



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 47699

(13) A

(51) 6 G01N33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЕКСПРЕС-ВИЗНАЧЕННЯ ПАТОГЕННОЇ ФОРМИ ПРИОНОВОГО БІЛКА

1

2

(21) 2001075346

(22) 26 07 2001

(24) 15 07 2002

(46) 15 07 2002, Бюл. № 7, 2002 р.

(73) ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА НАН
УКРАЇНИ(57) Спосіб експрес-визначення патогенної форми
прионного білка, що включає обмежену протеолітичну
деградацію досліджуваного зразка з по-

дальшим визначенням сорбції патогену на афінній
нерозчинній поверхні, який відрізняється тим, що
наявність та кількість інфекційного агента визна-
чають за адгезією протеїназостійкого білка до ма-
лоімунногенної поверхні з показником
гідрофільності - кутом змочування водою у по-
втряному середовищі θ - в діапазоні від 42° до
 127° C

Винахід відноситься до медицини, біотехнології,
харчової, фармацевтичної та парфумерної
промисловостей та може бути використаний з ме-
тою виявлення та кількісного визначення інфіцій-
ного агента групи нейродегенеративних спонгіфо-
рмних енцефалопатій - так званої патогенної фо-
рми прионного білка (PrP^{Sc}) [1]

Відомо, що нормальна клітинна форма прио-
нового білка (PrP^C) синтезується у нервових кліти-
нах ссавців, виводиться з клітини та підлягає шви-
дкій деградації позаклітинними протеїназами [1].
Патогенна форма пріонів відрізняється від норма-
льної лише за способом укладки поліпептидного
ланцюгу [2] та спричиненими цією відмінною фізико-
хімічними та біохімічними властивостями, зокрема
- малою імунногенністю, високою стійкістю до дії
денатураційних чинників та протеолітичних ферме-
нтів [3,4]. Патогенні форми пріона також ви-
сока спорідненість (адгезія) до металевої поверхні,
що призвело до масового інфікування інтрацереб-
ральними внутрішньомозковими електродами,
попередньо використаними для обстеження та
лікування інфікованої людини [5,6].

До нещодавно єдиний метод визначення на-
явності прионної інфекції у біологічному середо-
вищі полягав у морфологічних змінах, спричине-
них інтрацеребральним інфікуванням лаборатор-
них тварин, зокрема сірійських ховрахів та штучно
введених трансгенних мишей з підвищеною експресією
прионного білка [7]. Подібні методи прак-
тично не придані до застосування у медичній діаг-
ностиці, біотехнології, фармацевтичній, харчовій
та парфумерній промисловостях, оскільки через

специфічний характер перебігу патології потребу-
ють великого (порядку кількох місяців) інкубацій-
ного періоду та використання великої кількості
лабораторних тварин. В останні роки розроблено
більш досконалі імуноферментні методи, осно-
вані на використанні антитіл до окремих поверх-
невих ділянок (епітопів) патогенної форми прио-
нового білка [8].

Як прототип вибрано імуноферментний ме-
тод визначення наявності патогенної форми прио-
нового білка в екстрактах нервових тканин забитої
великої рогатої худоби [9]. Спосіб-прототип поля-
гає в обмеженій протеолітичній деградації дослі-
джуваного матеріалу протеолітичними фермен-
тами серинового ряду з подальшим сендвічним
імуноферментним визначенням стабільного до
протеолітичної деградації домена патогенного
прионного білка (PrP^{Sc}) за допомогою фермент-
зв'язаного імуносорбенту (ELISA) [9].

Недоліки способу-прототипу полягають в об-
меженій придатності до практичного застосування
через складність виконання, високу ціну та лабіль-
ність імунних та фермент-асоційованих препара-
тів, а також у принциповій непридатності до вияв-
лення прионних форм, відрізняючись від заданої ви-
дової форми прионного білка [10].

Задача винаходу полягає в розробці придат-
ного до масового практичного використання спо-
собу експрес-визначення патогенної форми прио-
нового білка.

Поставлена задача досягнута завдяки комплексному використанню відомих та притаманих всім
без винятку видам патогенної форми прионного

(13) A

(11) 47699

(19) UA

білка властивостей - відносно великої стійкості до дії протеолітичних ферментів та високої адгезії до гідрофобних поверхностей як наслідку формування характерної конформації PrP^{Sc} внаслідок взаємодії неструктурованої білкової молекули з подвійним гідрофобним шаром клітинних мембран (так званого мембранного фолдингу [11]). Досліджуваний зразок піддають обмеженій протеолітичній деградації, після чого проводять визначення сорбції на гідрофобній поверхні датчика мономолекулярного шару протеїназостійких білків. Одним з найпростіших видів апаратного оформлення реєстрації сорбції білкового моношару на поверхні датчика є застосування методу плазмонного резонансу [12, 13].

Спільні риси способу-прототипу та способу, що заявляється, полягають у попередній обмеженій протеолітичній деградації досліджуваного зразка з подальшим визначенням сорбції протеїназостійкого інфекційного агента на афінній нерозчинній поверхні.

На відміну від способу-прототипу, що полягає в реєстрації зв'язування протеїназостійкого домена патогенної форми пріонового білка (PrP^{res}) після обмеженої деградації досліджуваного біологічного матеріалу сериновими протеїназами, запропонований спосіб базується на притаманній патогенній формі пріонового білка високій спорідненості (адгезії) до гідрофобних (зокрема - металевих) поверхней, не вимагає дорогих та лабільних імуноферментних препаратів та не має принципової обмеженості щодо видового походження пріонового білка.

Спосіб визначається відповідно до наведених прикладів.

Приклад 1 Спектроскопічне обладнання

Спектрометр поверхневого плазмонного резонансу (ППР) BioSulprag та сенсорні платівки з напильним шаром полікристалічного металу було виготовлено в Інституті фізики напівпровідників НАН України. Попередню пасивацію металевої поверхні сенсорних платівок проводили в Інституті біохімії НАН України.

Приклад 2 Інфекційний матеріал

Гомогенат головного мозку інфікованих BSE-позитивних мишей готували згідно [9] в 0.5 М розчині хлориду натрію в 0.05 М трис-солянокислому буфері, що містив 0.01 М хлориду кальцію, pH 7.4 за співвідношення 1:5 (вага: об'єм). Відокремлювали супернант центрифугуванням при 3000 g протягом 20 хвилин, після чого проводили обмежений гідроліз протеїназою K з подальшим розведенням зразків тим же буфером. В якості контролю використовували аналогічним чином приготувані препарати з головного мозку неінфікованих мишей.

Приклад 3 Спектроскопічне визначення сорбції білкового моношару

Спектроскопічне визначення проводили згідно [14] за кімнатної температури та постійній швидкості протікання досліджуваної та промивної рідин через кювету ППР-спектрометра. Спостерігали надійну реєстрацію сорбції білкового моношару за умов проходження через кювету 0.2 мл зразка у розведенні 1:3000 збільшення досліджуваного

об'єму до 1.2 мл забезпечувало надійну реєстрацію за 12000-ного розведення. Препарати з неінфікованої сировини зміни ІІІ ІР-сигналу не викликали за будь-яких розведень.

З наведених прикладів витікає, що за чутливістю до пріонові інфекції розроблений спосіб не поступається імуноферментному методу [9], перевершуючи останній простотою виконання, нечутливістю до видового типу пріонові інфекції, відсутністю потреби в дорогих та лабільних препаратах та здатністю до реєстрації найменших кількостей PrP^{Sc} завдяки можливості збільшення об'єму досліджуваної проби.

Тим самим розроблено придатний до практичного застосування спрощений експрес-метод визначення патогенної форми пріонового білка, що може бути використаний у медичній діагностиці, біотехнології, фармацевтичній, харчовій та парфумерній промисловостях.

Список посилань

- 1 Prusiner S. Molecular biology of prion disease // *Science* - 1991, 14 June - 252 - P 1515 - 1522
- 2 Pan K, Baldwin M, Nguyen J et al. Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion protein // *Proc Natl Acad Sci USA* - 1993 - 90, N 23 - P 10962 - 10966
- 3 McKinley M, Bolton D, Prusiner S. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion // *Cell* - 1983 - 35, N 1 - P 57 - 62
- 4 Kocisko D, Come J, Priola S et al. Cell-free formation of proteinase-resistant prion protein // *Nature* - 1994 - 370 - P 471 - 474
- 5 Brown P, Preece M, Will R. "Friendly fire" in medicine: hormones, homographs, and Creutzfeldt-Jakob disease // *Lancet* - 1992 - 340, N 8810 - P 24 - 27
- 6 Bernoulli C, Siegfried J, Baumgartner G, et al. Danger of accidental person to person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery // *Lancet* - 1977 - 1, N 8009 - P 478 - 479
- 7 European Commission in Oral Exposure of Humans to the BSE Agent: Infective Dose and Species Barrier - Scientific Steering Committee Meeting, 13-14 April 2000
- 8 Moynagh J, Schimmel H. Tests for BSE evaluated // *Nature* - 1999, 8 July - P 105
- 9 Deslys J, Comoy E, Hawkins S et al. Screening slaughtered cattle for BSE // *Nature* - 2001, 25 January - 409 - P 476 - 478
- 10 Verevka S. Prions and protein inhibitors of proteinases: structural analogies and their consequences. III. Additive risk factor in transgenic technologies // *Укр біохім журн* - 2001 - 73, N 1 - C 153 - 1154
- 11 Verevka S. Прионы и серпины: структурные аналогии и их следствия. I. Протеиназотранспортная гипотеза // *Укр біохім журн* - 1999 - 71, N 5 - C 135 - 139
- 12 Schuck P // *Annu Rev Biophys Biomol Struct* - 1997 - 26, N - P 541 - 566
- 13 Lofas S // *Pure and Appl Chem* - 1995 - 67, N - P 829 - 834
- 14 Snopok B, Kostyukovich K, Bekrtov G et al. Biochemical passivation of metal surfaces for sensor

application reactive annealing of polycrystalline gold
films in hydrogen sulfide atmosphere // Semiconduc-

tor Physics, Quantum Electronics & Optoelectronics -
2000 - 3, N 1 - P 59 - 68

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)
вул. Сім'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна
(044) 456 – 20 – 90

ТОВ "Міжнародний науковий компет"
вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна
(044) 216 – 32 – 71