

УДК 543.257.5.138.081.08.577.15:865:632.954

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТ СВЯЗЫВАНИЯ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ ПО ДАННЫМ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ

*М.П. Кутырева, Э.П. Медянцева, Е.В. Халдеева,
А.Р. Гатаулина, Н.А. Улахович, Г.К. Будников*

Аннотация

Найдены константы связывания (K_d) иммунных комплексов, рассчитанные по графику Скэтчарда с помощью амперометрических био- и иммуноферментных сенсоров. Рассчитанные значения констант связывания антигенов *Candida albicans*, *Phytophthora infestans* и *Trichophyton rubrum* и пестицидов 2,4-Д, 2,4,5-Т и сим-1,3,5-триазинов с соответствующими антителами находятся в интервале от $(2.3 \pm 0.4) \cdot 10^7$ до $(5.4 \pm 0.2) \cdot 10^{12}$, что обеспечивает эффективность иммуноанализа.

Ключевые слова: метод Скэтчарда, константы связывания, иммунный комплекс антитело – антиген.

Введение

Имунохимические методы анализа, основанные на специфическом связывании определяемого соединения с соответствующими антителами, в последнее время все чаще используются в различных областях медицины, сельского хозяйства, микробиологической и пищевой промышленности, а также для целей эколого-аналитического мониторинга, в частности для определения остаточных количеств гербицидов. Разнообразие компонентов в объектах анализа от низкомолекулярных соединений, гормонов и лекарственных препаратов до вирусов, бактерий или патогенных грибов требует при разработке вариантов иммуноопределений тщательного исследования влияния различных факторов и количественных оценок происходящих в изучаемых системах взаимодействий. Знание физико-химических характеристик специфических взаимодействий антител с соответствующими антигенами (или низкомолекулярными биологически активными веществами) оказывается весьма полезным, поскольку позволяет оценить чувствительность и специфичность метода, осуществить правильный подбор реагентов для иммунохимического анализа.

В связи с интенсивным использованием ферментов в иммобилизованном состоянии методы получения различных нерастворимых производных соединений белковой природы хорошо разработаны. Многие из них эффективны и для получения иммобилизованных антител. Именно в таком виде они используются в большинстве иммуносенсоров. Применение для анализа раствора антител является менее предпочтительным по причине большего расхода их, увеличения времени единичного определения, что приводит в конечном итоге к увеличению

стоимости иммуноанализа. Использование же в иммобилизованном состоянии антител (Ат) (или антигенов (Аг)) в составе биочувствительной части иммуносенсоров является на сегодняшний день наиболее перспективным с технологической и экономической точек зрения.

Определение константы связывания (аффинности) антител в сыворотке или выделенных в очищенном виде представляет собой достаточно сложную как экспериментальную, так и теоретическую задачу. Трудности обусловлены, во-первых, гетерогенностью антител по физико-химическим свойствам, в том числе по сродству к антигену, во-вторых, возможностью образования комплексов сложного состава. Для разработки методов иммунохимического анализа достаточно знать эффективные значения констант связывания, характеризующие свойства используемых антител в конкретных условиях. Наиболее распространенным способом определения K_A является метод Скэтчарда [1]. Следует отметить, что метод Скэтчарда применим не только к системам антиген – антитело, но и достаточно успешно используется в исследовании прочности комплексов металлов с некоторыми нуклеиновыми кислотами и основаниями.

Для построения графика Скэтчарда необходимо знать равновесную концентрацию комплекса Ат – Аг. Методы, традиционно используемые для этого можно условно разделить на две больших группы. К первой относятся методы, в которых стадия разделения свободного и связанного Аг осуществляется путем избирательного осаждения, аффинного связывания или гельфильтрации. В частности, для изучения специфичности антител применялся и такой известный в иммунохимии метод, как капиллярный электрофорез [2].

Вторая группа включает методы, базирующиеся на изменении физико-химических свойств Аг (или меток, связанных с Аг) при связывании с Ат: тушении флуоресценции и биолюминисценции, изменении степени поляризации или усилении флуоресценции, ингибировании ферментативной активности (спектральные методы, метод Лоури, определение белков по Бредфорду) [3, 4]. Для определения констант связывания антител с низкомолекулярными соединениями, например стероидными гормонами (тестостерона), используются и методы хроматографии [5].

Следует отметить, что использование упомянутых методов для определения микроколичеств белка или хроматографии для определения малых концентраций низкомолекулярных соединений не всегда дает ожидаемый результат.

В то же время достаточно низкие концентрации белков можно определять электрохимическими методами, например, используя электрокаталитические реакции. Применение таких реакций имеет порог концентрационной чувствительности, составляющий $\sim 10^{-10}$ моль/л. Для определения микроколичеств низкомолекулярных соединений, в частности пестицидов, возможно использование соответствующих биосенсоров [6].

Разработка способов иммунохимического анализа физиологически активных соединений как в биологических жидкостях, так и в объектах окружающей среды требует количественной оценки специфичности определений. Прочность образующихся в ходе определения иммунных комплексов является одним из факторов, способствующих, например, селективному извлечению анализируемого соединения из пробы, содержащей смесь различных компонентов [6]. Знание

этих величин может быть весьма полезным как на стадии разработки новых вариантов иммуноанализа, так и при практическом их выполнении.

Цель настоящего исследования – определение констант связывания (K_A) специфических иммунных комплексов некоторых биологически активных соединений с иммобилизованными антителами для разработки и совершенствования методик определения антигенов, а также выбора лучших условий проведения иммунохимических определений. Возможности вольтамперометрии в определении K_A показаны на примере иммунных комплексов как высокомолекулярных соединений – антигенов *Candida albicans*, *Phythophthora infestans*, *Trichophyton rubrum* [7], так и низкомолекулярных – соединений производных хлорфеноксиксусной кислоты (2,4-Д, 2,4,5-Т) и представителей сим-1,3,5-триазинов (симазина и атразина) и соответствующих Ат против них.

1. Экспериментальная часть

Экспериментальная часть выполнена на осциллографическом полярографе ПО-5122 модель 03 и потенциостате ПИ 50-1.1, совмещенном с ячейкой, термостатированной при 25.0 ± 0.2 °С. Рабочими электродами служили амперометрические иммуноферментные сенсоры (ИФС) на основе совместно иммобилизованных Ат и бутирилхолинэстеразы (ХЭ) (для изучения иммунных комплексов *Candida albicans*, *Phythophthora infestans* и *Trichophyton rubrum*) [8] и амперометрический биохимический сенсор на основе иммобилизованной ХЭ (для изучения 2,4-Д, 2,4,5-Т и сим-1,3,5-триазинов) [9]. Электрод сравнения – насыщенный каломельный электрод (нас. к.э.).

Разработанные амперометрические ИФС для определения антигенов состоят из специфической мембраны (биочувствительной части) и детектирующего элемента (трансдьюсера), в качестве которого служил стационарный ртутно-пленочный электрод с серебряной подложкой, представляющий собой серебряную проволоку ($d = 0.5$ мм), впаянную или вставленную в стекло с помощью эпоксидного клея марки ЭДП. Торец электрода шлифовали до зеркальной поверхности и для получения рабочей поверхности опускали на 2 мин в металлическую ртуть. Иммунохимическая система для определения гербицидов 2,4-Д и 2,4,5-Т, а также сим-1,3,5-триазинового ряда (симазина и атразина) включает в себя биохимический сенсор на основе иммобилизованной ХЭ [25] и иммобилизованные Ат к данным гербицидам.

Для получения сенсорной части ИФС и амперометрического биосенсора использовали нитрат целлюлозы типа коллоксилин со средним содержанием азота 11.5–12%, органические растворители (толуол, бутилацетат, гексан) марки «х.ч.» и 25%-ный раствор глутарового альдегида марки Reanal.

Растворенный кислород удаляли из исследуемых растворов током электролитически генерированного водорода, во время регистрации осцилловольтамперограммы газ пропускали над раствором. Использовали боратный буферный раствор, pH 9.05 + 0.05.

Антигены *Candida albicans*, *Phythophthora infestans*, *Trichophyton rubrum* и соответствующие антитела к ним были получены в лаборатории по разработке грибковых аллергенов Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии. Растворы Ат *Candida albicans*, *Phythophthora infestans* и *Trichophyton rubrum* готовили

по точной навеске в бидистиллированной воде. Исходные концентрации водных растворов Аг *Candida albicans* и *Phytophthora infestans*, *Trichophyton rubrum* определяли спектрофотометрически при $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $\lambda = 280\text{ нм}$. Исходные концентрации Аг составили: $1.6 \cdot 10^{-5}$ моль/л для Аг *Candida albicans*, 0.057 мг/мл для Аг *Phytophthora infestans* и 0.88 мг/мл для *Trichophyton rubrum*. Исходные концентрации Ат в разведении 1 : 10 составили: 0.625 мг/мл для Ат к *Candida albicans*, 1.86 мг/мл для Ат к *Phytophthora infestans* и 1.40 мг/мл для Ат к *Trichophyton rubrum*. Традиционно в реакциях биоспецифического взаимодействия применяют понятие «разведение Ат», которое и было использовано в работе при анализе с Аг.

Использовали хроматографически чистые гербициды: 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), 2,4,5-трихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4,5-Т), 2-хлоро-4,6-бис(этиламино)-сим-триазин (симазин), 6-изопропиламино-2-хлоро-4-этиламино-сим-триазин (атразин). Водные растворы исследуемых гербицидов и Ат к ним готовили путем их растворения в небольшом объеме этанола, а затем в бидистиллированной воде.

Применяли моноклональные антитела против 2,4-Д марки 41 E2/62 ABCIT и поликлональные Ат к 2,4,5-Т марки Immunotech Lot 230192, к симазину марки Sima-2 Lot-A2 и Ат к атразину марки Agina-3988 Lot-A9, полученные на кафедре химической энзимологии МГУ. Концентрации водных растворов Ат к симазину и атразину составили: 0.065 мг/мл к 2,4-Д, 0.044 мг/мл к 2,4,5-Т, 0.049 и 0.076 мг/мл для Ат к симазину и 0.058 и 0.084 мг/мл для Ат к атразину.

Применяли препарат ХЭ сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8) активностью 110 АЕ/мг. В качестве субстрата ХЭ использовали перекристаллизованный бутирилтиохолин иодид (БТХИ), раствор которого готовили по точной навеске в боратном буферном растворе и использовали в течение не более трех часов.

Аналитическим сигналом служила высота катодного пика при потенциале -0.55 В , относящегося к обратимому восстановлению меркаптида ртути, образующегося в результате взаимодействия продукта спонтанного гидролиза бутирилтиохолин иодида – тиола с материалом электрода (ртутью). При обработке вольтамперограмм за высоту пика принимали высоту перпендикуляра, опущенного из вершины пика на касательную к конечному участку кривой. Измерения потенциала проводили с точностью до 0.01 В. Величина аналитического сигнала зависит от активности иммобилизованной ХЭ, которая связана с наличием в растворе эффекторов фермента. В присутствии изучаемых соединений наблюдали изменение величины катодного пика при потенциале -0.55 В вследствие ингибирования или активирования иммобилизованной ХЭ как непосредственно изучаемыми биологически активными веществами, так и в некоторых случаях иммунными комплексами [10].

Графическое определение равновесных молярных концентраций иммунного комплекса, антигена и антител возможно исходя из графика Скэтчарда [1]. Концентрацию образовавшегося иммунного комплекса Аг – Ат при постоянной концентрации Ат, используемых для иммобилизации, находили по разности между общей концентрацией Аг и оставшейся в растворе после образования иммунного комплекса.

Методика определения концентрации свободного Аг. В мерную колбу на 5 мл вносили 0.5 мл стандартного раствора БТХИ с концентрацией $2.7 \cdot 10^{-2}$ моль/л (СА) или $2.3 \cdot 10^{-2}$ моль/л (PhI), затем от 0.05 до 0.5 мл стандартного раствора Аг СА с концентрацией $1.6 \cdot 10^{-9} - 1.6 \cdot 10^{-5}$ моль/л или PhI с концентрацией $6 \cdot 10^{-7} - 6 \cdot 10^{-5}$ моль/л или TrR с концентрацией $5 \cdot 10^{-8} - 9 \cdot 10^{-6}$ мг/мл доводили до метки боратным буферным раствором с pH 9.05 ± 0.05 . В полученный раствор помещали биочувствительную часть соответствующего ИФС, содержащую совместно иммобилизованные Аг и ХЭ. Инкубировали в течение 15 мин. В результате на поверхности биочувствительной части ИФС образовывался соответствующий иммунный комплекс. Затем биочувствительную часть вынимали и раствор переносили в электрохимическую ячейку. Туда же помещали новую биочувствительную мембрану и инкубировали в течение 15 мин. Кислород удаляли током электролитически генерированного водорода. Снимали вольтамперограмму в интервале потенциалов от -0.1 до -1.0 В ($v = 1$ В/с, $E_0 = -0.1$ В). Измеряли высоту катодного пика при потенциале -0.55 В.

Оставшуюся после образования иммунного комплекса концентрацию Аг определяли с помощью соответствующего амперометрического ИФС [19–21] по градуировочным графикам, описываемым уравнениями:

$$\text{для СА} \quad Y = -(0.58 \pm 0.03) \lg X + (14.3 \pm 0.4), \quad r = -0.9947,$$

$$\text{для PhI} \quad Y = -(0.214 \pm 0.004) \lg X + (7.3 \pm 0.1), \quad r = -0.9975,$$

$$\text{для TrR} \quad Y = -(0.032 \pm 0.012) \lg X + (5.53 \pm 0.02), \quad r = -0.9988.$$

Методика определения концентрации свободного гербицида. Иммобилизованные антитела помещали в 4.5 мл исследуемого раствора, содержащего пестицид, инкубировали в течение 5 мин. В результате образовывался иммунный комплекс. Затем пленку с образовавшимся на поверхности иммунным комплексом иммобилизованные Аг – гербицид вынимали, а раствор помещали в электрохимическую ячейку с амперометрическим холинэстеразным биосенсором [8] и насыщенным каломельным электродом, в которую предварительно вводили 0.5 мл стандартного раствора БТХИ с концентрацией $2 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Удаляли кислород в течение 15 мин током электролитически генерированного водорода и снимали вольтамперограмму в интервале потенциалов от -0.1 до -1.0 В ($v = 1$ В/с, $E_0 = -0.1$ В, непрерывный режим поляризации, треугольная развертка потенциала). Измеряли высоту катодного пика при потенциале $E = -0.55$ В. Концентрацию гербицида, не связавшегося в иммунный комплекс, определяли по градуировочным графикам, описываемым соответствующими уравнениями.

Построение градуировочного графика для определения концентрации 2,4-Д, 2,4,5-Т, симазина и атразина (после образования соответствующих иммунных комплексов). В мерную колбу на 5 мл вносили 0.5 мл стандартного раствора БТХИ с концентрацией $2 \cdot 10^{-2}$ моль/л, затем от 0.05 до 0.5 мл стандартного раствора 2,4-Д или 2,4,5-Т в интервале концентраций $1 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, симазина в интервале концентраций $1 \cdot 10^{-11} - 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, а атразина в интервале концентраций $1 \cdot 10^{-10} - 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л и доводили до метки дистиллированной водой. Переносили в электрохимическую ячейку с насыщенным каломельным электродом и биохимическим холинэстеразным сенсором. Удаляли кислород

в течение 15 мин током электролитически генерированного водорода и снимали вольтамперограмму, как описано выше. Градуировочные графики зависимости тока пика при потенциале -0.55 В от отрицательного значения логарифма концентрации гербицида описываются уравнениями :

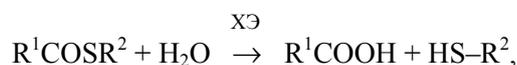
$$\begin{aligned} Y &= (0.05 \pm 0.01) \lg X - (4.06 \pm 0.07), & r &= 0.9945 \text{ (для 2,4-Д)}, \\ Y &= (0.13 \pm 0.01) \lg X - (3.23 \pm 0.05), & r &= 0.9964 \text{ (для 2,4,5-Т)}, \\ Y &= (0.54 \pm 0.07) \lg X - (1.3 \pm 0.5), & r &= 0.9991 \text{ (для симазина)}, \\ Y &= (0.4 \pm 0.1) \lg X - (3.7 \pm 0.3), & r &= 0.9872 \text{ (для атразина)}. \end{aligned}$$

Полученные данные использовали для построения графика в координатах Скэтчарда.

2. Обсуждение результатов

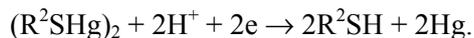
Количественное изучение устойчивости комплексных соединений с участием биологически активных соединений по константам связывания, рассчитываемым по методу Скэтчарда, основано на определении равновесной концентрации соответствующего иммунного комплекса. Использование высокочувствительных методов вольтамперометрии и аналитические возможности био- и иммуносенсоров позволили упростить процедуру определения равновесной концентрации и сделать доступными исследования в отдельных случаях в области концентраций на уровне фемтомолей, что соответствует реакционной способности большинства физиологически активных соединений (антигенов) в живом организме.

Известно, что ХЭ катализирует гидролиз тиохолиновых эфиров. В присутствии иммобилизованной ХЭ (ИХЭ) происходит гидролиз специфических субстратов ХЭ



где R^1 : $-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{C}_3\text{H}_7$, $-\text{C}_4\text{H}_9$; R^2 : $-(\text{CH}_2)_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Г}$.

Второй продукт реакции, содержащий SH-группу электрохимически активен и может взаимодействовать с материалом электрода (ртутью) и восстанавливаться при определенных условиях в доступной области потенциалов:



Наибольшая величина аналитического сигнала наблюдается при использовании фермент-субстратной пары бутирилХЭ – БТХИ.

Равновесную концентрацию комплекса определяли, используя разработанные ИФС и иммунохимических системы, в основе действия которых лежит сочетание представленных выше биокаталитической и электрохимической реакций со специфическими иммунохимическими взаимодействиями в изучаемых системах. Высокая специфичность биокаталитического и иммунохимического процессов обеспечивает надежность и точность определений.

Равновесную концентрацию иммунного комплекса можно рассчитать по разности между общей концентрацией Аг (или пестицида) и оставшейся в растворе после образования иммунного комплекса или с помощью разработанных

амперометрических ИФС или амперометрического холинэстеразного биосенсора [8, 9].

Проводили оценку величин констант связывания антител к СА, PhI и TrR, входящих в биочувствительную часть разработанных ИФС. Равновесную концентрацию иммунного комплекса Аг – Ат при постоянной концентрации Ат, используемых для иммобилизации, находили по разности между общей концентрацией Аг и оставшейся в растворе после образования Аг – Ат. Определяли K_A для Ат к СА и TrR в разведении 1 : 20 и для Ат к PhI в разведении 1 : 100. Рабочие области концентраций для определения констант связывания Ат к СА составляли $1.6 \cdot 10^{-11} - 1.6 \cdot 10^{-7}$ моль/л, Ат к PhI – $6 \cdot 10^{-9} - 6 \cdot 10^{-7}$ моль/л и Ат к TrR – $5 \cdot 10^{-9} - 9 \cdot 10^{-7}$ мг/мл.

Чаще всего, Ат, вырабатываемые организмом против Аг, представляют собой неоднородную популяцию, поэтому графики, построенные в координатах Скэтчарда, отображают нелинейную зависимость, которую можно аппроксимировать двумя прямыми, выделив из гетерогенной смеси Ат две популяции, значения констант связывания которых отличаются. Полученные данные использовали для построения графиков в координатах Скэтчарда, некоторые из которых приведены на рис. 1 и 2.

Результаты определения K_A иммунных комплексов СА, PhI и TrR с соответствующими Ат представлены в табл. 1. Графическая обработка экспериментальных данных в координатах Скэтчарда позволяет вычислить не только равновесную константу связывания, но и концентрацию активных центров Ат в системе. Концентрация активных центров Ат в системе или рабочая концентрация Ат, согласно графику Скэтчарда, составила $4.5 \cdot 10^{-9}$ моль/л для Ат к СА и $1.03 \cdot 10^{-7}$ моль/л для Ат к PhI.

Иммуноопределения исследуемых гербицидов (2,4-Д, 2,4,5-Т, симазина и атразина) проводят с применением иммобилизованных Ат. В связи с этим большее значение приобретало определение констант связывания для различных концентраций иммобилизованных Ат к данным гербицидам, характеризующих степень сродства иммобилизованных Ат к соответствующему гербициду.

Следует отметить, что для иммобилизации применяли различные концентрации Ат: 0.017 мг/мл для 2,4-Д, 0.044 мг/мл для 2,4,5-Т, 0.049 и 0.076 мг/мл для симазина и 0.058 и 0.084 мг/мл для атразина.

Было установлено, что область концентраций, для которой может быть зафиксирована остаточная концентрация гербицида, для определения констант связывания составила: для 2,4-Д – $1 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-7}$ моль/л, для 2,4,5-Т – $1 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-7}$ моль/л, для симазина – $1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-9}$ моль/л ($c_{Ат} = 0.049$ мг/мл) и $5 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-9}$ моль/л ($c_{Ат} = 0.076$ мг/мл), для атразина область концентраций составила $1 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-10}$ моль/л для $c_{Ат} = 0.058$ мг/мл и $1 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-7}$ моль/л для $c_{Ат} = 0.084$ мг/мл.

Проводили серию опытов по определению концентрации пестицида при различных начальных концентрациях гербицида и постоянной концентрации Ат в системе. Полученные данные использовали для построения графиков в координатах Скэтчарда, некоторые из которых приведены на рис. 3. Результаты определения констант связывания с использованием иммобилизованных Ат и концентрации активных центров иммобилизованных Ат, способных вступать в реакции биоспецифического взаимодействия, представлены в табл. 2.

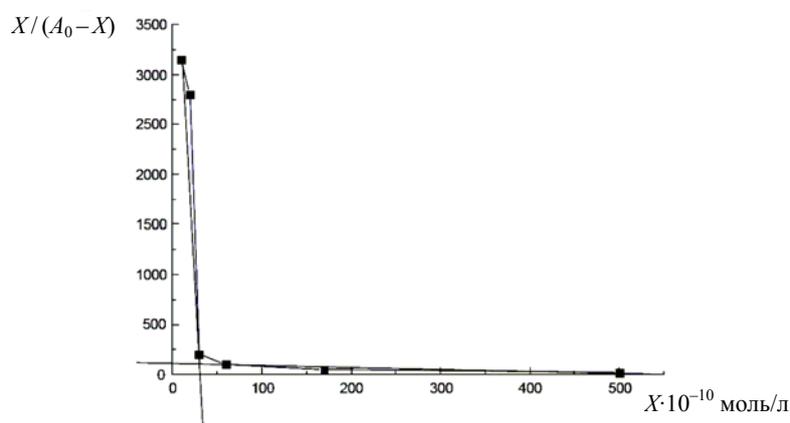


Рис. 1. График Скэтчарда для нахождения констант связывания иммунного комплекса *Candida albicans* – Ат, A_0 – общая концентрация Аг в системе, X – равновесная концентрация иммунного комплекса

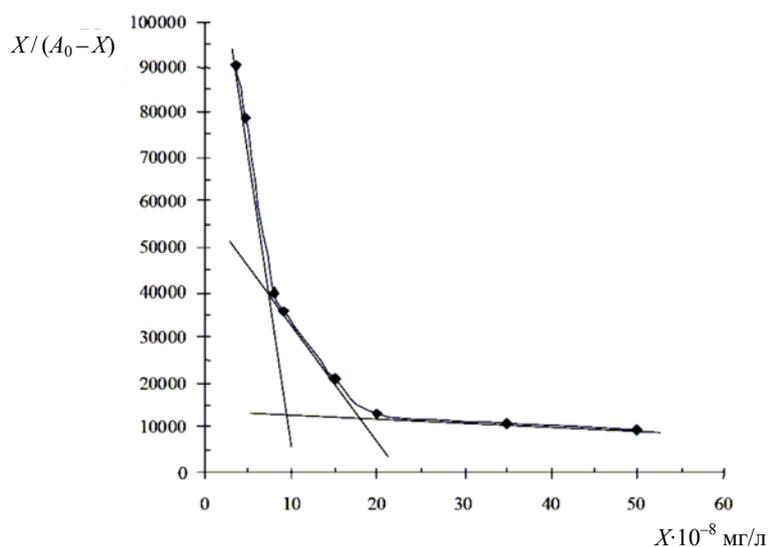


Рис. 2. График Скэтчарда для определения констант связывания иммунного комплекса *Trichophyton rubrum* – Ат

Табл. 1

Константы связывания иммунного комплекса Аг – Ат ($n = 5, p = 0.95$)

Антиген	Разведение антител	Константа связывания, K_A , моль ⁻¹		Рабочая концентрация антител (c)
		K_{A1}	K_{A2}	
СА	1 : 20	$(5.4 \pm 0.2) \cdot 10^{12}$	$(4.7 \pm 0.1) \cdot 10^{10}$	$4.5 \cdot 10^{-9}$ моль/л
PhI	1 : 100	$(1.0 \pm 0.1) \cdot 10^{11}$	$(4.4 \pm 0.2) \cdot 10^{12}$	$1.0 \cdot 10^{-7}$ мг/мл
TrR	1 : 20	$(3.7 \pm 0.2) \cdot 10^{11}$	$(5.7 \pm 0.2) \cdot 10^9$	$2.4 \cdot 10^{-6}$ мг/мл

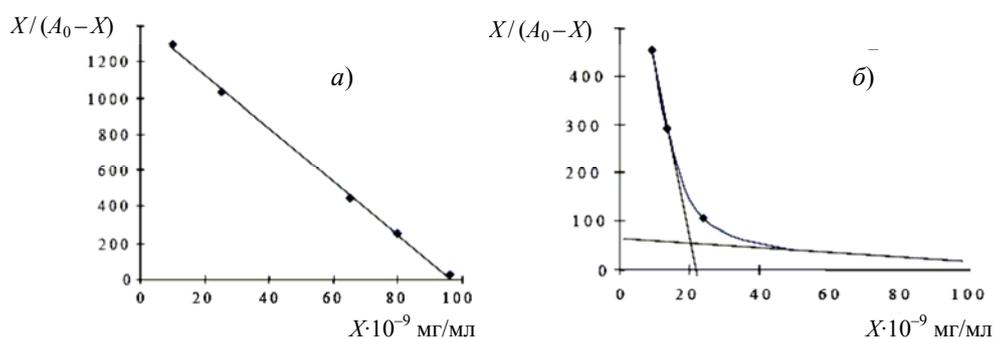


Рис. 3. График Скэтчарда для нахождения констант связывания иммунного комплекса Ат-2,4-Д (а) и Ат-2,4,5-Т (б) для иммобилизованных Ат

Табл. 2

Константы связывания иммунного комплекса Ат – Аг и Ат – гербицид ($n = 5, p = 0.95$)

Гербицид	Концентрация антител, мг/мл	Константа связывания, K_A , моль ⁻¹		Рабочая концентрация антител (с), моль/л
		K_{A1}	K_{A2}	
2,4-Д	0.017	$(1.4 \pm 0.1) \cdot 10^{10}$	0	$1 \cdot 10^{-9}$
2,4,5-Т	0.044	$(3.5 \pm 0.2) \cdot 10^{10}$	$(2.8 \pm 0.1) \cdot 10^8$	$2.2 \cdot 10^{-9}$
Симазин	0.049	$(2.2 \pm 0.2) \cdot 10^{11}$	$(6.8 \pm 0.9) \cdot 10^8$	$9 \cdot 10^{-9}$
	0.076	$(1.6 \pm 0.2) \cdot 10^9$	$(5.0 \pm 0.5) \cdot 10^8$	$7 \cdot 10^{-9}$
Атразин	0.058	$(4.0 \pm 0.1) \cdot 10^8$	$(2.3 \pm 0.4) \cdot 10^7$	$3.7 \cdot 10^{-8}$
	0.084	$(3.1 \pm 0.3) \cdot 10^9$	$(2.5 \pm 0.4) \cdot 10^8$	$5.3 \cdot 10^{-8}$

Прямолинейная зависимость графика Скэтчарда (рис. 3, а) соответствует моноклональности используемых антител против 2,4-Д.

Поскольку антитела, вырабатываемые организмом против антигенных детерминант, представляют собой неоднородную популяцию, в случае поликлональных антител определяемое значение константы связывания является эффективной величиной, характеризующей образование иммунного комплекса с антителами, активные центры которых обладают различным сродством к антигену. Доказательством этому служит нелинейный характер взаимодействия Аг – Ат и гербицид – Ат в координатах Скэтчарда (рис. 1, 2, 3, б), что свидетельствует о возможности существования по крайней мере двух, а в некоторых случаях трех (рис. 2) популяций Ат с более высокой и более низкой специфичностью к определяемому антигену или гербициду.

Следует отметить, что наиболее прочное связывание достигается между высокомолекулярными Аг и Ат, константы связывания иммунных комплексов с их участием имеют большее значение, чем, например, константы связывания для иммунных комплексов с участием пестицидов. Это может быть связано с тем, что с уменьшением молекулярной массы антигенные свойства несколько ухудшаются, вследствие чего соответствующие Ат имеют менее выраженную способность к взаимодействию с Аг.

Причина этого, вероятно, состоит в том, что антигены, являясь изначально соединениями белковой природы и обладая антигенными свойствами, при попадании в организм немедленно вызывают иммунный отклик и выработку соответствующих антител.

Низкомолекулярные же вещества, к которым относятся и изучаемые гербициды, не обладают антигенными свойствами. Для того чтобы стимулировать иммунный ответ, такие вещества ковалентно соединяют с крупными белковыми молекулами, и только полученные конъюгаты (гаптены), обладают способностью стимулировать синтез соответствующих антител. В случае изученных гербицидов Ат образуются к конъюгату гербицида с белком, в результате чего их связывание с низкомолекулярным гаптенем является менее прочным.

Считается, что для достижения необходимой достаточно высокой чувствительности ИФА значение K_A должно быть не ниже 10^8 моль⁻¹ [1].

Найденные значения констант связывания как для Ат к антигенам, так и для Ат к гербицидам находятся в оптимальном интервале значений констант связывания, обеспечивающем эффективность иммуноопределений.

Таким образом, показана возможность использования био- и иммуносенсоров не только для селективного определения биологически активных соединений, но и для изучения процессов комплексообразования в ряде биосистем.

Summary

M.P. Kutyreva, E.P. Medyantseva, E.V. Khaldeeva, A.R. Gataulina, N.A. Ulakhovich, H.C. Budnikov. Determination of Affinity Constants of Immune Complexes Using Voltammetric Data.

The affinity constants (K_A) of immune complexes have been calculated from the Scatchard plot using bio- and immunoenzyme sensors. The obtained values of the affinity constants of antigens *Candida albicans*, *Phytophthora infestans* and *Trichophyton rubrum*, and pesticides 2,4-D, 2,4,5-T and sim-1,3,5-triazines with the corresponding antibodies are in the range from $(2.3 \pm 0.4) \cdot 10^7$ to $(5.4 \pm 0.2) \cdot 10^{12}$, which provides efficiency of the immunoanalysis.

Key words: Scatchard method, affinity constants, antibody–antigen immune complex.

Литература

1. *Scatchard G.* The attraction of proteins for small molecules and ions // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1949. – V. 51, No 4. – P. 660–672.
2. *Mannen M., Gomes F.A., Whitesides G.M.* Determination of the binding of ligands containing the N-2,4-dinitrophenyl group to bivalent monoclonal rat anti-DNP antibody using affinity capillary electrophoresis // *Anal. Chem.* – 1995. – V. 67, No 19. – P. 3526–3535.
3. *Visser N.V., Smit-Kingma I.E.* Antigen-antibody interactions: binding studies with fluorescence and surface plasmon resonance exemplified by acid-traseolide as antigen // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 1999. – V. 55A, No 11. – P. 2271–2279.
4. *Giraudi G., Rosso I., Baggiani C., Giovannoli C.* Affinity between immobilised monoclonal and polyclonal antibodies and steroid-enzyme tracers increases sharply at high surface density // *Anal. Chim. Acta.* – 1999. – V. 381, No 2–3. – P. 133–146.
5. *Giraudi G., Baggiani C.* Strategy for fractionation high-affinity antibodies to steroid hormones by affinity chromatography // *Analyst.* – 1996. – V. 121, No 7. – P. 939–944.

6. *Кутырева М.П., Медянцева Э.П., Халдеева Е.В., Глушко Н.И., Будников Г.К.* Определение антигена *Candida albicans* с помощью амперометрического иммуноферментного сенсора // *Вопр. мед. химии.* – 1998. – Т. 44, Вып. 2. – С. 172–178.
7. *Poulain D., Hopwood V., Vernes A.* Antigenic variability of *Candida albicans* // *Crit. Rev. Microbiol.* – 1985. – V.12, No 3. – P. 223–270.
8. *Medyantseva E.P., Khaldeeva E.V., Glushko N.I., Budnikov H.C.* Amperometric enzyme immunosensor for the determination of the antigen of the pathogenic fungi *Trichophyton rubrum* // *Anal. Chim. Acta.* – 2000. – V. 411, No 1–2. – P. 13–18.
9. *Медянцева Э.П., Кутырева М.П., Фахреева Э.Р., Ильичева Н.Ю., Еремин С.А., Будников Г.К.* Иммунохимический анализ гербицидов группы сим-1,3,5-триазинов с помощью амперометрического биосенсора // *Агрохимия.* – 2000. – № 3. – С. 72–80.
10. *Medyantseva E.P., Vertlib M.G., Kutyreva M.P., Khaldeeva E.V., Budnikov H.C., Eremin S.A.* The specific immunochemical detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid pesticides by amperometric cholinesterase biosensors // *Anal. Chim. Acta.* – 1997. – V. 347, No 1–2. – P. 71–78.

Поступила в редакцию
29.10.12

Кутырева Марианна Петровна – кандидат химических наук, доцент кафедры неорганической химии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: mkutyreva@mail.ru

Медянцева Эльвина Павловна – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Elvina.Medyantseva@ksu.ru

Халдеева Елена Владимировна – кандидат химических наук, заведующая лабораторией грибковых аллергенов Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора.

Гатаулина Альфия Ринатовна – кандидат химических наук, ассистент кафедры неорганической химии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Улахович Николай Алексеевич – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой неорганической химии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Будников Герман Константинович – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Herman.Budnikov@ksu.ru