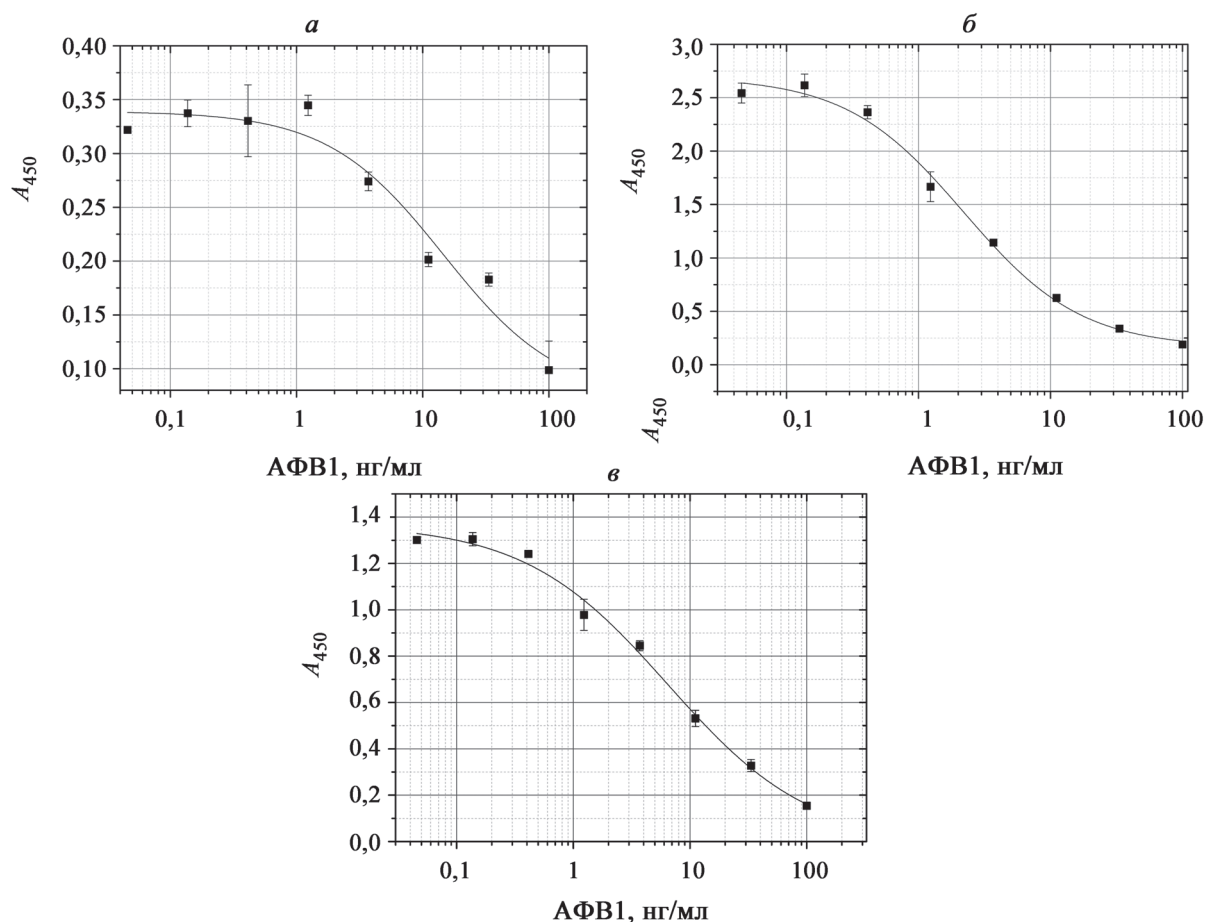


Рис. 5. Градуировочные кривые псевдогомогенного ИФА АФВ1 с использованием конъюгатов: А – нативных МЧ ($IC_{10} = 2,6$; $IC_{20} = 3,4$; $IC_{50} = 14,6$; $IC_{80} = 63,2$ нг/мл); Б – МЧ, покрытых олеиновой кислотой ($IC_{10} = 0,41$; $IC_{20} = 0,53$; $IC_{50} = 2,2$; $IC_{80} = 9,1$ нг/мл); В – МЧ, покрытых полистиролом ($IC_{10} = 0,65$; $IC_{20} = 0,9$; $IC_{50} = 6,4$; $IC_{80} = 45,9$ нг/мл)

позволяет снизить предел детекции по сравнению с адсорбцией. Это может быть связано с меньшей долей антител, утрачивающих при иммобилизации реакционную способность, которая для адсорбции на полистироле, по существующим оценкам, может достигать 97% [19]. Дополнительным аргументом в пользу этой интерпретации является существенно бóльшая (в 4–8 раз) амплитуда градуировочных кривых на рис. 5, б, в (ковалентная иммобилизация) по сравнению с рис. 5, а (адсорбционная иммобилизация), несмотря на близкие значения концентрации используемых в анализе конъюгатов МЧ-антитела.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы»; соглашение о предоставлении субсидии № 14.607.21.0015 от 05.06.2014, уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60714X0015.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Xie L., Jiang R., Zhu F., Liu H., Ouyang G. // Anal. Bioanal. Chem. 2014. Vol. 406. N 2. P. 377.
2. Lee E.A., Yim H., Heo J., Kim H., Jung G., Hwang N.S. // Arch. Pharm. Res. 2014. Vol. 37. N 1. P. 120.

3. Li C., Ma C., Wang F., Xi Z., Wang Z., Deng Y., He N. // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2012. Vol. 12. N 4. P. 2964.
4. Colombo M., Carregal-Romero S., Casula M.F., Gutiérrez L., Morales M.P., Böhm I.B., Heverhagen J.T., Prosperi D., Parak W.J. // *Chem. Soc. Rev.* 2012. Vol. 41. N 11. P. 4306.
5. Montenegro J.-M., Grazu V., Sukhanova A., Agarwal S., Fuente J.M. de la, Nabiev I., Greiner A., Parak W.J. // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2013. Vol. 65. N 5. P. 677.
6. Xie J., Huang J., Li X., Sun S., Chen X. // *Curr. Med. Chem.* 2009. Vol. 16. N 10. P. 1278.
7. Zhang L., He R., Gu H.-C. // *Appl. Surf. Sci.* 2006. Vol. 253. N 5. P. 2611.
8. Hybrid latex particles: preparation with (mini) emulsion polymerization / Ed. A.M. van Herk, K. Landfester. Berlin; Heidelberg, 2010. 287 p.
9. Mycotoxins: detection methods, management, public health and agricultural trade / Ed. J.F. Leslie, R. Bandyopadhyay, A. Visconti. Oxfordshire, 2008. 480 p.
10. Urusov A.E., Petrakova A.V., Vozniak M.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Sensors (Basel)*. 2014. Vol. 14. N 11. P. 21843.
11. Liu Z.L., Yang X.B., Yao K.L., Du G.H., Liu Z.S. // *J. Magnetism Magn. Mater.* 2006. Vol. 302. N 2. P. 529.
12. Puertas S., Batalla P., Moros M., Polo E., Pino P., Guisan J.M., Grazu V., Fuente J.M. // *ACS Nano*. 2011. Vol. 5. N 6. P. 4521.
13. Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Sveshnikov P.G., Dzantiev B.B. // *Anal. Chim. Acta*. 2011. Vol. 701. N 2. P. 209.
14. Sittampalam G.S., Smith W.C., Miyakawa T.W., Smith D.R., McMorris C. // *J. Immunol. Methods*. 1996. Vol. 190. N 2. P. 151.
15. Wild D. The immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques. Oxford, 2013. 1036 p.
16. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М., 1991. 288 с.
17. Gosling J.P. // *Clin. Chem.* 1990. Vol. 36. N 8. P. 1408.
18. Hermanson G.T. Bioconjugate techniques. London, 2008. 929 p.
19. Butler J., Ni L., Nessler R., Joshi K., Suter M., Rosenberg B., Chang J., Brown W., Cantarero L. // *J. Immunol. Methods*. 1992. Vol. 150. N 1. P. 77.

Поступила в редакцию 30.07.15

COMPARISON OF TECHNIQUES FOR ANTIBODIES IMMOBILIZATION ON THE SURFACE OF MAGNETIC PARTICLES IN PSEUDO-HOMOGENEOUS IMMUNOENZYME ASSAY OF AFLATOXIN B1

A.V. Petrakova, A.E. Urusov, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev

(A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Centre of Biotechnology Russian Academy of Sciences)

Pseudo-homogeneous enzyme immunoassay (EIA) of aflatoxin B1 (AFB1) has been realized with the use of conjugates between monoclonal antibodies against AFB1 and magnetic particles (MP). The assay includes concentration of AFB1 from the tested sample on the surface of the MP-antibody conjugate, binding of AFB1-peroxidase conjugate with free sites of the antibodies, separation of formed complexes from unreacted components by magnetic field, and registration of enzymatic activity for peroxidase label bound with the MP. The preparations of antibody conjugates were obtained by three ways, physical adsorption on native MP and covalent binding to MP covers formed by oleic acid or polystyrene, and compared. EIA for these conjugates has limits of AFB1 detection equal to 2.6; 0.4 and 0.6 ng/mL, respectively. The pseudo-homogeneous EIA format enables reduction of immunoreagents incubation to 5 min (total duration of the analysis is 20 min) and allows to concentrate the analyte from the tested samples. These features determine advantages of the proposed assay as a tool for high sensitive control of toxic contaminants in food stuffs.

Key words: magnetic nanoparticles, immunoenzyme assay, immobilization of antibodies, aflatoxin B1.

Сведения об авторах: *Петракова Алина Викторовна* – аспирант Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (alina.petrakova@gmail.com); *Урусов Александр Евгеньевич* – науч. сотр. Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (urusov.alexander@gmail.com); *Жердев Анатолий Витальевич* – вед. науч. сотр. Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. биол. наук (zherdev@inbi.ras.ru); *Дзантиев Борис Борисович* – заместитель директора по научной работе Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, профессор, докт. хим. наук (dzantiev@inbi.ras.ru).