



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **56820** (13) **U**
(51) МПК (2011.01)
G01N 33/68 (2011.01)
C12S 3/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ФІЗІОЛОГІЧНОГО ПРІОНА МЕТОДОМ ДОТ-БЛОТУ

1

(21) u201009052
(22) 19.07.2010
(24) 25.01.2011
(46) 25.01.2011, Бюл.№ 2, 2011 р.
(72) ВЛІЗЛО ВАСИЛЬ ВАСИЛЬОВИЧ, МАЙОР
ХРИСТИНА ЯРОСЛАВІВНА, СТАДНИК ВІТАЛІЙ
ВІТАЛІЙОВИЧ
(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН УААН

2

(57) Спосіб визначення вмісту фізіологічного пріона методом дот-блоту, що включає відбір зразків, їх лізис, нанесення на мембрану і імунологічну детекцію, який **відрізняється** тим, що використовують нітроцелюлозну мембрану для нанесення зразків без електрофоретичного розділення білків лізату тканин у ПААГ та без наступного перенесення їх на полівінілдіфторидну мембрану (ПВДФ).

Корисна модель належить до біології, ветеринарії та медицини, зокрема до методів детекції фізіологічного пріона (ФП) - білка людини та тварин, у зразках тканин відібраних із різних органів.

Рядом компаній (Bio-Rad Laboratories, Millipore Corporation тощо) в останні роки було запатентовано різноманітне устаткування та модифікації методики для проведення визначення вмісту білка методом, що базується на техніці дот-блотингу [Oprandy J.J. A rapid dot immunoassay for the detection of serum antibodies to Eastern equine encephalomyelitis and St. Louis encephalitis viruses in sentinel chickens / JJ. Oprandy, J.G. Olson, T.W. Scott // Am. J. Trop. Med. Hyg. - 1988. - V. 38 (1). - P. 181-186].

Недоліком методу є те, що він мало використовується в лабораторній практиці.

Відома також методика Prionics®-Check WESTERN, що використовується в усіх референс-лабораторіях при дослідженні вмісту пріонів in vitro, базується на методі Вестерн блоттинг [Neil Burnette W. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A / W. Neil Burnette // Analytical Biochemistry. - 1981. - N 112 (2). - P. 195-203].

Згідно методики запропонованого компанією Prionics AG Prionics®-Check WESTERN складається із таких етапів:

1. Відбір зразків і їх гомогенізація (30хв.).
2. Розщеплення за допомогою протеїназ (етап, що виключається в разі дослідження фізіологічної протеїназочутливої конформації пріона) (60хв.).

3. Електрофорез в 12% поліакриламідному гелі (ПААГ) (40-60хв.).

4. Електроблотинг - перенесення білків із товщі ПААГ на мембрану під дією електричного поля (60хв.).

5. Імунологічна детекція - стадія, що включає блокування мембрани (30хв.), обробку т.з. «першими» (60 хв.) та «другими» антитілами (30хв.) та власне детекцію (20-30хв.), що базується на явищі посиленої хемілюмінесценції (загалом 150хв.).

Найбільш близьким по суті рішенням до заявленої корисної моделі є метод Prionics®-Check WESTERN [http://www.cultek.com/pdf/Prionics_Check-WB.pdf].

Недоліком методу є його загальна тривалість, що займає від 330 до 360хв. без урахування підготовчих і проміжних стадій. При чому, особливо трудомісткими є 3 і 4 етап дослідження, які також вимагають від спеціаліста особливих навичок і вмінь. Окрім цього, для здійснення електрофорезу та електроблотингу необхідний цілий ряд реактивів і супутніх матеріалів, які підвищують вартість дослідження, а саме: пластини 17-лункового 12% ПААГ гелю, маркери молекулярних мас, буфер для зразків, буфер для електрофорезу, антиоксидант, полівінілдіфторидна мембрана, метанол, буфер для переносу, понціан S тощо.

В основу корисної моделі покладено завдання розробити швидкий та ефективний метод визначення вмісту фізіологічного пріона, який давав би змогу здійснювати якісну та кількісну порівняльну оцінку вмісту досліджуваного білка (ФП) у зразках відібраних із різних органів і тканин, а також уникнути трудомістких і тривалих етапів дослідження.

(19) **UA** (11) **56820** (13) **U**

Технічний результат досягається шляхом використання нітроцелюлозної мембрани для нанесення зразків без електрофоретичного розділення білків лізату тканин у ПААГ та без наступного перенесення їх на ПВДФ мембрану.

При проведенні заявником патентно-інформаційного пошуку знайдено технічні рішення, в яких є ряд суттєвих ознак спільних із заявленим [http://www.oie.int/vcda/eng/Registre/User%27s%20manual_Prionics_WB.pdf, Oprandy J.J. A rapid dot immunoassay for the detection of serum antibodies to Eastern equine encephalomyelitis and St. Louis encephalitis viruses in sentinel chickens / J.J. Oprandy, J.G. Olson, T.W. Scott // Am. J. Trop. Med. Hyg. - 1988. -V. 38 (1). - P. 181-186], а саме: відбір зразків і гомогенізація, нанесення зразків на мембрану, імунологічна детекція.

Однак, даних суттєвих ознак не достатньо для одержання технічного результату заявленого рішення. Технічних рішень, які б за сукупністю ознак повністю співпадали з ознаками заявленого способу детекції вмісту фізіологічного пріона не знайдено.

В джерелах патентної і науково-технічної інформації не знайдено відомостей про методи детекції вмісту фізіологічного пріона, а також відомостей щодо використання методу дот-блотингу для детекції вмісту фізіологічного пріона.

Корисна модель може бути використана в діагностичних установах та референс-центрах обладнання необхідною лабораторією.

Для реалізації заявленої корисної моделі необхідно:

1. Розморожену чи щойно відібрану тканину злізувати у десятикратному об'ємі буферу для лізування, pH 7,4 (10% N-лаурилсаркозин, 10мкМ фенілметилсульфонілфторид, 10мкМ N-етилмалеїмід в 0,01М Na-фосфатному буфері, 0,001% коктейль інгібіторів протеїназ - Sigma, ФРН). Далі відцентрифугувати зразки при 5200g протягом 5хв. при 4°C. Виміряти концентрацію білка у лізатах методом Лоурі (набір для визначення Сімко, Україна). Для вирівнювання об'ємів та концентрацій загального білка розвести зразки буфером для розведення зразків, pH 7,4 (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2,5 mM KCl).

2. На нітроцелюлозну мембрану (Millipore) нанести лізат об'ємом 2мкл із однаковим загальним вмістом білка. Для виявлення фонового свічення на мембрану нанести буфер для лізування та буфер для розведення зразків.

3. Блокувати мембрану протягом 1год. в 5% розчині альбуміну. Після нанесення контрольних та дослідних зразків інкубувати мембрану з моноклональними анти-PrP антитілами 6H4 (Prionics, Швейцарія) - 1:2000 у ЗФРТ 90хв., та поліклональними козячими анти-мишачими антитілами, кон'ю-

гованими з лужною фосфатазою (Sigma, США) - 1:5000 у забуферний фізіологічний розчин з твіном (ЗФРТ) 30 хв. Здійснити детекцію імунних комплексів з використанням комерційного розчину субстрату для лужної фосфатази - CDP-Star (Tropix, Велика Британія). Провести візуалізацію за допомогою рентгенівської плівки ECL HyperFilm (Amersham, США) та набору для проявки плівок (Kodak). Оцифрування вмісту фізіологічного пріона здійснюється за допомогою програми GelPro Ver. 1.5 та виражається в умовних одиницях (1 ум.од.=1 піксель на кв. дюйм).

Приклади конкретного виконання.

Для тестування ефективності використання методу дот-блоту для визначення вмісту фізіологічного пріона нами було проведено дослідження вмісту цього білка у зразках відрізнених із різних органів лабораторних щурів за дії пріон-інгібуючого препарату пентосан полісульфат. (Фіг.)

Дослідження проводили у 4-ох групах зразків селезінки, тонкого кишківника та скелетних м'язів:

1. Контрольний;
2. Перший дослідний - препарат вводили у дозі 0,1мг/кг/день;
3. Другий дослідний - препарат вводили у дозі 0,5мг/кг/день;
4. Третій дослідний - препарат вводили у дозі 1мг/кг/день.

Проведені дослідження показали, що метод дот-блот аналізу дозволяє детектувати зміни у вмісті фізіологічного пріона за дії інгібуючого чинника (пентосан полісульфату). Так, було показано, що препарат застосований у дозах 0,1; 0,5 і 1мг/кг/день спричиняє різке зниження вмісту фізіологічного пріона у селезінці, тонкому кишківнику та скелетних м'язах щурів порівняно із контрольним вмістом.

Як показав аналіз діаграм, що були зроблені на основі результатів дот-блоту найвищий інгібувальний ефект спостерігався у тонкому кишківнику. У той же час, в інших органах, попри значне зниження вмісту фізіологічного пріона, дозозалежний ефект не був настільки чітко виражений. Загалом, метод дозволив встановити, що у скелетних м'язах введення пентосан полісульфату знижувало вміст фізіологічного пріона до 60-80% ($p < 0,001$), у тонкому кишківнику - до 80-85% ($p < 0,001$), а у селезінці - до 50-70% ($p < 0,001$) у порівнянні із відповідним контрольним вмістом.

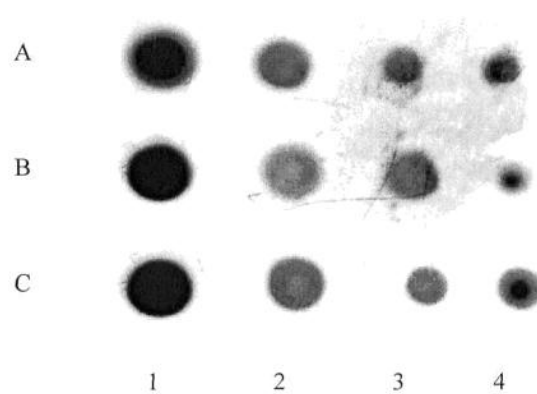
На Фіг. Дот-блот аналіз вмісту фізіологічного пріона у периферичних пріон-реплікуючих органах щурів за дії пентосан полісульфату, де

- 1) А-селезінка; В-тонкий кишечник; С-скелетні м'язи;
- 2) 1-Контроль; 2-ППС у дозі 0,1мг/кг/день; 3-ППС у дозі 0,5мг/кг/день; 4-ППС у дозі 1мг/кг/день.

5

56820

6



Фіг.