

Винахід належить до імунохімії, охорони здоров'я та може бути використаний при створенні діагностичних тест-систем для імуноферментного аналізу.

Відомі способи використання ТМБ як хромогену для імуноферментного аналізу. Описано склад та спосіб приготування розчинів, в яких концентрація ТМБ становить до 1,25г/л і які містять стабілізатори: діетилгідроксиамін (1), пеніцилін (2), полімери (1-етеніл-2-піролідон, метил-вініловий ефір з малеїновим ангідридом) та полісахариди (декстран, карагінан) (3), бацитрацин та органічні розчинники (4), 1-метил-2-піролідон та органічні розчинники (5). Вартість реагентів в цих прописках економічно не виправдана.

В основу винаходу поставлено завдання - створити високоефективний двокомпонентний розчин проявника, який можна використати для діагностичних тест-систем на основі імуноферментного аналізу.

Поставлене завдання вирішили шляхом створення двокомпонентного розчину проявника.

Розчин 1 містить:

ТМБ або його солі	0,1-0,3г/л;
Гідразин-гідрат	0-0,5г/л;
бензойну кислоту	0,1-1г/л;
третон Х-100	0-0,1г/л;
pH розчину доводиться до значення в інтервалі	
1,4-4.	

Розчин 2 містить:

перекис водню	0,1-0,3г/л;
натрій двозаміщений фосфорнокислий	
дванадцяти водний	35,8г/л;
лимонну кислоту (моногідрат)	12г/л;
бензойну кислоту	0,1-1г/л;
pH розчину - 4,6.	

При проведенні імуноферментного аналізу розчини змішують в рівних об'ємах і вносять в лунки планшета для візуалізації результатів аналізу.

Приклад 1.

Готують розчин 1 (розчин ТМБ). 3,3',5,5'-тетраметилбензидин-дигідрохлорид (0,2г) розчиняють у 1 літрі очищеної води при нетривалому нагріванні до кипіння. Отриманий безбарвний розчин охолоджують та додають бензойну кислоту (0,1г); pH розчину доводять до значення 3,3. Зберігають не менш як 1 рік при 4°C.

Готують розчин 2 (розчин перекису водню). Розчиняють 35,8г натрію двозаміщеного фосфорнокислого дванадцятиводного та 12г гідрату лимонної кислоти в 0,9л очищеної води. Додають бензойну кислоту (0,1г), доводять значення pH до 4,6, а об'єм розчину - до 1л. Отриманий розчин зберігають не менш як 18 годин при +4°C, після чого перевіряють значення pH; при необхідності, значення pH корегується; в 1л отриманого розчину вносять 0,4мл перекису водню (35%). Зберігають не менш як 1 рік при 4°C.

Приклад 2.

Готують розчин 1 (розчин ТМБ). 3,3',5,5'-тетраметилбензидин-дигідрохлорид (0,2г) розчиняють у 1 літрі очищеної води при нетривалому нагріванні до кипіння. Отриманий безбарвний розчин охолоджують та додають бензойну кислоту (0,1г); pH розчину - 1,5. Зберігають не менш як 1 рік при 4°C.

Готують розчин 2 (розчин перекису водню). Розчиняють 35,8г натрію двозаміщеного фосфорнокислого дванадцятиводного та 12г лимонної кислоти (моногідрату) в 0,9л очищеної води. Додають бензойну кислоту (0,1г), доводять значення pH до 4,6, а об'єм розчину - до 1л. Отриманий розчин зберігають не менш як 18 годин при +4°C, після чого перевіряють значення pH; при необхідності, значення pH корегується; в 1л отриманого розчину вносять 0,4мл перекису водню (35%). Зберігають не менш як 1 рік при 4°C.

Приклад 3.

Готують розчин 1 (розчин ТМБ). 3,3',5,5'-тетраметилбензидин-дигідрохлорид (0,2г) розчиняють у 1 літрі очищеної води при нетривалому нагріванні до кипіння. Отриманий безбарвний розчин охолоджують та додають бензойну кислоту (0,1г) і гідразин-гідрат (0,1мл). Доводять значення pH до 1,5. Зберігають до 1 року при 4°C.

Готують розчин 2 (розчин перекису водню). Розчиняють 35,8г натрію двозаміщеного фосфорнокислого дванадцятиводного та 12г лимонної кислоти (моногідрату) в 0,9л очищеної води. Додають бензойну кислоту (0,1г), доводять значення pH до 4,6, а об'єм розчину - до 1л. Отриманий розчин зберігають не менш як 18 годин при +4°C, після чого перевіряють значення pH; при необхідності, значення pH корегується. В 1 л отриманого розчину вносять 0,4мл перекису водню (35%). Зберігають не менш як 1 рік при 4°C.

Приклад 4.

Готують розчин 1 (розчин ТМБ). 3,3',5,5'-тетраметилбензидин-дигідрохлорид (0,2г) розчиняють у 1 літрі очищеної води при нетривалому нагріванні до кипіння. Отриманий безбарвний розчин охолоджують та додають туди бензойну кислоту (0,1г), гідразин-гідрат (0,1мл) та третон Х-100 (0,1г). Доводять значення pH до 1,5. Зберігають до 1 року при 4°C.

Готують розчин 2 (розчин перекису водню). Розчиняють 35,8г натрію двозаміщеного фосфорнокислого дванадцятиводного (х.ч.) та 12г лимонної кислоти (моногідрату, х.ч.) в 0,9л очищеної води. Додають бензойну кислоту (0,1г), доводять значення pH до 4,6, а об'єм розчину - до 1л. Отриманий розчин зберігають не менш як 18 годин при +4°C, після чого перевіряють значення pH; при необхідності, значення pH корегується; в 1л отриманого розчину вносять 0,4мл перекису водню (35%). Зберігають не менш як 1 рік при 4°C.

Використання розчинів при проведенні імуноферментного аналізу.

Приготування розчину проявника.

В чистому флаконі готують розчин проявника, для цього вносять буфер та розчин ТМБ в співвідношенні 1:1 з розрахунку по 100мкл на лунку планшета. На 96 проб потрібно 6мл розчину 1, що містить ТМБ, та 6мл розчину 2, що містить перекис водню. Розчин проявника слід оберегати від світла та від контакту з металами або іонами металів. Перед використанням розчин проявника має бути безбарвний.

На відповідному етапі проведення імуноферментного аналізу, коли у позитивних пробах присутні імунні комплекси, що містять пероксидазу, вносять в лунки планшету по 100мкл розчину проявника.

Інкубують планшет при 18-22°C в темному місці 30 хвилин.

Зупиняють кольорову реакцію, додаючи до всіх проб по 50-100мкл стоп-реагента (розчин сірчаної кислоти). Стоп-реагент вносять у тій же послідовності, що і розчин проявника.

Не більш як через 1 хвилину після припинення кольорової реакції визначають оптичну густину проб у двохвильовому режимі (при 450нм відносно 620нм).

Запропоновано двокомпонентний розчин проявника, який містить хромоген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, забезпечує надійне проведення імуноферментного аналізу, зручність у користуванні, відрізняється складом розчинів та методом приготування розчинів. Застосовувані розчини малотоксичні [3].

Використана література

1. United States Patent; Cantarow; 4,824,784; April 25,1989. Chromogenic solution for immunoassay.
2. United States Patent; Pauy; 4,891,314; January 2,1990. Agent for the determination of peroxidase activity, with stabilizer, a process for its preparation and its use.
3. United States Patent; Woiszwill; 5,006,461; April 9,1991. TMB formulation for soluble and precipitable HRP-ELISA.
4. United States Patent; Tai; 5,206,150; April 27,1993. Composition of, method of producing and method of using a stabilized formulation for assaying peroxidase activity.
5. United States Patent; Heras; 5,804,404; September 8,1998. Stable substratechromogen solution for enzyme activity detection.
6. Т.А.Быченкова, В.Г.Помелова, А.В.Чудинов, А.Е.Куприн, Н.А.Лаврова, Н.С.Осин, А.М.Бутенко. Использование 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в качестве субстрата при иммуноферментном анализе. - Клиническая и лабораторная диагностика, №1, 1995г.