



УКРАЇНА

(19) UA (11) 4952 (13) U

(51) 7 G01N33/15

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДНК

1

2

(21) 20040604207

(22) 01 06 2004

(24) 15 02 2005

(46) 15 02 2005, Бюл. № 2, 2005 р.

(72) Скрипинець Юлія Володимирівна, Єгорова
Алла Володимирівна, Українець Ігор Васильович,
Антонович Валерій Павлович(73) ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. О. В. БО-
ГАТСЬКОГО НАН УКРАЇНИ

(57) Спосіб визначення ДНК, що передбачає при-

готування проби для аналізу, взаємодію її з розчи-
нами хлориду тербію і органічного реагенту при
заданому рН, опромінювання утвореної системи
УФ-світлом та вимірювання інтенсивності люміне-
сценції, який відрізняється тим, що як органічний
реагент використовують гідрохлорид амінобути-
ламід-1,8-диметил-2-оксо-4-гідроксипінолін-3-
карбонової кислоти при рН 8,5-9,5, а опроміню-
вання проводять УФ-світлом при $\lambda_{\text{збудж}} = 340 \text{ нм}$

Корисна модель відноситься до аналітичної
хімії, зокрема до люмінесцентного визначення біо-
логічно-активної речовини дезоксирибонуклеїнової
кислоти (ДНК). Лантанідні комплекси широко вжи-
вають в якості люмінесцентних міток для визна-
чення органічних сполук (зокрема лікарських пре-
паратів), нуклеїнових кислот та в імуно-
флуоресцентному аналізі. Люмінесценція у цих
комплексах є результатом ефективного внутріш-
ньомолекулярної передачі енергії від органічної
частини молекули до іону лантаніду. Ці комплекси
випромінюють вузькі емісійні смуги, мають велике
Стоксове зміщення та тривалість часу життя, що
пояснює зменшення впливу сигналу від біологічної
матриці. Основними вимогами до комплексних
сполук лантанідів для їх вживання в якості міток в
біоаналізі є високий квантовий вихід, висока кіне-
тична стабільність, добра розчинність у воді та
оптимальне фізіологічне значення рН.

Нуклеїнові кислоти (дезоксирибонуклеїнова
кислота -ДНК, рибонуклеїнова кислота -РНК) віді-
грають важливу роль у процесах життєдіяльності,
тому їх вивчення та визначення є актуальним.

При опромінюванні світлом нуклеїнові кислоти
проявляють власну люмінесценцію. У зв'язку з
низькою ефективністю збудження, інтенсивність
такої люмінесценції не дуже велика, що не дозво-
ляє використовувати її для високочутливого ви-
значення нуклеїнових кислот.

Тому стоїть задача підвищення чутливості ви-
значення нуклеїнових кислот завдяки застосуван-
ню люмінесцентних зондів (іонів металів, органіч-
них барвників, комплексів металів), люмінесценція

котрих значно змінюється при взаємодії з нуклеї-
новими кислотами (сенсителізується або гаситься).

Відомий спосіб визначення ДНК із застосуван-
ням гасіння люмінесценції комплексу тербію з 1,6-
бі(1'-феніл-3'-метил-5'-пірозолон-4'-гександіоном
(БФМПГД) в присутності цетилтриметиламонію
броміду (ЦТМАБ) при додаванні ДНК (Wu Xia,
Yang Jinghe, Huang Fang, Wang Min, Sun Limei, Xu
Guiying // Anal Lett, 1999, v 32, N12, p 2417-2425).
Спосіб передбачає додавання компонентів у на-
ступній послідовності: іонів Tb^{3+} (1×10^{-5} моль/л),
БФМПГД ($3,6 \times 10^{-5}$ моль/л), ЦТМАБ (1×10^{-3} моль/л),
ДНК (0,04-10 мкг/мл) і Трис-буфер (рН=5,5), далі
цю суміш залишають на двадцять хвилин і реєст-
рують інтенсивність люмінесценції ($I_{\text{люм}}$) при
 $\lambda_{\text{еміс}} = 545 \text{ нм}$, межа виявлення 0,009 мкг/мл.

До недоліків даного способу відносяться вико-
ристання додаткового сенсителізатора - мицеляр-
ного середовища (ЦТМАБ), що призводить до
ускладнення системи, не фізіологічне значення
рН=5,5, а також недостатня стабільність комплексу,
у зв'язку з чим визначення $I_{\text{люм}}$ необхідно вести
при фіксованому часі - 20 хвилин (за 20 хвилин
люмінесценція комплексу зростає до максималь-
ної, а після 40 хвилин починає зменшуватись).

Відомий також спосіб, який полягає у сенсителі-
зації люмінесценції комплексу Європію з окситетра-
цикліном (ОТ) у присутності Трис-буферу
(рН=7,5-9,0) при додаванні ДНК (Rutao Liu, Jinghe
Yang, Xia Wu // J Luminescence, 2002, v 96, p
201-209). Спосіб передбачає додавання компонен-
тів у наступній послідовності: іонів Eu^{3+} (1×10^{-6}

(13) U

(11) 4952

(19) UA

Приклад

Визначення ДНК проводили на модельних розчинах шляхом введення відомої кількості ДНК. Для цього у 5 пробірок вміщували по 0,02 мл (0,1 мл, 0,5 мл, 1,0 мл) стандартного розчину ДНК (10 мкг/мл), у кожен пробірник додавали по 0,5 мл стандартного розчину хлориду тербію з концентрацією 1×10^{-5} моль/л, по 0,5 мл стандартного розчину ліганду - гідрохлориду амінобутиламіду-1,8-діметил-2-оксо-4-гідроксигінолін-3-карбонової кислоти з концентрацією 1×10^{-5} моль/л, по 1,0 мл Трис-буферу (рН 9,0) і доводили об'єм до 10 мл водою.

Паралельно готували розчин холостої проби, яка містить усі компоненти, крім ДНК. Проби перемішували, вимірювали інтенсивність люмінесценції при $\lambda_{\text{еміс}} = 545$ нм. Межа виявлення ДНК, яка визначена на модельних розчинах з використанням

стандартних розчинів ДНК, складає 0,003 мкг/мл.

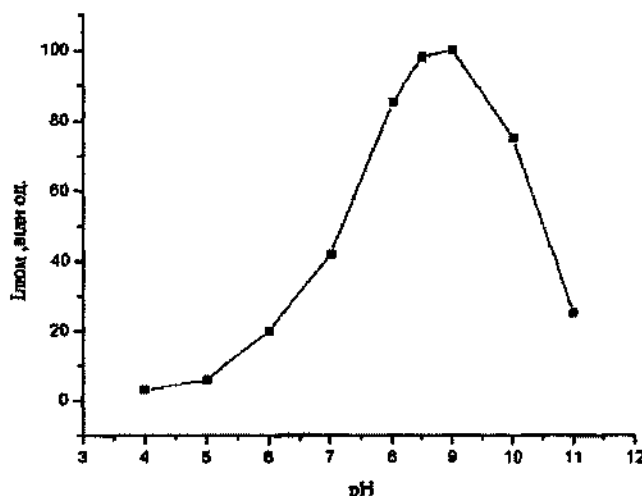
Кількісне визначення ДНК проводили по калібрувальному графіку, який будують таким чином: у пробірки вносять відому концентрацію ДНК (3 паралельних виміри) від 0,01 мкг/мл до 1,20 мкг/мл у пробі, додають усі реагенти, як зазначено вище. Вимірюють інтенсивність люмінесценції при $\lambda_{\text{еміс}} = 545$ нм, у кожній точці віднімають $I_{\text{гом}}$ холостої проби (ΔI). За отриманими результатами будують калібрувальний графік залежності $I_{\text{гом}}$ від концентрації ДНК в модельних пробах.

Точність і достовірність визначення ДНК у розчинах перевірені методом "введено - знайдено". При $n=5$; $P=0,95$ величина відносного стандартного відхилення 0,026-0,065. Таким чином, спосіб дозволяє підвищити чутливість визначення ДНК в 30 разів у порівнянні з прототипом.

Таблиця

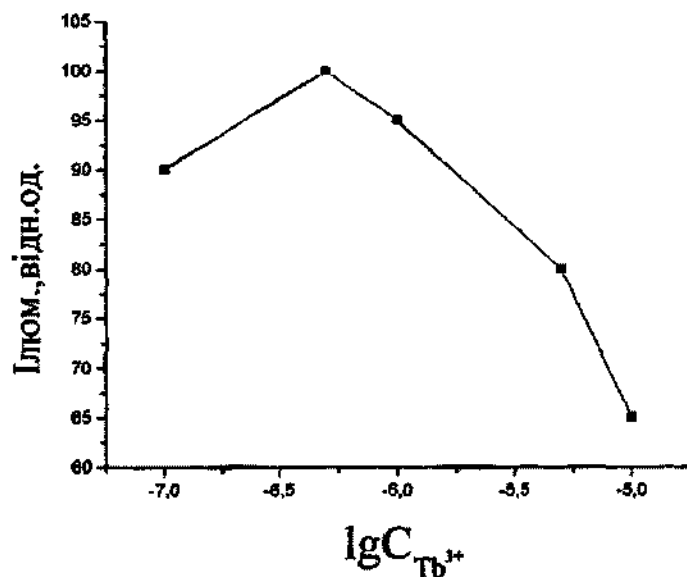
Результати визначення ДНК методом "введено - знайдено" ($n=5$; $P=0,95$)

Введено, мкг/мл	Знайдено, мкг/мл	Sr
0,02	0,022	0,065
0,1	0,097	0,058
0,50	0,475	0,041
1,00	0,988	0,026



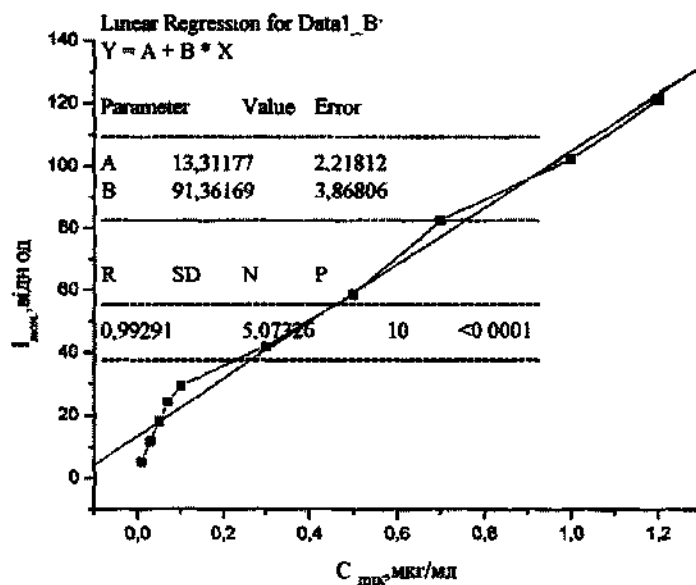
Фіг. 1

Залежність інтенсивності люмінесценції (відн.од.) системи Tb-R-ДНК від рН розчину ($C_{\text{Tb}^{3+}} = 5 \times 10^{-7}$ моль/л; $C_{\text{Л}} = 5 \times 10^{-7}$ моль/л, $C_{\text{ДНК}} = 0,5$ мкг/мл).



Фиг. 2

Залежність інтенсивності люмінесценції (відн.од.) системи Tb-R-ДНК від концентрації тербію ($C_R = 5 \times 10^{-7}$ моль/л, $C_{ДНК} = 0,5$ мкг/мл, pH=9,0, $\lambda_{екс} = 345$ нм, $\lambda_{флюор} = 340$ нм).



Фиг. 3

Калібрувальний графік для визначення ДНК

($C_{Tb^{3+}} = 5 \times 10^{-7}$ моль/л, $C_R = 5 \times 10^{-7}$ моль/л, pH=9,0, $\lambda_{екс} = 345$ нм).