



УКРАЇНА

(19) UA (11) 59512 (13) A

(51) 7 A61K39/12

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЧИСТКИ АНТИГЕНУ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

1

2

(21) 2002032279

(22) 22 03 2002

(24) 15 09 2003

(46) 15 09 2003, Бюл. № 9, 2003 р.

(72) Стегній Борис Тимофійович, Антонов Вален-
тин Сергійович, Михайлова Светлана Анатоліївна(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І
КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ(57) Спосіб очистки антигену для діагностики лей-
козу великої рогатої худоби концентрацією

вірусомісної рідини, заморожуванням та відтаюванням із подальшим знесолюванням, який відрізняється тим, що вірусомісну рідину концентрують трикратним заморожуванням та відтаюванням або за допомогою поліетилєнглїколю (ПЕГ-115), а імунонеактивні білки, що випали в осад, видаляють і після ультрацентрифугування використовують очищений антиген в імуноферментному аналізі

Винахід, що передбачається, відноситься до ветеринарної вірусології (біотехнології), а саме до способів очистки антигену для діагностики лейкозу великої рогатої худоби (ВРХ).

Задачею винаходу є очистка вірусних білків від білків культуральних клітин та білків живильного середовища для подальшого використання одержаного таким чином антигену в реакції імунодифузії або імуноферментному аналізі.

Для очистки антигену використовують методи ультрафільтрації, завдяки яким є можливість обробляти значні об'єми вірусміщущої суспензії (Залевский Д. И. Получение вируспродуцирующих культур клеток и антигена онкорнавируса крупного рогатого скота, бюл. ВИЭВ, М., 1979, вып. 36, с. 25 - 27). Якість антигену перевіряють у реакції імунодифузії. Цей спосіб використовується для значних об'ємів культурального вірусу.

Існує "Способ получения антигена для диагностики лейкоза крупного рогатого скота в реакции иммунодиффузии" (А. С. № 1585951 кл. А61К39/12, ст. 27 1988 г.). Культивування клітин, що хронічно інфіковані онкорнавірусним антигеном, проводять на живильному середовищі, що містить гідролізат та має 0,5% білка, в яке додатково вводять гемогідролізат, а антиген одержують із твердої фази шляхом ультразвукової дезінтеграції. Таким чином одержують чистий антиген. Спосіб є трудомістким.

Існує спосіб одержання антигену (Ставропольский НИ противочумный институт патент России № 2152224 от 30.06.98 G01N33/53 "Способ получения антигена"). В цьому способі використовується глибоке заморожування для одержання чистого

антигену. Цей спосіб може бути прототипом. В ньому використовують концентрацію вірусміщущої рідини заморожуванням та відтаюванням, після чого вірусміщущу рідину знесолюють.

В основу винаходу, що передбачається, поставлено задачу розробити спосіб очистки антигену для діагностики лейкозу великої рогатої худоби концентрацією вірусміщущої рідини заморожуванням та відтаюванням з подальшим знесолюванням, шляхом концентрації вірусміщущої рідини трикратним заморожуванням та відтаюванням або за допомогою поліетилєнглїколю (ПЕГ-115), а імунонеактивні білки, що випали в осад, видаляються, і після ультрацентрифугування можливе використання очищеного антигену в імуноферментному аналізі.

Вірусміщуща рідина (культуральна рідина і суспензія клітинного детрїту) концентрується трикратним заморожуванням та відтаюванням або за допомогою поліетилєнглїколю (ПЕГ-115) з подальшим її знесолюванням. При цьому частина імунонеактивних солерозчинних білків вірусного антигену об'єднуються і центрифугуються спочатку через 30%-ву сахарозу при 35 тис. г, а далі при 70 тис. г у градієнті сахарози 15 - 60% і відбирається фракція з щільністю 1,15 - 1,17 г/см³.

Аналіз відомих технічних рішень у галузі вірусології дозволяє зробити висновок про відсутність ознак, що схожі із суттєвими відмінними ознаками способу, що заявляється, та признати це рішення, відповідним критерію "суттєві ознаки".

Приклад 1

Вірусміщущу рідину після вирощування

(13) A
59512
(11)
UA
(19)

культуральної тканини, хронічно інфікованої вірусом лейкозу ВРХ, заморожували у флаконах. Після відтавання рідини із флаконів відбирали тільки ту рідину, яка містить білок, що контролюється на спектрофотометрі при довжині хвилі 280нм, або якісною реакцією, наприклад, 10%-вим розчином трихлороцтової кислоти (ТХО). Рідина, що не містить білок, відкидається. Таку операцію повторювали тричі. При цьому концентрація білка підвищувалась з 0,6 - 1,0г% до 7 - 8г% - у кінці процесу. Сконцентровану рідину вносили у колонку розміром 25 x 450мм з сефадексом G-25. І вимивали водою. Перша фракція, яка виходила з колонки, жовтого кольору, мутна, з осадом. Осад цієї фракції - нерозчинний у воді, неактивний в РІД глобулярні білки. Другу фракцію - прозору, рожевого кольору - збирали під контролем наявності в ній білку. Після цього надосад першої і другу фракції об'єднували, а фракції, що залишились у колонці, відкидали. Об'єднані першу і другу фракції концентрували зневоднюванням через полупроникливу перетинку проти ПЕГ-115 і центрифугували. По-перше, рідину пропускали через 30%-ову сахарозу при 35 тис g, а далі при центрифугуванні з 70 тис g у градієнті 15 - 80%-вої сахарози відбирали фракцію з щільністю 1,15 - 1,17г/см³. Білок цієї фракції використовували як антиген для в ІФА.

Приклад 2

Виготовляли антиген, як вказано вище (приклад 1). Відмінність полягала у тому, що, якщо у першому прикладі концентрували великі об'єми вірусеміщуючої рідини, то при об'ємі менш ніж 2 літри початкове концентрування до нанесення на колонку проводили проти ПЕГ-115 у полупроникливій перетинці. Подальша робота повинна проводитись, як у прикладі 1.

Приклад 3

Виготовляли антиген, як наведено вище (приклад 1). Відмінність полягала у тому, що вірусеміщуючу рідину після концентрування й очистки на колонці, ліофілізували. Далі ліофілізат розчиняли у трис-ДЕАЕ-буфері і чистили на ультрацентрифугі, як наведено у 1-му прикладі.

Таким чином, використання способу дало змогу одержати чистий антиген.

На підставі одержаних результатів можна зробити висновок, що "Спосіб очистки антигену для діагностики лейкозу великої рогатої худоби" призначено для очистки вірусних білків від білків культуральних клітин та рідини з метою подальшого використання одержаного таким чином антигену для діагностики лейкозу ВРХ в імуноферментному аналізі або в реакції імунодифузії. Цей спосіб є більш ефективним у порівнянні з іншими.