



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **19886** (13) **U**
(51) МПК (2006)
C12N 5/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОЗИТИВНОГО КОНТРОЛЮ ІМУНОФЕРМЕНТНИХ ТЕСТ-СИСТЕМ, ПРИЗНАЧЕНИХ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ ДО ЗБУДНИКІВ TORCH-ІНФЕКЦІЙ**

1

(21) u200601619
(22) 16.02.2006
(24) 15.01.2007
(46) 15.01.2007, Бюл. №1, 2007р.
(73) ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "НАУКОВО-ВИРОБНИЧА КОМПАНІЯ "ВІТРОТЕСТ"
(57) Спосіб одержання позитивного контролю імуноферментних тест-систем, призначених для ви-

2

значення антитіл до збудників TORCH-інфекцій, який передбачає виділення із сироватки крові людини імуноглобулінів класу М, який **відрізняється** тим, що є універсальним і для його одержання IgM людини виділяють із сироватки здорових донорів та кон'югують із моноклональними антитілами до ферменту пероксидази хрону з використанням агента зшивального агента сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилату.

Корисна модель стосується імунохімії та гібридомної технології і може бути використана для одержання позитивних контролів імуноферментних діагностичних тест-систем. Метою корисної моделі є одержання позитивного контролю для імуноферментних тест-систем із використанням моноклональних антитіл (МКАТ) до ферменту пероксидази хрону (ПХ).

Відомий спосіб створення позитивних контролів імуноферментних тест-систем [2], який передбачає використання у цій якості імуноглобулінів людини, виділених із сироваток хворих на певне інфекційне захворювання (токсоплазмоз, червонка, герпес, цитомегаловірусна інфекція тощо). Однак такий спосіб має декілька недоліків. По-перше, він не універсальний: у даному разі необхідно одержувати специфічні імуноглобуліни із сироватки хворих на те захворювання, для діагностики якого призначена дана тест-система. По-друге, при одержанні контролів імуноферментних тест-систем, призначених для визначення IgM-антитіл, вкрай дефіцитним є вихідна сировина - донорська сироватка чи плазма із вмістом специфічних до певного збудника IgM людини. Більш близьким до запропонованого є спосіб одержання позитивних контролів імуноферментних тест-систем, який зводиться до синтезу кон'югату IgM людини та моноклональних антитіл, специфічних до вірусних чи бактерійних антигенів [3, 4]. Контролі, одержані у такий спосіб, також не є універсальними і кожен контроль може бути вико-

ристаний у тест-системі для визначення IgM-антитіл лише до певного збудника.

В основу корисної моделі поставлено завдання: одержати позитивний контроль імуноферментних тест-систем із використанням моноклональних антитіл до ферменту пероксидази хрону.

У порівнянні із вищезгаданим підходом до одержання позитивних контролів імуноферментних тест-систем запропонована нами схема є універсальною і не має обмежень, які пов'язані із дефіцитом вихідної сировини. Позитивний контроль створений на основі МКАТ до пероксидази хрону, які кон'юговані із імуноглобулінами людини класу М, є універсальним і може бути використаний у імуноферментних тест-системах для визначення антитіл класу IgM до збудників інфекційних хвороб, які побудовані за принципом так званої «IgM-пастки». З іншого боку, для одержання такого контролю необхідна сироватка чи плазма здорових донорів, яка не є дефіцитною.

Поставлене завдання вирішують шляхом: 1) одержання моноклональних антитіл до ферменту пероксидази хрону шляхом культивування у черевній порожнині мишей лінії BALB/c гібридом-продуцентів даних МКАТ, відбору асцитичної рідини та виділення антитіл осадженням сульфатом натрію та амонію; 2) одержання імуноглобулінів людини класу М із сироватки чи плазми здорових донорів [3]; 3) одержання кон'югату моноклональних антитіл до ПХ та імуноглобулінів людини класу М із використанням у якості зшивального агенту

(13) **U**(11) **19886**(19) **UA**

сукциніміділ-4-(N-малеїмідометил) циклогексан-1-карбоксилату (SMCC) [4].

Приклад 1. Виділення моноклональних антитіл до пероксидази хрому із асцитичної рідини.

Розморожували асцитичну рідину із вмістом МКАТ до ПХ та переносили її у центрифужну пробірку на 15мл. Пробірку поміщали у нагріту до 45-50°C воду на 5 хвилин. Зважували сульфат натрію в кількості, потрібній для 18%-го насичення (вага на об'єм) асцитичної рідини, всипали у пробірку з асцитом та старанно струшували до розчинення сульфату натрію. Спостерігали помутніння, зумовлене випадінням в осад МКАТ. Пробірку центрифугували при 10000об./хв впродовж 5 хвилин у кутовому роторі. Після чого надосад видаляли, а осад антитіл розводили у 5мл деіонізованої води. Пробірку поміщали у нагріту до 45-50°C воду на 5 хвилин.

Знову зважували сульфат натрію у кількості, потрібній для 16%-го насичення (вага на об'єм) розчину антитіл, всипали у пробірку та старанно струшували до розчинення сульфату натрію. Спостерігали помутніння, зумовлене випадінням антитіл в осад. Пробірку центрифугували при 10000об./хв впродовж 5 хвилин у кутовому роторі. Після чого надосад видаляли, а осад антитіл розводили у 2-3мл деіонізованої води.

Одержаний розчин МКАТ фільтрували через фільтри з порами 0,45мкм.

Для переведення МКАТ у фосфатний буфер використовували 0,02М фосфатний буфер (рН 7,2-7,4) та колонку 1,5×20см з сефадексом G-25 зрівноважену фосфатним буфером. МКАТ, одержані раніше, в об'ємі 2-3мл наносили на гель, після поглинання розчину гелем наносили такий же об'єм буферу. Після поглинання гелем буферу колонку заповнювали фосфатним буфером доверху, вставляли адаптер та проводять елюцію фосфатним буфером із швидкістю 2мл/хв. Вихід піку реєстрували при 280нм. Збирали фракцію МКАТ в окремий флакон, додавали 1% 10%-ого азиду натрію та зберігали при плюс 4°C до 6 місяців.

Приклад 2. Одержання препарату IgM людини.

Для виділення імуноглобулінів класу М використовували еуглобулінову фракцію сироватки крові, яка крім IgM людини містила ще й α_2 -макроглобулін. З метою розділення згаданих білків сироватки застосовували їх осадження поліетиленгліколем (ПЕГ) 8000. При концентрації ПЕГ 5% IgM майже повністю втрачали розчинність та утворювали преципітат, який збирали центрифугуванням. У той же час α_2 -макроглобулін залишався в надосаді, оскільки його фракціонування відбувається при концентраціях 10-12% ПЕГ. Преципітат IgM розчиняли у мінімальній кількості фосфатного буферу та позбувалися від нерозчинних домішок центрифугуванням при 4000об./хв. упродовж 15хв. та фільтруванням через пори 0,2мкм. Останнім етапом очистки IgM була гель-фільтрація на колонці 2,5×100см з сефакрилом S-300. Імуноглобуліни класу М утворювали перший пік, а інші білки, що забруднювали препарат, - другий пік. Фракції першого піку об'єднували та концентрували зворотнім діалізом проти ПЕГ 40000 до 1/10 об'єму. Для усунення контамінації цільового препарату одержані

таким чином IgM обробляли 1%-м тритоном X-100, після чого проводили ще один цикл хроматографії на сефакрилі S-300. Додавання детергенту запобігало агрегації молекул у препараті, що дозволило під час другого циклу хроматографії позбутися ще деякої кількості баластних білків. Фракції першого піку збирали, об'єднували та використовували для кінцевої перевірки чистоти IgM у електрофорезі у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію та у імунодифузії за Оухтерлоні [5].

Приклад 3. Спосіб використання кон'югату моноклональних антитіл до пероксидази хрому з IgM людини.

Сорбцію МКАТ до IgM людини у полістиролових планшетах проводили у 0,05М карбонат-бікарбонатном буфері (рН 9,6) протягом ночі при 4°C в концентрації 2,5мкг/мл. Для відмивання використовували фосфатно-сольовий буфер з додаванням 0,05% твін-20 (ФСБТ), рН 7,2-7,4. У лунки планшета вносили досліджувані зразки сироваток крові та позитивний контроль (кон'югат моноклональних антитіл до пероксидази хрому з IgM людини). Планшет інкубували 1 годину при 37°C і потім відмивали. Для виявлення зв'язаних антитіл використовували кон'югат рекомбінантного білку-антигену вірусу простого герпесу з пероксидазою хрому, який інкубували 1 годину при кімнатній температурі. Планшет тричі відмивали ФСБТ і один раз водою. Як субстрат використовували 0,003% розчин перекису водню в 0,15М нитратному буфері, рН 5,0, а як хромоген - орто-фенілєндамін. Реакцію зупиняли 2М сірчаною кислотою. Оптичну щільність при довжині хвиль 492нм і 630нм вимірювали на спектрофотометрі.

Таким чином, запропонований метод одержання та позитивних контролів імуноферментних тест-систем із використанням моноклональних антитіл до ПХ дозволяє отримувати універсальні контролі діагностичних наборів для визначення IgM-антитіл до збудників інфекційних захворювань, які побудовані за принципом так званої «IgM-пастки».

Перелік літературних джерел:

1. Brynda E., Houskaa M., Brandenburg A. et al. Optical biosensors for real-time measurement of analytes in blood plasma // *Biosensors and Bioelectronics*. - 2002. - Vol. 17, 8. - P.665-675.
2. Специфическая лабораторная диагностика TORCH-инфекций. Практическое пособие / Г.Е. Раевская, Л.П. Михайленко, Л.А. Ганова и др. - К.: Діапрофмед, 2004 - 108с.
3. Moffa D.J., Camele J. Evaluation of Liquichek immunology controls // *Clinical Chemistry*. - 1988. - Vol. 34, 8. - P.1656-1657.
4. Levesque A., Letellier M., Grant A. Analytical evaluation of the CK-MB mass assay on the Technicon Immuno 1® system // *Clinical biochemistry*. - 1997. - Vol. 30, 1. - P.11-16.
5. Nikolayenko I.V., Galkin O.Yu., Grabchenko N.I. et al. Preparation of highly purified human IgG, IgM, and IgA for immunization and immunoanalysis // *Ukrainica Bioorganica Acta*. - 2005. - Vol. 2,2. - P.3-11.
4. Hemanson G.T. Bioconjugate techniques. - San Diego: Academic Press, 2000. - P.461-469.

