

ENZYMOVÁ IMUNOANALÝZA PRO STANOVENÍ ISOFLAVONOIDŮ

MICHAELA VÍTKOVÁ^a, ZUZANA MACKOVÁ^b,
LADISLAV FUKAL^a a OLDŘICH LAPČÍK^b

^aÚstav biochemie a mikrobiologie, ^bÚstav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
Michaela.Vitková@vscht.cz

Došlo 27.5.04, přijato 1.10.04.

Klíčová slova: ELISA, daidzein, genistein, biochanin A

Úvod

Isoflavonoidy patří mezi rostlinné fytoalexiny, vyskytující se v široké škále rostlin. Jejich typickými producenty jsou rostliny z čeledi bobovitých, ale byly nalezeny i v mnoha dalších, jak dvouděložných tak jednoděložných rostlinách¹. Poprvé vyvolaly isoflavonoidy zájem vědců ve 40. letech, kdy se ukázaly být zodpovědné za poruchy porodnosti ovcí při spásání velkého množství jetele², a jejich estrogenní aktivita se stala předmětem dalšího zkoumání. Prokázalo se, že účinek těchto látek nespočívá pouze v interakci s estrogenními receptory, ale také v inhibici některých důležitých enzymů, především tyrosin proteinkinasy a topoisomeras, zapojených v procesech buněčného růstu a proliferace³. Publikované epidemiologické studie dokazují, že tyto jejich schopnosti se projevují snížením rizika osteoporózy, kardiovaskulárních chorob a některých nádorových onemocnění^{4,5}. V posledních letech je prováděn intenzivní výzkum, týkající se zvláště karcinomu prsu a prostaty. Početné studie jak na zvířatech tak na tkáňových kulturách ukazují, že isoflavonoidy inhibují růst určitých nádorových linií a indukují jejich apoptózu. Nejvýznamější aktivita byla pozorována u genisteinu^{6,7}.

Pro stanovení isoflavonů se běžně používají chromatografické techniky, především HPLC-MS, dále pak HPLC s UV detektorem s diodovým polem (HPLC-UV-DAD) a v poslední době HPLC s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED, cit.⁸⁻¹¹), tyto metody však vyžadují nákladné instrumentální vybavení a neumožňují rychlé stanovení velkého počtu vzorků. Jmenované nevýhody překonávají metody imunochemické. Dříve vyvinuté radioimunochemické stanovení isoflavonoidů¹²⁻¹⁴ jsme v této práci převodili na metody ELISA, které mají oproti RIA výhodu větší stability značky a nemusí se potýkat s technickými a legislativními omezeními, která jsou spojena s použitím radioaktivních látek.

Experimentální část

Chemikálie

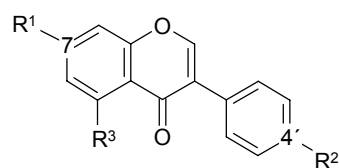
Isoflavonoidy daidzein, daidzin, genistein, genistin a biochanin A a dále *O*-fenylendiamin (OPD), peroxid vodíku, Tween-20, ovalbumin (OVA) a hovězí sérový albumin (BSA) byly od firmy Sigma (St. Louis, USA); 3'-hydroxydaidzein, formononetin a sissotrin byly od firmy Indofine (Somerville, USA). Isoformononetin a prunetin byly připraveny selektivní methyloací daidzeinu a genisteinu¹⁵. Struktury uvedených isoflavonoidů jsou znázorněny na obr. 1.

Prasečí protilátky (tzv. „druhé protilátky“) proti králíčím imunoglobulinům značené peroxidasou (SwaR/Px) byly od firmy SEVAC (Praha), mikrotitrační destičky COSTAR (cat No. 9018) byly dodány firmou Corning Incorporated (USA). Všechny další použité chemikálie pocházely z Lachemy (Brno). Specifické králíčí polyklonální protilátky proti jednotlivým isoflavonoidům byly připraveny v předchozí práci¹².

Konjugáty isoflavonů s proteiny

Jelikož isoflavonoidy jsou nízkomolekulární látky, bylo nutné je pro imunizaci i pro imobilizaci na mikrotitrační destičku navázat na vysokomolekulární nosič. Tímto nosičem byl hovězí sérový albumin (BSA) a syntéza byla provedena podle Yatsimirske a spol.¹⁶. Podrobný postup pro jednotlivé konjugáty byl popsán dříve^{13,14}. V případě daidzeinu a genisteinu byly vytvořeny konjugáty pomocí vazby v polohách 7 a 4', pro biochanin pouze přes polohu 7. Stejný postup byl použit pro syntézu konjugátu 7-karboxymethylgenisteinu s ovalbuminem (OVA).

Molární poměr haptenu : nosič byl zjištěn UV spektrofotometrií při 258 nm a pohyboval se pro jednotlivé konjugáty v rozmezí od 7 do 25 molekul haptenu na 1 molekulu bílkoviny.



Daidzein: R¹=R²= OH, R³=H;
Genistein: R¹=R²=R³=OH;
Formononetin: R¹=OH, R²= OCH₃, R³=H;
Isoformononetin: R¹= OCH₃, R²= OH, R³=H;
Biochanin: R¹=R³= OH, R²= OCH₃;
Prunetin: R¹= OCH₃, R²=R³=OH;
Daidzin: R¹= glukosa, R²= OH, R³=H;
Genistin: R¹= glukosa, R²=R³=OH.
Sissotrin: R¹=glukosa, R²=OCH₃, R³= OH

Obr. 1. Struktura důležitých isoflavonoidů

Enzymová imunoanalýza

Byla použita kompetitivní nepřímá enzymová imunoanalýza (ELISA) se separací vázaných a volných imunoreaktantů prostřednictvím zakotvení na pevnou fázi. Nejprve byl na stěny jamek mikrotitračních destiček imobilizován příslušný antigen (konjugát isoflavonu s BSA nebo OVA). Zásobní roztok antigenu byl vhodně naředěn karbonát-bikarbonátovým pufrém (0,05 mol.l⁻¹, pH 9,6) a pipetován do jamek v množství 100 µl; po inkubaci přes noc při laboratorní teplotě byl roztok konjugátu vylit a jamky čtyřikrát promyty 400 µl PBS-Tw (0,01 mol.l⁻¹ fosfátový pufr, pH 7,4; 0,05% Tween 20). Vlastní kompetitivní imunochemická reakce byla zahájena pipetováním 50 µl roztoku antigenu (kalibračního standardu nebo vzorku) v PBS a 50 µl vhodně naředěné protilátky v PBS-Tw-0,1%BSA. Reakční roztoky byly inkubovány 1,5 hodiny při laboratorní teplotě za mírného třepání. Poté byly jamky čtyřikrát promyty 400 µl PBS-Tw. Kvantifikace navázaných protilátek byla učiněna pomocí tzv. druhé protilátky značené peroxidasou (100 µl konjugátu SwAR/Px ředěného 1:2000 v PBS-Tw). Po inkubaci 1 h při laboratorní teplotě byl nenavázaný konjugát odstraněn čtyřnásobným promytím 400 µl PBS-Tw. Dále bylo do jamek pipetováno 100 µl roztoku peroxidasového substrátu a chromogenní látky (0,03% H₂O₂ v citrátovém pufru 0,1 mol.l⁻¹, pH 5,0 s 0,05% *o*-fenylendiaminem). Enzymová reakce byla po 15 minutách zastavena přidávkem 50 µl H₂SO₄ (2 mol.l⁻¹). Absorbance reakční směsi byla měřena v jamkách mikrotitrační destičky na přístroji Multiscan MCC/340 (Labsystems, Finsko).

Kalibrační křivka byla vytvořena jako závislost absorbance na dekadickému logaritmu koncentrace antigenu (v pg na jamku), přičemž závislost je prokládána čtyřparametrovou regresní rovnicí (sigmoida) v programu MS Excel:

$$A = C + \frac{D - C}{1 + \exp(-2 \cdot (\alpha + \beta \cdot \log(c)))}$$

kde A je absorbance při 492 nm, C je dolní asymptota křivky, D je horní asymptota, α charakterizuje posun lineární části sigmoidní křivky v systému souřadnic a β charakterizuje sklon lineární části sigmoidní křivky.

Důležité zjišťované parametry kalibrační křivky byly: 50% intercept (I_{50}), který představuje koncentraci analytu potřebnou k vyvážení 50 % protilátek přítomných v reakčním roztoku, a detekční limit – nejmenší koncentrace analytu, stanovitelná se správností 95 %. Pro výpočet lze použít vztah, který detekční limit definuje jako koncentraci c_{lim} , která odpovídá podle kalibrační křivky absorbanci $A_{\text{lim}} = A_{\text{blank}} - 3 \cdot \delta$, kde A_{blank} je průměr z absorbancí pro slepý vzorek a δ je směrodatná odchylka z těchto absorbancí.

$$\log(c_{\text{lim}}) = -\frac{1}{2 \cdot \beta} \cdot \left(\ln \left(\frac{D - A_{\text{lim}}}{A_{\text{lim}} - C} \right) + 2 \cdot \alpha \right)$$

Dále byly stanoveny křížové reakce jednotlivých protilátek. Křížové reakce vyjadřují specifitu protilátky vůči antigenu, proti kterému byla připravena, a tedy její schopnost reagovat se strukturálně podobnými analyty. Tyto interakce byly stanoveny jako poměr I_{50} vlastního analytu a I_{50} křížově reagujícího analytu.

Optimalizace metod ELISA

Vliv syčení destičky

Během experimentu může docházet k nespecifickým sorpcím reagujících látek na stěnu mikrotitrační destičky. Z tohoto důvodu bylo testováno použití různých syčících roztoků. Konkrétně se jednalo o Tween 20, želatinu, sušené mléko, kasein a jejich kombinace tak, že roztok byl vždy 1% (w/w).

Délka imunochemické reakce

Při reakci protilátky s navázaným a kompetujícím antigenem by mělo být dosaženo rovnováhy, ovšem při příliš dlouhém časovém úseku dochází k větším nespecifickým interakcím a také se ztrácí jedna z výhod metody, její rychlost. Je tedy nutné nalézt kompromis mezi těmito faktory. V našem případě byla testována délka kompetiční reakce v rozmezí 30 min až 2 h.

Vliv organických rozpouštědel

Extrakce isoflavonoidů z biologického materiálu se často provádí směsí vody a středně polárních organických rozpouštědel, jako jsou ethanol nebo methanol. Tato rozpouštědla mohou ovlivňovat nativní strukturu protilátek a tedy celkovou citlivost metody, byl proto sledován jejich vliv na systémy ELISA. Byly připraveny roztoky o koncentracích 0,5–40 % (v/v) ethanolu v PBS a v těch naředěny standardní kalibrační křivky pro jednotlivé isoflavonoidy. Výsledkem bylo zjištění, jak se mění jejich parametry v závislosti na použité koncentraci rozpouštědla.

Výsledky a diskuse

Při vývoji formátů ELISA pro stanovení biochaninu, daidzeinu a genisteinu jsme vycházeli z protilátek proti biochaninu-7-BSA, daidzeinu-7-BSA, daidzeinu-4'-BSA, genisteinu-7-BSA a genisteinu-4'-BSA, z nichž některé byly již použity u dříve publikovaných RIA metod^{12,14}. Pro každý antigen jsme testovali více protilátek, jejichž přehled spolu s odpovídajícím imunogenem a dalšími informacemi o jednotlivých metodách jsou uvedeny v tabulce I.

Prvním krokem při sestavování metody bylo určení vhodných koncentrací roztoku antigenu pro imobilizaci ve spojitosti s odpovídajícím ředěním příslušné protilátky. Bylo otestováno několik různých koncentrací protilátky i imobilizačního konjugátu a z nich vybrána taková kombinace, která zaručovala maximální využití signálu za současné dostatečné citlivosti spektrofotometru. Jednalo se o takové koncentrace imunoreagencií, u nichž se maximál-

Tabulka I
Přehled použitých konjugátů a protilátek při vývoji metod ELISA

Symbol systému ELISA	Imunogen	Imobilizovaný konjugát	Protilátka	Hlavní kompetitor
B7	biochanin 7-BSA	biochanin 7-BSA	PL 29	biochanin
D4	daidzein 4'-BSA	daidzein 4'-BSA	PL 3	daidzein
D4	daidzein 4'-BSA	daidzein 4'-BSA	PL 4	daidzein
D7	daidzein 7-BSA	daidzein 7-BSA	PL 24	daidzein
G4	genistein 4'-BSA	genistein 4'-BSA	PL 13	genistein
G4	genistein 4'-BSA	genistein 4'-BSA	PL 14	genistein
G7	genistein 7-BSA	genistein 7-OVA	PL 23	genistein
G7	genistein 7-BSA	genistein 7-OVA	PL 11	genistein
G7	genistein 7-BSA	genistein 7-OVA	PL 12	genistein

ní dosažená absorbance pohybovala v rozmezí 1–1,5. Pro zvolené varianty byla sestavena kompetitivní ELISA a stanoveny veškeré parametry a charakteristiky (I_{50} , detekční limit, sklon a délka lineární části kalibrační křivky). Často bylo testováno více kombinací a protilátek, z nichž byla po určení charakteristik jejich kalibračních křivek vybrána ta nejlepší. Ilustrativní kalibrační křivky pro biochanin a daidzein jsou uvedeny na obr. 2.

Jako imobilizovaný antigen byl ve čtyřech metodách použit stejný konjugát jako pro imunizaci. To je sice neobvyklé, ale jak se prokázalo, nemusí to být problém, pokud jsou přítomné protilátky proti BSA vyvážány přidávkem BSA do roztoku. Bylo zjištěno, že postačující koncentrace je 0,1 % BSA (w/w). Pro imunogen genistein-7-BSA se však tímto postupem metodou s dostatečnou citlivostí sestavit nepodařilo. Jako vhodné řešení se ukázalo využití konjugátu 7-karboxymetylgeneisteinu s ovalbuminem jako

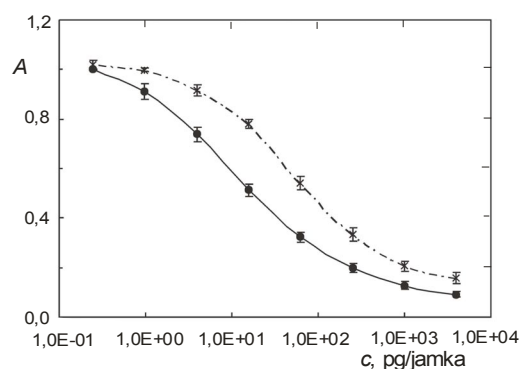
imobilizovaného antigenu, díky kterému se již podařilo sestavit kalibrační křivku s vhodnými parametry.

V další práci byly testovány různé roztoky pro ředění protilátek, sycení destičky, doba kompetiční reakce potřebná pro dosažení rovnováhy a v neposlední řadě vliv organických rozpouštědel na průběh kalibrační křivky.

Pro většinu metod bylo zjištěno, že není nutné sycení desky, neboť nespecifickým sorpcím na desku dostatečně zabráňuje použití 0,05% Tween v roztoku protilátky. Sycení bylo nutné pouze v případě metody pro genistein-7-OVA, jako nevhodnější bylo stanoveno sycení 1% želatinou. Doba kompetiční reakce byla určena na 1,5 h, kdy se již nemění parametry kalibrační křivky, pozadí (nespecifické interakce) je minimální a maximální signál (absorbance) je v rozsahu 1–1,5. Dále byl sledován vliv ethanolu v rozsahu koncentrací 0,5–40 %, neboť extrakty z rostlinného materiálu, které jsou analyzovány těmito metodami, často toto rozpouštědlo obsahují. Bylo zjištěno, že až do obsahu 5 % (v/v) nemá ethanol vliv na stanovení a parametry metody. Vyšší koncentrace již zhoršují detekční limit a průběh kalibrační křivky, především působením na nativní strukturu protilátek. Je tedy nutné extrakty s vyšším obsahem ethanolu vhodně ředit.

Parametry kalibračních křivek získaných takto optimalizovanými metodami jsou shrnuty v tabulce II. Variační koeficienty pro koncentrace analytů blízké I_{50} se pohybovaly v rozmezí 3,5–9,6 % pro stanovení v rámci jedné destičky, a 8–15 %, pro stanovení na čtyřech destičkách.

Z tabulky II je zřejmé, že detekční limity pro jednotlivé isoflavony byly v rozmezí 1,1–5,3 pg na jamku, což odpovídá 22–105 pg.ml⁻¹ a I_{50} se pohybovaly v rozmezí 15,1–60 pg na jamku, což odpovídá 0,3–1,2 ng.ml⁻¹. Dříve publikované ELISA pro stanovení isoflavonů uvádějí hodnoty detekčních limitů 21–70 pg na jamku, případně I_{50} 0,8–20 ng.ml⁻¹ (cit. ^{17,18}), což svědčí o tom, že námi sestavené metody jsou srovnatelné a v některých případech dokonce citlivější.



Obr. 2. Kalibrační křivky pro daidzein (1) a biochanin A (2) v systému D4 a B7

Tabulka II
Charakteristika kalibračních křivek ELISA

Parametr	Systém ELISA				
	B7	D4	D7	G4	G7
Protilátka	PL 29	PL 3	PL 24	PL13	PL 23
I_{50} , pg na jamku	60,6 ± 6,8	15,1 ± 2,9	45,8 ± 2,6	15,8 ± 2,8	33,4 ± 5,7
Detekční limit, pg na jamku	9,3 ± 1,2	1,1 ± 0,4	5,1 ± 0,9	2,9 ± 0,7	1,5 ± 0,3
Pracovní rozsah kalibrační křivky, ng na jamku	4–0,001	0,25–0,001	1–0,004	0,25–0,001	4–0,001
Koncentrace analytu pro imobilizaci, $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	1,0	0,2	0,5	0,2	0,2
Ředění protilátky	1:32 000	1:40 000	1:20 000	1: 60 000	1:20 000
Sklon kalibrační křivky, β	-0,96 ± 0,11	-0,75 ± 0,12	-0,98 ± 0,07	-1,2 ± 0,15	-0,66 ± 0,13

Tabulka III
Hodnoty křížových reakcí (%) vybraných isoflavonoidů s antiséry vůči biochaninu, daidzeinu a genisteinu

Analyt	Systém ELISA / Použitá protilátka				
	B7 / PL 29	D4 / PL 3	D7 / PL 24	G4 / PL 13	G7 / PL 23
Biochanin	100,00	0,48	< 0,01	178,20	0,41
Sissotrin	120,00	0,02	< 0,01	0,13	4,80
Daidzein	< 0,01	100,00	100,00	14,70	9,30
3',4',7-Trihydroxyisoflavon	< 0,01	3,52	3,55	0,06	2,70
Daidzin	< 0,01	0,03	42,10	0,05	1,23
Genistein	2,80	0,57	8,27	100,00	100,00
4', 7-Dihydroxy- 5 -methoxyisoflavon	< 0,01	0,03	5,20	0,15	1,35
5-Hydroxy-7,4' - dimethoxyisoflavon	46,50	< 0,01	< 0,01	0,01	0,22
Genistin	< 0,01	0,21	53,20	0,03	32,00
Formononetin	0,30	192,19	5,60	6,54	< 0,01
Isoformononetin	< 0,01	0,16	342,50	0,01	42,16
Prunetin	5,00	0,02	33,85	2,42	215,00

Pro určení specifity jednotlivých protilátek byly změněny křížové interakce vůči daidzeinu genisteinu a biochaninu s dalšími isoflavonoidy. Díky různým polohám (7, 4') použitým pro syntézu imunizačních konjugátů bylo dosaženo rozdílné specifity používaných metod, a tím i možnosti stanovení dalších analytů, proti nimž nebyly protilátky přímo připraveny. Hodnoty zjištěných křížových reakcí jsou uvedeny v tabulce III.

Jak se dalo očekávat, reagují séra proti imunogenům připraveným přes polohu 7 s odpovídajícími 7-methoxyderiváty, jak je tomu v případě isoformononetinu stanoveného metodou D7, prunetinu metodou G7 a 5-hydroxy-7,4'-dimethoxy isoflavonu rozpoznávaného protilátkami proti biochaninu-7-BSA. Je zřejmé, že tato antiséra reagují i s příslušnými glykosidy daných analytů, což dokazuje reakce s daidzinem (7-O-glukosid daidzeinu), genisti-

nem (7-*O*-glukosid genisteinu) a sissotrinem (7-*O*-glukosid biochaninu). Vůči derivátům nesoucím odlišné substituenty v jiných polohách jsou křížové interakce minimální nebo žádné. V případě antisér získaných vůči daidzeinu-4'-BSA a genisteinu-4'-BSA dochází opět k předpokládané interakci s 4'-*O*-methoxyderiváty, biochaninem a formononetinem. Ostatní isoflavony reagují minimálně a můžeme tedy tyto metody považovat za specifické pro uvedené analyty. Tato zjištění jsou v dobré shodě s dříve publikovanými výsledky stanovení křížových reakcí uvedených protilátek v radioimunoanalýze¹².

Závěr

Za použití polyklonálních protilátek byly vypracovány a charakterizovány postupy nepřímé kompetitivní enzymové imunoanalýzy pro stanovení isoflavonoidů. Detekční limity pro jednotlivé analyty se pohybovaly v rozmezí 1,1–5,3 pg na jamku. Tyto hodnoty hovoří o vysoké citlivosti sestavených metod, které se v tomto parametru vyrovnají dříve publikovaným ELISA nebo je dokonce předčí. Imunochemické metody jsou vhodným doplněním obecně používaných instrumentálních technik. Svoji jednoduchostí, nenákladností a možností adaptace pro sériová vyšetření představují obrovský potenciál zejména ve screeningovém stanovení. Také vysoká citlivost a značný rozsah koncentrací, v němž mohou tyto metody pracovat, nám dává možnost jejich využití ke stanovení isoflavonoidů v nejrůznějších matricích. Zájem humaní a veterinární medicíny budí především detekce těchto estrogenických látek v potravinách, tělních tekutinách a dalších biologických materiálech. Další oblastí uplatnění popsaných metod je fytochemický výzkum, jemuž se na našem pracovišti nyní věnujeme v čeledích *Myrtaceae*, *Rutaceae* a *Brassicaceae*.

LITERATURA

1. Harborne J. B.: *Phytochemistry* 55, 481 (2000).
2. Bennets H. W., Underwood E. J., Shier F. L.: *Aust. Vet. J.* 22, 2 (1946).
3. Adlercreutz H., v knize: *Reproductive and Developmental Toxicology* (Korach K. S., ed.). Marcel Dekker, New York 1997.
4. Nestel P. J., Pomeroy S., Kay S., Komesaroff P., Behrsing J., Cameron J. D., West L.: *J. Clin. Endocr. Metab.* 84, 895 (1999).
5. Yamamoto S., Sobue T., Kobayashi M., Sasaki S., Tsugane S.: *J. Natl. Cancer I.* 95, 906 (2003).
6. Mizunuma H., Kanazawa K., Ogura S., Otsuka S., Nagai H.: *Oncology* 62, 78 (2002).
7. Rice L., Samedi V. G., Medrano T. A., Sweeney

- C. A., Baker H. V., Stenstrom A., Furman J., Shiverick K. T.: *Prostate* 52, 201 (2002).
8. Nurmi T., Mazur W., Heinonen S., Kokkonen J., Adlercreutz H.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28, 1 (2002).
9. Wu Q. L., Wang M. F., Simon J. E.: *J. Chromatogr., A* 1016, 195 (2003).
10. Klejdus B., Štěrbová D., Stratil P., Kubáň V.: *Chem. Listy* 97, 530 (2003).
11. Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., Kanazawa K.: *J. Agr. Food Chem.* 51, 571 (2003).
12. Hampl R., Lapčík O., Stárka L., Adlercreutz H.: *Chem. Listy* 92, 44 (1998).
13. Lapčík O., Hampl R., Hill M., Wähälä K., Nawaf A. M., Adlercreutz H.: *J. Steroid Molec. Biol.* 64, 261 (1998).
14. Lapčík O., Hill M., Hampl R., Wähälä K., Adlercreutz H.: *Steroids* 63, 14 (1997).
15. Lapčík O., Hill M., Černý I., Lachman J., Al-Maharik N., Adlercreutz H., Hampl R.: *Plant Science* 148, 111 (1999).
16. Yatsimirskaya E. A., Gavrilova E. M., Egorov A. M., Levashov A.: *Steroids* 58, 547 (1993).
17. Bennetau-Pelissero C., Le Houerou C., Lamothe V., Le Menn F., Babin P., Bennetau B.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 305 (2000).
18. Creeke I. P., Wilkinson A. P., Lee H. A., Morgan M. R. A., Price K. R., Rhodes M. J. C.: *Food Agric. Immun.* 10, 325 (1998).

M. Vítková^a, Z. Macková^b, L. Fukal^a, and O. Lapčík^b (^a*Department of Biochemistry and Microbiology,* ^b*Department of Chemistry of Natural Substances, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Enzyme Immunoassay for the Determination of Isoflavones**

Competitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the determination of isoflavones daidzein, genistein and biochanin were developed. Isoflavone conjugates coupled at positions C7 and C4' via a carboxymethyl spacer to bovine serum albumin were used as immunogens and also as coating antigens. Assay conditions, including concentrations of antisera and coating antigens, were optimized and the effect of reaction time, various blocking agents and organic solvents was investigated. The developed ELISA assays are highly sensitive, the I_{50} values of standard curves ranging between 15–60 pg/well, i.e. 0.3–1.2 ng.ml⁻¹. Cross reactivities to other isoflavones are in an acceptable range and interference of non-isoflavonoid molecules is negligible. The immunoassays have been used in phytochemical research for monitoring isoflavone levels in various plant families. We expect further use of the assays in analysis of food, body fluids, cell culture media and other biological materials.