

УДК 535.518+57.083.3

Разработка поляризационного флуоресцентного иммуноанализа для определения диизобутил фталата в водах открытых водоемов

Косурова Дарья Сергеевна¹

daria.kosurova@yandex.ru

Мухаметова Лилия Инилевна^{2(*)}

mukhametovali@bmstu.ru

Берлина Анна Николаевна³

anberlina@yandex.ru

Еремин Сергей Александрович¹

eremin_sergei@hotmail.com

¹ МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия² МГТУ им. Н.Э. Баумана, Москва, Россия³ Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Аннотация. Фталаты широко применяются в промышленности. Попадая в окружающую среду, например, в воды открытых водоемов могут негативно влиять на здоровье человека. Поэтому необходимо иметь быстрые и точные методы определения фталатов, которые могут быть использованы на месте требования. В данной работе получены иммунореагенты и разработан поляризационный флуоресцентный иммуноанализ определения диизобутил фталата (ДиБФ) в водах открытых водоемов с пределом обнаружения 100 нг/мл. Разработанный ПФИА специфичен к ДиБФ и его ближайшему аналогу дибутилфталату. ПФИА апробирован методом введено/найденно и протестированы образцы воды из реальных водоемов.

Ключевые слова: фталаты, загрязнение окружающей среды, поляризация флуоресценции

Development of fluorescent polarization immunoassay for the determination of diisobutyl phthalate in open waters

Kosurova Daria Sergeevna¹

daria.kosurova@yandex.ru

Mukhametova Liliya Inilevna^{2(*)}

mukhametovali@bmstu.ru

Berlina Anna Nikolaevna³

anberlina@yandex.ru

Eremin Sergey Alexandrovich¹

eremin_sergei@hotmail.com

¹ Lomonosov MSU, Moscow, Russia² BMSTU, Moscow, Russia³ Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Moscow, Russia

Abstract. Phthalates are widely used in industry. Getting into the environment, for example, into open water bodies, they can negatively affect human health. Therefore, it is necessary to have fast and accurate methods for determining phthalates that can be used on-site. In this work, immunoreagents were obtained and a polarization fluorescence immunoassay for determining diisobutyl phthalate (DiBP) in open water bodies with a detection limit of 100 ng/ml was developed. The developed FPIA is specific to DiBP and its closest analogue

dibutyl phthalate. The FPIA was tested using the introduced/found method and water samples from real water bodies were tested.

Keywords: phthalates, environmental pollution, fluorescence polarization

Введение. Применение диэфиров фталиевой кислоты (фталатов) распространено в промышленном производстве для придания пластмассам необходимых свойств: прочность, гибкость и эластичность. Поскольку фталаты химически не связаны с пластиком, они могут легко высвобождаться и попадать в окружающую среду, загрязняя почву, воду и воздух, и создавая долгосрочные риски для здоровья населения [1]. Для эффективного мониторинга содержания фталатов необходимы высокочувствительные, быстрые и точные методы анализа. Среди таких методов наиболее перспективны иммунохимические методы, отличающиеся высокой специфичностью и чувствительностью [2]. Особый интерес представляет гомогенный поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА) [3]. Принцип метода состоит в изменении скорости вращательной диффузии при связывании флуоресцирующего низкомолекулярного аналита с антителами. Этот метод обладает высокой чувствительностью и отличается высокой скоростью анализа. Это крайне важно для оперативного реагирования на случаи загрязнения и принятия необходимых мер. Целью данной работы является разработка и оптимизация ПФИА обнаружения диизобутилфталата.

Методы и оборудование. Конъюгаты с белками получены карбодиимидным методом, охарактеризованы спектрофотометрически, сигнал ПФ измеряли на портативном флуориметре Sentry 200 («Ellie», США).

Результаты и обсуждение. Для ПФИА на диизобутилфталат (ДиБФ) были получены и охарактеризованы конъюгаты ДиБФ с флуоресцентным красителем и белками: бычьим сывороточным альбумином (БСА) и соевым ингибитором трипсина (СИТ). К диизобутил-4-аминофталату в кислой среде в присутствии нитрита натрия после 30 мин инкубации добавляли 10 мг белка (БСА или СИТ ОВА) инкубировали при pH 8,5 2 часа и после диализа характеризовали конъюгаты спектрофотометрически. Полученные конъюгаты были использованы для иммунизации кроликов и получены антитела после 1, 2 и 3 циклов иммунизации: БСА-ДиБФ(1),(2) и (3) и СИТ-ДиБФ(1), (2) и (3). Был синтезирован конъюгат диизобутил-4-аминофталата с флуоресцеинизотиоцианнатом (ДиБФ-ФИТЦ) и изучено его связывание с антисыворотками. К раствору ДиБФ-ФИТЦ (2 нМ) добавляли 5 мкл тестируемых антисывороток и измеряли сигнал ПФ и показали, что наибольшее связывание продемонстрировала антисыворотка СИТ-ДиБФ(3), которая и была отобрана для анализа. Были оптимизированы условия проведения конкурентного формата ПФИА: выбор времени анализа, концентрации иммунореагентов, объем образца. Поскольку мы определяли содержания ДиБФ в воде, то мы использовали объем образца 500 мкл, поскольку нами было показано, что при минимальной пробоподготовке воды матричный эффект полностью устраняется при двукратном разведении. Получена калибровочная зависимость изменения

сигнала поляризации флуоресценции от концентрации ДиБФ при разведении антисыворотки СИТ-ДиБФ(3) в 200 раз и концентрации ДиБФ-ФИТЦ 2,5 нМ. Определены аналитические характеристики метода: предел обнаружения составил 100 нг/мл. Изучена кроссреактивность ПФИА и методика была апробирована методом введено/найденно и протестированы образцы воды из реальных водоемов.

Заключение. Получены и охарактеризованы иммунореагенты (антисыворотки и конъюгат ДиБФ-ФИТЦ). Показано, что наилучший иммунный ответ получен при иммунизации кроликов СИТ-ДиБФ после 3 цикла иммунизации и подобрана оптимальная пара иммунореагентов для проведения определения диизобутилфталата методом ПФИА. Разработана методика ПФИА для анализа диизобутилфталата, определены аналитические характеристики метода. Предел обнаружения в воде составил 100 нг/мл. Показано, что процент кроссреактивности составил 30 % для ДБФ, а для всех остальных фталатов и их метаболитов менее 10 %, что свидетельствует о высокой специфичности метода определения ДиБФ. Были протестированы образцы воды открытых водоемов Московского региона, в которых не было обнаружено ДиБФ выше 100 нг/мл.

Работа выполнена при финансовой поддержке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (проект № 1210415000398 «Молекулярный дизайн, структурно-функциональный анализ и регуляция ферментных систем, клеточных структур и бионаноматериалов: основы и приложения в технике, медицине и охране окружающей среды»).

Список источников

- [1] Birnbaum L.S., Schug T.T. Phthalates in our food. *Endocr. Disruptors*, 2013, vol. 1, e25078. <https://doi.org/10.4161/endo.25078>
- [2] Berline A.N., Ragozina M.Y., Komova N.S., Serebrennikova K.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development of Lateral Flow Test-System for the Immunoassay of Dibutyl Phthalate in Natural Waters. *Biosensors*, 2022, vol. 12, art. no. 1002. <https://doi.org/10.3390/bios12111002>
- [3] Mukhametova L.I., Karimova M.R., Zharikov O.G., Pirogov A.V., Levkina V.V., Chichkanova E.S., Liu L., Xu C., Eremin S.A. Detection of Dibutyl Phthalate in Surface Water by Fluorescence Polarization Immunoassay. *Biosensors*, 2023, vol. 13, art. no. 1005. <https://doi.org/10.3390/bios13121005>