

УДК 57.083.3:543.544

РАЗРАБОТКА МИКРОПЛАНШЕТНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НОНИЛФЕНОЛА С МАГНИТНЫМ КОНЦЕНТРИРОВАНИЕМ ПРОБ

© 2024 г. А. Н. Берлина¹, Л. В. Баршевская¹, К. В. Серебренникова¹,
Н. С. Комова¹, А. В. Жердев¹, Б. Б. Дзантиев^{1, *}

¹Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 05.12.2023 г.

После доработки 10.01.2024 г.

Принята к публикации 12.01.2024 г.

Нонилфенол является ароматическим органическим соединением, обладающим эстрогеноподобным действием и оказывающим негативное воздействие на эндокринную систему человека. Разработана методика конкурентного определения нонилфенола с использованием магнитных частиц, конъюгированных с белком G, антисывороткой кролика, конъюгатом нонилфенола с соевым ингибитором трипсина (СИТ) и биотином. Принцип анализа заключается в формировании иммунных комплексов на поверхности частиц магнетита с помощью белка G путем ориентированной иммобилизации поликлональных антител из сыворотки кролика и последующей конкурентной реакции между нативным нонилфенолом и его конъюгатом нонилфенол-СИТ-биотин за центры связывания антител. Для выявления иммунных комплексов используется взаимодействие с конъюгатом стрептавидин-полипероксидаза, обеспечивающие девятикратный выигрыш по уровню аналитического сигнала по сравнению с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза. Предел обнаружения нонилфенола с помощью разработанного ИФА – 3.8 нг/мл, что в 14.5 раз ниже по сравнению с традиционным конкурентным ИФА. Оптимизированный объем тестируемой пробы, равный 500 мкл, позволяет концентрировать аналит в 17 раз.

Ключевые слова: нонилфенол, иммуноферментный анализ, частицы магнетита, магнитное концентрирование

DOI: 10.31857/S0555109924030108 EDN: EWAIEK

Загрязнение окружающей среды токсичными соединениями представляет серьезную угрозу как здоровью людей, так и природным объектам. В большой опасности находятся, в частности, водные экосистемы [1–3]. Промышленные сбросы, сельскохозяйственные стоки и неправильная утилизация отходов приводят к загрязнению водоемов и снижают качество потребляемой воды, что, в свою очередь, приводит к развитию различных заболеваний [4–6].

Среди многообразия токсикантов водной среды все большее беспокойство вызывают эндокринные деструкторы, такие как нонилфенол (НФ) [7–9]. Нонилфенол является конечным продуктом деградации неионных поверхностно активных веществ (ПАВ), широко используемых в текстильной, сельскохозяйственной, бумажной промышленности [10]. НФ часто обнаруживается в водных экосистемах, куда попадает в основном с промышленными

сточными водами [7, 11]. Уровни его содержания в водоемах могут достигать до 0.98 мкг/кг, в поверхностных и подземных водах – до 37.3 мг/м³ и 3.85 мг/м³ соответственно [12].

НФ отличается высокой гидрофобностью, поэтому способен накапливаться в организмах человека и животных, нарушая работу эндокринной, репродуктивной и нервной систем и повышая вероятность образования опухолей [13–15]. Максимально допустимые концентрации НФ в воде устанавливаются в пределах от 0.3 до 2 мкг/л [16]. Исходя из этого, контроль содержания НФ в водных объектах является важной задачей.

Для детекции НФ наиболее часто используются газовая, жидкостная хроматография или масс-спектрометрия, которые являются трудоемкими, длительными и требуют дорогостоящего оборудования [17–20]. Кроме того, в природных объектах НФ часто представлен в виде смеси изомеров с различной

разветвленной структурой, что затрудняет идентификацию пиков на хроматограммах и снижает точность определения. Вследствие этого необходима разработка более простых, быстрых и высокочувствительных методов обнаружения НФ.

Альтернативными методами определения НФ являются иммунохимические, такие как иммуноферментный анализ (ИФА) [21, 22], поляризационный флуоресцентный иммуноанализ [23], точно-инжекционный иммуноанализ [24, 25]. Они отличаются быстротой и удобством проведения, высокой воспроизводимостью, возможностью автоматизации и низкой стоимостью. Разработка иммунохимических методов требует получения высокоспецифичных антител ввиду высокой гетерогенности изомеров НФ [26, 27].

В данной работе предложен ИФА для выявления НФ на основе частиц магнетита (МЧ). Поскольку содержание НФ в пробах может быть низким, оправдано концентрирование пробы. Использование МЧ позволяет одновременно проводить разделение несвязавшихся компонентов и концентрирование анализа, что повышает чувствительность и точность анализа.

Цель работы – разработка ИФА нонилфенола с применением магнитного концентрирования проб и отделения иммунных комплексов, содержащих пероксидазную метку.

МЕТОДИКА

Химические реагенты. В работе использованы нонилфенол (НФ), соевый ингибитор трипсина (СИТ), желатин, диметилсульфоксид (ДМСО), твин-80, N-сукцинимидный эфир биотинамидогексаноил-6-аминогексановой кислоты, бычий сывороточный альбумин (БСА), конъюгат стрептавидина с полимеризованной пероксидазой, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимид гидрохлорид (ЭДК), формальдегид (Sigma-Aldrich, США). Антисыворотки против НФ были получены путем иммунизации кроликов конъюгатом НФ-БСА согласно методике, описанной в [26]. Также применялись поликлональные антитела козы против иммуноглобулинов кролика, меченные пероксидазой хрена, стрептококковый белок G (ИМТЕК, Россия), готовый субстрат пероксидазы на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) с H₂O₂ (Иммунотех, Россия), метанол (Fluka, Швейцария) и карбоксилированные частицы магнетита (МЧ) (Magsphere, Великобритания).

Синтез конъюгата гаптен-белок. Нонилфенол конъюгировали с соевым ингибитором трипсина по методике, описанной на реакции Манниха [26] с получением конъюгата НФ-СИТ. Для этого НФ растворяли в ДМСО, получая раствор с концентрацией 33 мг/мл. 10 мг СИТ вносили в 1 мл 0.1 М карбонатного буфера (рН 10.0). К раствору

белка добавляли 60 мкл раствора НФ. Затем добавляли 100 мкл 35% формальдегида с последующим инкубированием при перемешивании в течение 30 мин при комнатной температуре. Реакционную смесь оставляли в термостате на 5 суток при 37°C. Очистку препарата проводили диализом против 10 мМ фосфатного буферного раствора с 0.1М натрия хлорида, рН 7.4. Полученный конъюгат хранили при +4°C.

Биотинилирование конъюгата гаптен-белок. Конъюгат НФ-СИТ смешивали с N-сукцинимидным эфиром биотинамидогексаноил-6-аминогексановой кислоты в мольном соотношении 1: 20 и инкубировали 2 ч при комнатной температуре и перемешивании. Продукт реакции диализовали против 50 мМ фосфатного буфера (ФБС, рН 7.4) с использованием центрифужных фильтров Amicon Ultracel 10 K (Millipore, США).

Получение магнитного иммуносорбента состава МЧ-белок G-IgG. 20 мкл раствора частиц (1 мг/мл) смешивали с 143 мкл раствора ЭДК (7 мг/мл), доводили полученную смесь до 1 мл 50 мМ ФБС (рН 7.4) и инкубировали 15 мин при перемешивании. Далее в полученный раствор вносили белок G в исходной концентрации 100 мкг/мл, инкубировали 1 ч при комнатной температуре и перемешивании. Добавляли 25 мкл 10% БСА, инкубировали еще 10 мин при перемешивании и очищали конъюгат трехкратной промывкой ФБС с использованием внешнего магнита. Затем к 1 мл полученного конъюгата добавляли 10.5 мкл антисыворотки против НФ, инкубировали 1 ч при комнатной температуре и перемешивании и отмывали, как описано выше. Полученный конъюгат хранили при +4°C.

Конкурентный иммуноферментный анализ НФ. В лунки микропланшета (Corning Costar, США) вносили конъюгат НФ-СИТ (1 мкг/мл) в ФБС и инкубировали в течение ночи при 4°C, а затем трижды промывали 50 мМ ФБС, содержащим 0.05% Твин-80 (ФБСТ). Далее 150 мкл ФБС с 0.1% желатином вносили в лунки микропланшета и инкубировали 30 мин при 37°C, после чего микропланшет промывали ФБСТ. Для приготовления растворов НФ использовали исходный метанольный раствор с концентрацией 1 мг/мл. В лунки вносили растворы НФ с различной концентрацией (от 100 мкг/мл до 0.01 нг/мл) в смеси метанол : вода (1 : 4), а затем добавляли антисыворотку в разведении 1 : 5000 в ФБС с 0.1% желатина. После инкубирования в течение 1 ч при 37°C и отмывки планшета ФБСТ добавляли конъюгат антивидовые антитела – пероксидаза (1 : 3000) и инкубировали 45 мин при 37°C и интенсивном перемешивании. Микропланшет отмывали 4 раза ФБСТ, вносили в лунки раствор субстрата ТМБ (100 мкл) и через 15 мин инкубации при комнатной температуре останавливали реакцию добавлением 50 мкл 0.1 М H₂SO₄.

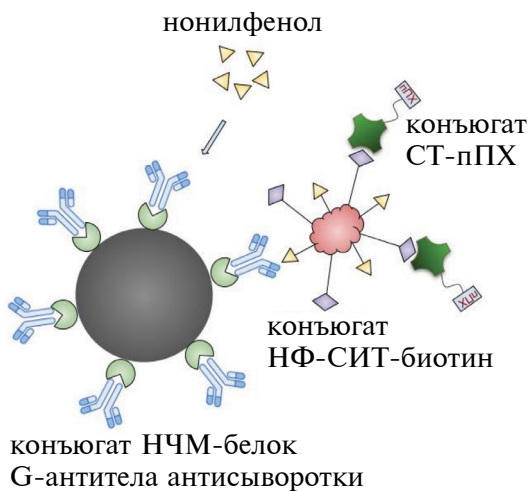


Рис. 1. Схема ИФА с магнитным концентрированием.

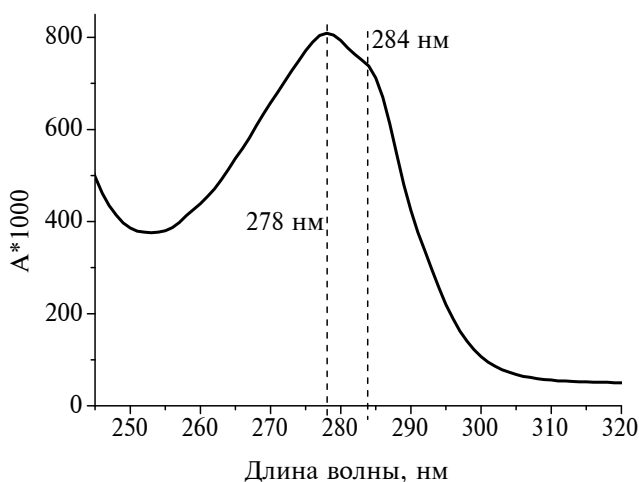


Рис. 2. Спектр поглощения конъюгата НФ-СИТ. Толщина кюветы 1 мм, концентрация конъюгата в 10 мМ ФБС – 1.2 мг/мл.

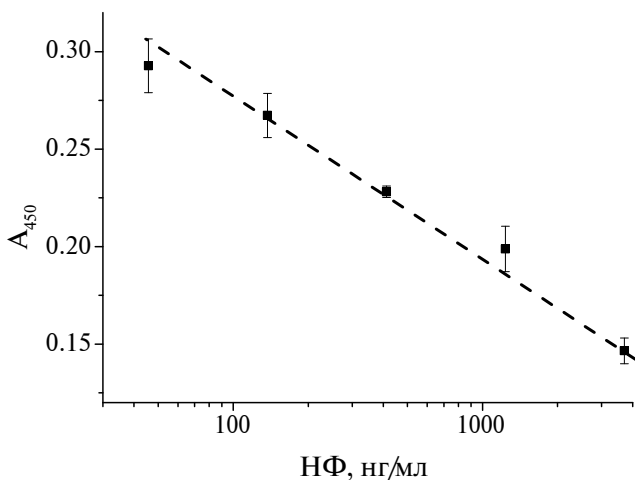


Рис. 3. Характеристика антисыворотки методом ИФА: линейный участок кривой конкурентного взаимодействия (n = 3).

Оптическую плотность продукта пероксидазной реакции измеряли при 450 нм с использованием многофункционального планшетного анализатора EnSpire multimode plate reader (Perkin Elmer, США).

Конкурентный иммуноферментный анализ НФ с использованием МЧ. В пробирки Эппендорф вносили растворы НФ в концентрациях от 200 нг/мл до 0/78 нг/мл в 500 мкл смеси метанол : вода (1 : 4), после чего добавляли иммуносорбент на основе МЧ (конечная концентрация 28 мкг/мл) и инкубировали 15 мин. Иммуносорбент трехкратно отмывали ФБСТ с 0.1% БСА с использованием внешнего магнита. Далее добавляли конъюгат НФ-СИТ-биотин (5 мкг/мл), инкубировали 15 мин и повторяли отмывку. Затем в полученные растворы вносили конъюгат стрептавидина с полипероксидазой (1 : 1000), инкубировали еще 10 мин и проводили отмывку, как описано выше. На конечном этапе в пробирки вносили 100 мкл субстрата на основе ТМБ, через 15 минут осаждали МЧ с помощью внешнего магнита, отбирали надосажок, переносили его в лунки микропланшета и останавливали реакцию добавлением 50 мкл 0.1 М H₂SO₄.

Оптическую плотность продукта пероксидазной реакции измеряли, как описано выше.

Обработка результатов ИФА. Зависимость сигнала – оптической плотности (y) – от концентрации антигена (x) аппроксимировали с помощью программы Origin версии 9.0 (OriginLab, США) с использованием четырехпараметрической сигмоидной функции:

$$y = (a - b) / [1 + (x/c)^d] + b,$$

где a – максимальный сигнал, b – минимальный сигнал, c (или IC₅₀) – точка перегиба, концентрация антигена, ингибирующая 50% связывания антител, d – наклон кривой в точке c.

На основании полученной функции определяли предел обнаружения антигена согласно критерию 3σ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Принцип анализа. Предлагаемый подход состоит в проведении конкурентного взаимодействия нативного (содержащегося в пробе) и конъюгированного с белком-носителем и биотином антигена со специфическими антителами в сочетании с взаимодействием биотина со стрептавидином, конъюгированным с пероксидазной меткой, отделением сформированных иммунных комплексов из реакционной среды посредством осаждения носителя (магнитных частиц) с помощью внешнего магнита и регистрации уровня пероксидазной активности, отражающей содержание антигена в пробе.

Данные процессы изображены на рис. 1. На магнитных частицах ковалентно иммобилизован белок G, способный взаимодействовать с иммуноглобулинами (IgG) в сыворотке кролика,

формируя комплекс МЧ-белок G-IgG. При этом на поверхности магнитных частиц Fab фрагмент антител оказывается открытым и доступным для взаимодействия для конкурентов – свободного НФ и конъюгата НФ-СИТ-биотин. Если НФ присутствует в пробе, он взаимодействует с антителами, занимая центры связывания. Если НФ отсутствует, то конъюгат НФ-СИТ-биотин связывается с антителом. На следующей стадии при добавлении конъюгата стрептавидина с полипероксидазой хрена (СТ-пПХ) происходит высокоаффинное связывание биотин-стрептавидин с формированием комплекса состава МЧ-белок G-IgG-НФ-СИТ-биотин-СТ-пПХ. Наличие пероксидазной метки обеспечивает окисление субстрата (ТМБ) в присутствии пероксида водорода с получением окрашенного продукта.

Синтез и характеристика конъюгата гаптен-белок. Конъюгирование НФ с СИТ проводили с помощью реакции Манниха в молярном соотношении 30 : 1. В ходе реакции углерод формальдегида формирует метиленовую группировку, встраиваемую в орто-положение по отношению к фенольному гидроксилу. Эта группа в конъюгате является связующим звеном между аминок группой белка и НФ. Полученный конъюгат охарактеризован методом спектрофотометрии (рис. 2). Максимум поглощения нативного нонилфенола находится при 278 нм, формируя характерное “плечо” белкового пика в спектре конъюгата гаптен-белок. Вычисленная концентрация конъюгата по белку составила 7.4 мг/мл.

Характеристика иммунореагентов в микропланшетном конкурентном ИФА нонилфенола. Для оценки реакционной способности антисыворотки против нонилфенола использовали ИФА с иммобилизацией конъюгата НФ-СИТ в лунках микропланшета [28]. Оптимальное разведение антисыворотки, 1 : 10000, обеспечивало оптическую плотность 1.0 в отсутствие свободного гаптена. Далее в конкурентном ИФА была получена зависимость сигнала от концентрации НФ (рис. 3). Предел обнаружения НФ составил 55 нг/мл, рабочий диапазон определяемых концентраций – от 200 до 1700 нг/мл. Таким образом, препараты антисыворотки и конъюгата гаптен-белок продемонстрировали функциональную активность. Установленные характеристики анализа использовались для сравнения с разрабатываемым методом с применением МЧ.

Синтез конъюгата МЧ с белком G и антисывороткой против НФ. Используемые в данной работе магнитные частицы покрыты полимером с карбоксильными группами. Наличие такой модификации поверхности позволило иммобилизовать белок G ковалентно путем активации карбоксильных групп. Дальнейшее добавление антисыворотки кролика в выбранном разведении 1 : 10000

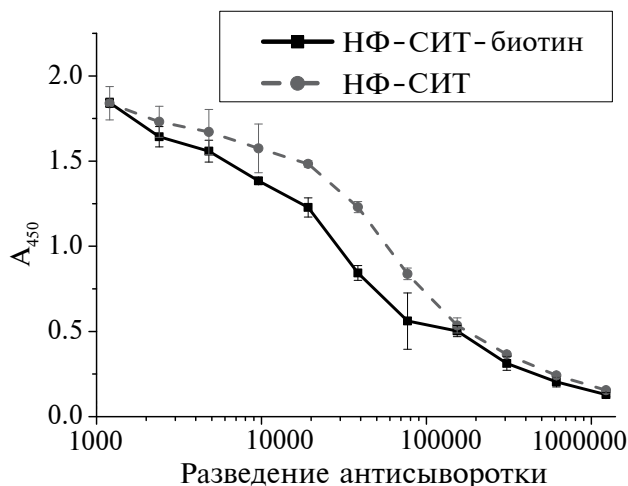


Рис. 4. Проверка сохранения иммунохимической активности конъюгата гаптен-белок до и после биотинилирования ($n = 2$).

позволило получить реагент с направленной ориентацией молекул Ig G.

Препараты были охарактеризованы методом просвечивающей электронной микроскопии. Согласно полученным данным, средний диаметр частиц составил 286 ± 6 нм.

Выбор условий проведения ИФА с использованием МЧ. Для осуществления предложенной схемы ИФА с магнитным концентрированием было проведено биотинилирование полученного конъюгата НФ-СИТ с проверкой сохранения иммунохимической активности. Поскольку конъюгат НФ-СИТ-биотин бифункционален и должен взаимодействовать как с иммуноглобулинами в составе антисыворотки, так и со стрептавидином, то проверка заключалась в тестировании данных взаимодействий. Для этого в лунки микропланшета с иммобилизованными конъюгатами НФ-СИТ и НФ-СИТ-биотин (3 мкг/мл) вносили антисыворотку в разведениях от 1 : 1000 до 1 : 1000000, а затем – антивидовые антитела, меченные пероксидазой хрена, и регистрировали оптический сигнал, генерируемый ферментной меткой в составе иммунных комплексов. Согласно полученным данным, препарат НФ-СИТ до и после биотинилирования функционально активен (рис. 4). Аналогично оценивали реакционную способность биотина, используя конъюгат стрептавидин-пероксидаза хрена (СТ-ПХ). Как видно из рис. 6А, связывание с биотинилированным конъюгатом наблюдается при различных разведениях препарата СТ-ПХ, однако оптическая плотность невысока. Поэтому для увеличения сигнала использовали альтернативный препарат стрептавидина, меченного полипероксидазой (СТ-пПХ). Замена на препарат с увеличенным числом ферментных меток позволила увеличить значение оптической плотности в 9 раз,

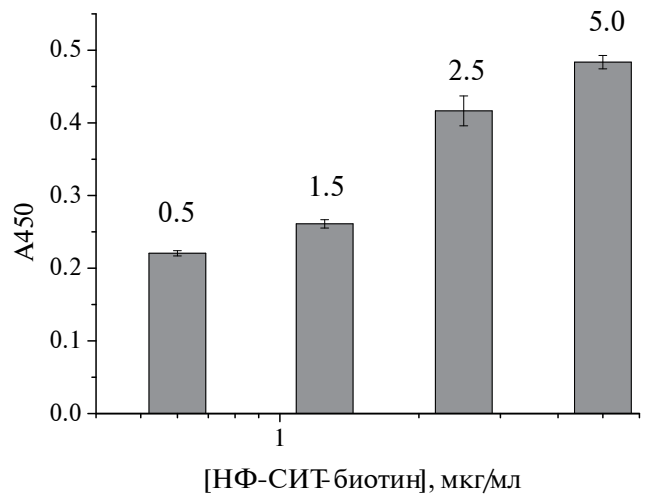
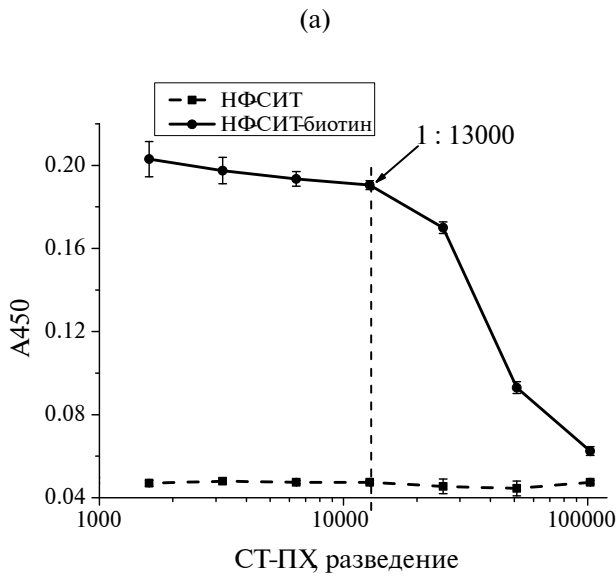


Рис. 6. Выбор оптимальной концентрации МЧ-белок G-IgG (по концентрации магнитных частиц) ($n = 3$).

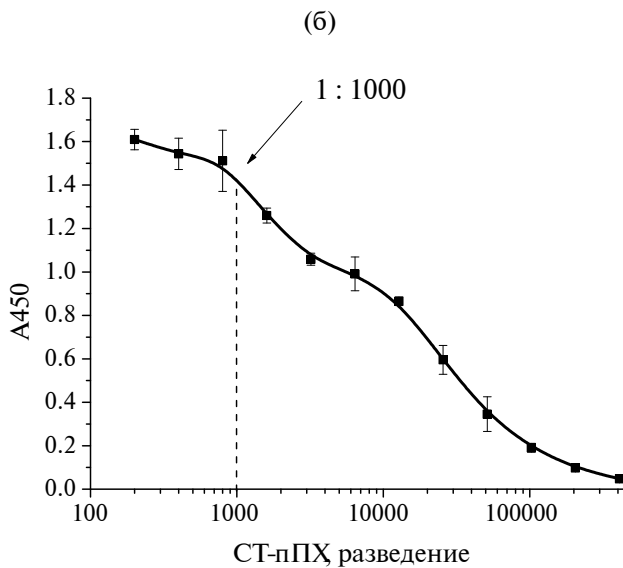


Рис. 5. Проверка связывания биотин-стрептавидин в препарате НФСИТ-биотин и выбор концентраций конъюгата СТ-ПХ (А) и СТ-пПХ (Б) ($n = 2$).

сохраняя низкий уровень неспецифического сигнала (рис. 5б). Таким образом, мы подтвердили реакционную способность конъюгата НФСИТ-биотин, а также выбрали необходимые разведения реагентов – 1 : 1000 для СТ-пПХ и 1 : 13000 для СТ-ПХ (рис. 5).

Выбор концентрации конъюгата НФСИТ-биотин проводили при ее варьировании от 5 до 0.6 мкг/мл. Критерием выбора было достижение наиболее высокого значения оптической плотности; была выбрана концентрация конъюгата 5 мкг/мл (рис. 6).

На следующем этапе определяли оптимальную концентрацию иммуносорбента на основе МЧ. Для

этого регистрировали взаимодействие полученного препарата в концентрациях от 250 до 9 мкг/мл с поликлональными антителами козы против иммуноглобулинов кролика, меченными пероксидазой хрена. На рис. 7 представлена зависимость оптической плотности при 450 нм от концентрации МЧ. Была выбрана концентрация иммуносорбента, соответствующая ОП 1.0 (совпадающей с традиционным ИФА), которая составила 28 мкг/мл.

ИФА нонилфенола с магнитным концентрированием. С учетом установленных условий проведения ИФА с использованием МЧ было осуществлено определение НФ. В связи с низкой растворимостью НФ в воде его растворы готовили в среде с 20%-ным содержанием метанола. Данная концентрация метанола не приводит к инаktivации антител и потере антигенсвязывающих свойств [29–31]. Содержание метанола на стадии конкуренции совпадало для ИФА с использованием МЧ и для традиционного конкурентного ИФА (рис. 3). Была получена градуировочная кривая определения НФ с применением МЧ (рис. 8). Предел обнаружения составил 3.8 нг/мл, а рабочий диапазон определяемых концентраций – от 6.2 до 33 нг/мл ($IC_{50} = 14.2$ нг/мл). Таким образом, модификация ИФА позволила снизить предел обнаружения в 14.5 раз – с 55 до 3.8 нг/мл. Использование комплексов МЧ с антителами способствует сохранению реакционной способности реагентов и концентрированию аналита, что позволяет регистрировать его низкие концентрации.

Последним этапом разработки было определение объема, из которого возможно провести концентрирование без потери чувствительности анализа. Для этой цели в различных объемах растворителя (от 0.1 до 5.0 мл) были приготовлены пробы, содержащие равное количество НФ. Все

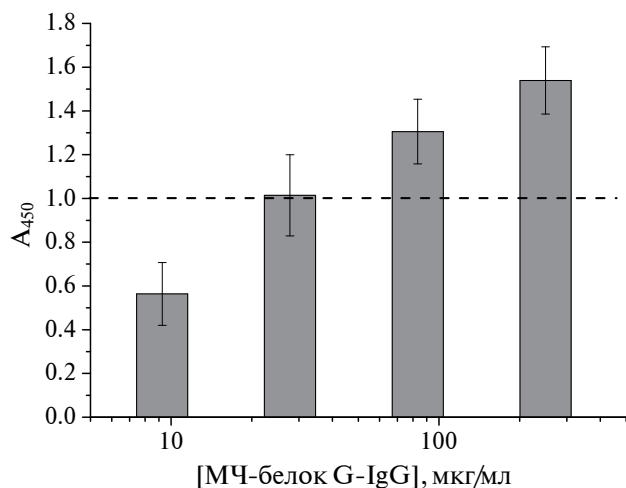


Рис. 7. Определение оптимальной концентрации конъюгата НФ-СИТ-биотин ($n = 2$). Пунктирной линией обозначено отсечение по оптической плотности 1.0.

стадии анализа с выбранными концентрациями реагентов проводили в малом объеме (30 мкл), за исключением стадии конкуренции. Согласно полученной зависимости от объема пробы (рис. 9), максимальный оптический сигнал достигается при концентрировании пробы из 0,5 мл. Таким образом, применение модифицированных магнитных частиц позволяет сконцентрировать пробу в 17 раз, что имеет большое значение для проб, содержащих следовые количества аналита.

Представленный в данной работе подход интересен по нескольким причинам. Проведение анализа в микропробирках минимизирует неспецифические взаимодействия НФ по сравнению с микропланшетами различной сорбционной емкости. Направленное ориентирование иммуноглобулинов сыворотки кролика при взаимодействии их Fc-фрагментов с белком G позволяет более эффективно проводить конкурентное взаимодействие с НФ — свободным либо в составе конъюгата гаптен-белок. Использование высокоаффинного взаимодействия биотин-стрептавидин, а также полипероксидазы обеспечивает снижение предела обнаружения искомого аналита. Достигнутые значения предела обнаружения НФ соответствуют установленным нормам по его содержанию в воде [12], что доказывает пригодность данного подхода для определения практически востребованных низких концентраций НФ. И, наконец, применение МЧ в качестве носителей иммунных комплексов обеспечивает концентрирование разбавленных проб и выявление следовых количеств НФ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-13-00293).

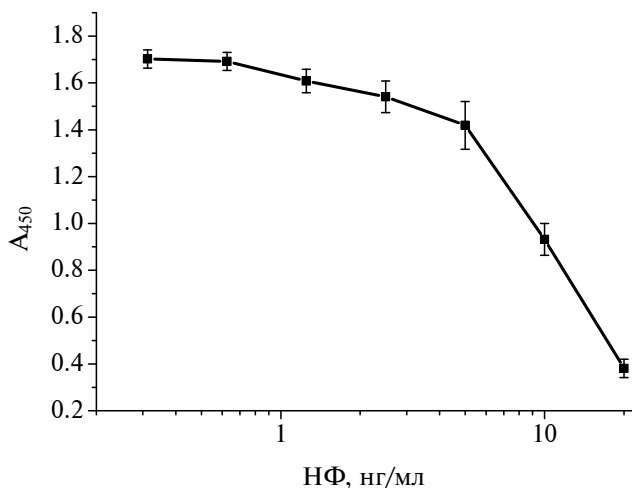


Рис. 8. Градуировочная кривая определения НФ с использованием разработанной системы на основе МЧ ($n = 3$).

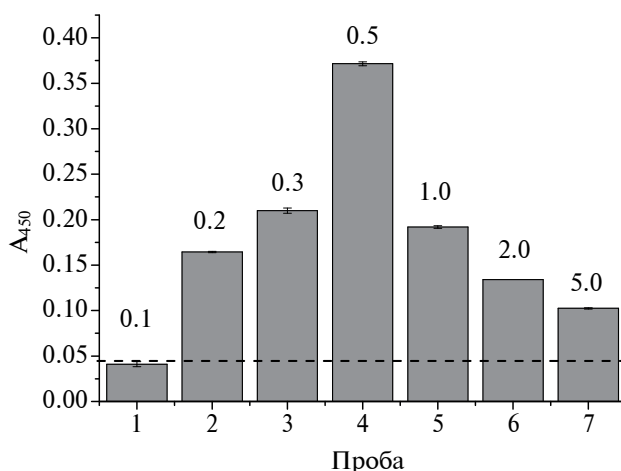


Рис. 9. Зависимость аналитического сигнала в разработанном ИФА на основе МЧ от объема, в котором происходило концентрирование ($n = 3$).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Evans A.E.V., Mateo-Sagasta J., Qadir M., Boelee E., Ippolito A.* // Curr. Opin. Environ. Sustain. 2019. V. 36. P. 20–27.
2. *Zamora-Ledezma C., Negrete-Bolagay D., Figueroa F., Zamora-Ledezma E., Ni M., Alexis F., Guerrero V.H.* // Environ. Technol. Innov. 2021. V. 22. Article 101504. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101504>

3. Fang W., Peng Y., Muir D., Lin J., Zhang X. // Environ. Int. 2019. V. 131. Article 104994. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104994>
4. Fuller R., Landrigan P.J., Balakrishnan K., Bathan G., Bose-O'Reilly S., Brauer M. et al. // Lancet Planet. Health. 2022. V. 6. № 6. P. e535–e547.
5. Palani G., Arputhalatha A., Kannan K., Lakkaboyana S.K., Hanafiah M.M., Kumar V., Marella R.K. // Molecules. 2021. V. 26. № 9. Article 2799. <https://doi.org/10.3390/molecules26092799>
6. Babuji P., Thirumalaisamy S., Duraisamy K., Periyasamy G. // Water. 2023. V. 15. № 14. Article 2532. <https://doi.org/10.3390/w15142532>
7. Bhandari G., Bagheri A.R., Bhatt P., Bilal M. // Chemosphere. 2021. V. 275. Article 130013. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130013>
8. Gałazka A., Jankiewicz U. // Microorganisms. 2022. V. 10. № 11. Article 2236. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112236>
9. Morin-Crini N., Lichtfouse E., Liu G., Balaram V., Ribeiro A.R. L., Lu Z. et al. // Environ. Chem. Lett. 2022. V. 20. № 4. P. 2311–2338.
10. Chen Y., Yang J., Yao B., Zhi D., Luo L., Zhou Y. // Environ. Pollut. 2022. V. 310. Article 119918. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119918>
11. Hong Y., Feng C., Yan Z., Wang Y., Liu D., Liao W., Bai Y. // Environ. Chem. Lett. 2020. V. 18. № 6. P. 2095–2106.
12. Careghini A., Mastorgio A.F., Saponaro S., Sezenna E. // Environ. Sci. Pollut. Res. 2015. V. 22. № 8. P. 5711–5741.
13. Jarda K., Drogui P., Dagher R. // Environ. Sci. Pollut. Res. 2016. V. 23. № 4. P. 3195–3216.
14. Lu D., Yu L., Li M., Zhai Q., Tian F., Chen W. // Chemosphere. 2021. V. 275. Article 129973. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129973>
15. Noorimotlagh Z., Mirzaee S.A., Martinez S.S., Rachoń D., Hoseinzadeh M., Jaafarzadeh N. // Environ. Res. 2020. V. 184. Article 109263. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109263>
16. Directive 2013/39/eu of the European parliament and of the council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy.
17. Shih H.-K., Shu T.-Y., Ponnusamy V.K., Jen J.-F. // Anal. Chim. Acta. 2015. V. 854. P. 70–77.
18. Vargas-Berrones K., Díaz de León-Martínez L., Bernal-Jácome L., Rodríguez-Aguilar M., Ávila-Galarza A., Flores-Ramírez R. // Talanta. 2020. V. 209. Article 120546. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120546>
19. Aparicio I., Martín J., Santos J.L., Malvar J.L., Alonso E. // J. Chromatogr. A. 2017. V. 1500. P. 43–52.
20. Yin H.-L., Zhou T.-N. // Chinese J. Anal. Chem. 2022. V. 50. № 8. Article 100112. <https://doi.org/10.1016/j.cjac.2022.100112>
21. Céspedes R., Skryjová K., Raková M., Zeravik J., Fránek M., Lacorte S., Barceló D. // Talanta. 2006. V. 70. № 4. P. 745–751.
22. Matsui K., Kawaji I., Utsumi Y., Ukita Y., Asano T., Takeo M., Kato D.-i., Negoro S. // J. Biosci. Bioeng. 2007. V. 104. № 4. P. 347–350.
23. Yakovleva J.N., Lobanova A.Y., Shutaleva E.A., Kourkina M.A., Mart'ianov A.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Eremin S.A. // Anal. Bioanal. Chem. 2004. V. 378. № 3. P. 634–641.
24. Ermolaeva T.N., Dergunova E.S., Kalmykova E.N., Eremin S.A. // J. Anal. Chem. 2006. V. 61. № 6. P. 609–613.
25. Badea M., Nistor C., Goda Y., Fujimoto S., Dosho S., Danet A., Barceló D., Ventura F., Emnéus J. // Analyst. 2003. V. 128. № 7. P. 849–856.
26. Mart'ianov A.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Dzantiev B.B. // Int. J. Env. Anal. Chem. 2004. V. 84. № 13. P. 965–978.
27. Mart'ianov A.A., Dzantiev B.B., Zherdev A.V., Eremin S.A., Cespedes R., Petrovic M., Barcelo D. // Talanta. 2005. V. 65. № 2. P. 367–374.
28. Berlina A.N., Komova N.S., Serebrennikova K.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // Engineering Proceedings. 2023. V. 48. № 1. Article 9. <https://doi.org/10.3390/CSAC2023-14919>
29. Berlina A.N., Ragozina M.Y., Gusev D.I., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // Chemosensors. 2023. V. 11. № 7. Article 393. <https://doi.org/10.3390/chemosensors11070393>
30. Kuang H., Liu L., Xu L., Ma W., Guo L., Wang L., Xu C. // Sensors. 2013. V. 13. № 7. P. 8331–8339.
31. Kato M., Ihara Y., Nakata E., Miyazawa M., Sasaki M., Kodaira T., Nakazawa H. // Food and Agricultural Immunology. 2007. V. 18. № 3–4. P. 179–187.

Development of Microplate Immunoenzyme Determination of Nonylphenol with Magnetic Sample Concentration

A. N. Berlina^a, L. V. Barshevskaya^a, K. V. Serebrennikova^a, N. S. Komova^a,
A. V. Zherdev^a, and B. B. Dzantiev^{a, *}

^a*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia*

**e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru*

Nonylphenol is an aromatic organic compound that has an estrogen-like effect and has a negative effect on the human endocrine system. A method has been developed for the competitive determination of nonylphenol using magnetic particles, rabbit antiserum, nonylphenol conjugate with soybean trypsin inhibitor (STI) and biotin. The principle of the analysis is the formation of immune complexes on the surface of magnetite particles due to covalent immobilization of protein G through the oriented immobilization of polyclonal antibodies from rabbit serum during a competitive reaction between the free analyte (nonylphenol) and the bound one (as part of the nonylphenol-STI-biotin conjugate) for the binding sites of specific antibodies. The detection of formed immune complexes is proposed to be carried out using a streptavidin-polyperoxidase conjugate, which makes it possible to achieve a nine-fold gain in the level of the analytical signal. The developed ELISA using magnetite particles allows us to achieve a detection limit of nonylphenol at the level of 3.8 ng/ml, which is 14.5 times lower in comparison with the classical competitive ELISA (55 ng/ml). Based on the results of the experimental work, the optimized volume of the test sample was 500 μ l, which makes it possible to concentrate low-contaminated samples by 17 times.

Keywords: nonylphenol, enzyme immunoassay, magnetite nanoparticle, magnetic concentration