



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **70080** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
C25B 3/00
C25B 7/00
G01N 33/50 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2011 13566	(72) Винахідник(и): Влізло Василь Васильович (UA), Козак Марія Романівна (UA), Іваницька Людмила Андріївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 18.11.2011	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.05.2012	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НААН, вул. В. Стуса, 38, м. Львів-34, 79034 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.05.2012, Бюл.№ 10	

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ПОЛІПЛЕКСІВ ОЛІГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДІВ З КАТІОННИМИ ОЛІГОЕЛЕКТРОЛІТАМИ

(57) Реферат:

Спосіб виявлення поліплексів олігодезоксинуклеотидів з катіонними олігоелектролітами включає вільну дифузію у гелі агарози досліджуваних речовин. Одноланцюгові молекули ДНК використовують у наномольних кількостях.

UA 70080 U

Корисна модель належить до біології, біотехнології, хімії зокрема до методів детекції утворення комплексів між короткими одноланцюговими молекулами ДНК і катіонними олігоелектролітами, які отримані шляхом хімічного синтезу.

Для встановлення факту комплексоутворення між зарядженими макромолекулами і ДНК застосовують метод вимірювання величини ζ -потенціалу на поверхні молекули (X. Zhang, S. Ercelen, G. Duportail, et al. *Hidrophobically modified low molecular weight chitosans are efficient and nontoxic gene delivery vectors* // J. Gene Med.-2008. - Vol. 10. - P. 527-539). Імобілізація ДНК на полімері супроводжується зміною величини і знаку ζ -потенціалу.

Недоліком цього способу є дороге устаткування для вимірювання величини ζ -потенціалу.

Для дослідження утворення кон'югатів і визначення стехіометрії комплексу олігоелектроліт - антисенс-олігодезоксинуклеотиди традиційно використовують метод турбідиметрії (Ляликов Ю.С., *Физико-химические методы анализа*, 5 изд., М., 1974; Пиккеринг У.Ф., *Современная аналитическая химия*, пер. с англ., М., 1977). Принцип методу ґрунтується на вимірюванні інтенсивності світла певної довжини хвилі, яке проходить через кювету з колоїдним розчином.

Недоліком найближчого аналога є те, що він вимагає затрат великої кількості досліджуваних сполук і спеціального устаткування (турбідиметра) для виявлення результату.

Заявлений нами спосіб усуває недоліки найближчого аналога та забезпечує візуалізацію утворення комплексу між катіонними олігоелектролітами і олігодезоксинуклеотидами без застосування будь-якого обладнання.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити швидкий, недорогий та ефективний метод виявлення утворення поліплексів олігоелектролітів з олігодезоксинуклеотидами, використовуючи наномолярні кількості молекул ДНК.

Технічний результат досягається без використання жодного обладнання для візуалізації.

Корисна модель може бути використана у будь-якій біологічній чи хімічній лабораторії.

Для реалізації заявленої корисної моделі необхідно:

1. Приготувати 0,8 % агарозу в забуференому фізіологічному розчині, pH 7,3-7,4.

2. Користуючись трафаретом, у гелі вирізати лунки діаметром 2 мм, об'ємом 10 мкл. Лунки розташовувати: одну в центрі і радіально на відстані 1 см.

3. У центральні лунки внести розчин олігоелектролітів, а в радіальні - олігодезоксинуклеотиди. Інкубувати у вологій камері за температури 2-8 °С до появи кілець преципітації (максимально - 48 год.). Взаємодія олігоелектролітів і олігодезоксинуклеотидів відображається у вигляді характерних кілець преципітації, які видно неозброєним оком.

Для тестування ефективності використання методу дослідження утворення поліплексів олігодезоксинуклеотидів з катіонними олігоелектролітами, було проведено дослідження появи комплексів між катіоноактивними полімерними сполуками, одержаними хімічним синтезом і антисенс-олігодезоксинуклеотидами до мРНК пріону, а також полімером природного походження (хітозаном) і антисенс-олігодезоксинуклеотидами до мРНК пріону.

У центральні лунки, вирізані в гелі 0,8 % агарози, вносять синтезовані сполуки у концентрації 1 %, а розчини антисенс-олігодезоксинуклеотидів (у концентрації 1 нмоль/мкл) додавали у радіальні лунки. Після потрапляння у лунки полімер та ДНК вільно дифундують у гелі, при їх електростатичній взаємодії заряди молекул нівелюються і утворюються надмолекулярні структури, які преципітують. Це проявляється у вигляді характерних кілець преципітації, які видно неозброєним оком.

На фіг. 1 представлена візуалізація взаємодії антисенс-олігодезоксинуклеотидів з наноструктурами полімерної природи в гелі 0,8 % агарози: 1 - зразок 1,10 мг/мл; 2 - зразок 2,10 мг/мл; 3 - зразок 3,10 мг/мл; 4 - полі-N-вінілпіролідон, 10 мг/мл. Видно утворення кілець преципітації після взаємодії синтезованих досліджуваних речовин з розчином антисенс-олігодезоксинуклеотидів протягом 48 год. Кільця преципітації вказано стрілками.

На фіг. 2 представлено утворення поліплексів антисенс-олігодезоксинуклеотидів (асОДН) з низькомолекулярним хітозаном (10 мг/мл) у гелі 0,8 % агарози: 1 - асОДН, 10 нмоль/мкл; 2 - асОДН, 1 нмоль/мкл.

Отримані дані свідчать про зв'язування нуклеїнових кислот синтезованими полімерами. Як контроль використано полімерну сполуку, яка завідомо не взаємодіє із ДНК (полі-N-вінілпіролідон з кінцевими карбоксильними групами). Контрольний зразок внесено у лунку № 4, навколо якої дуги преципітації не спостерігається.

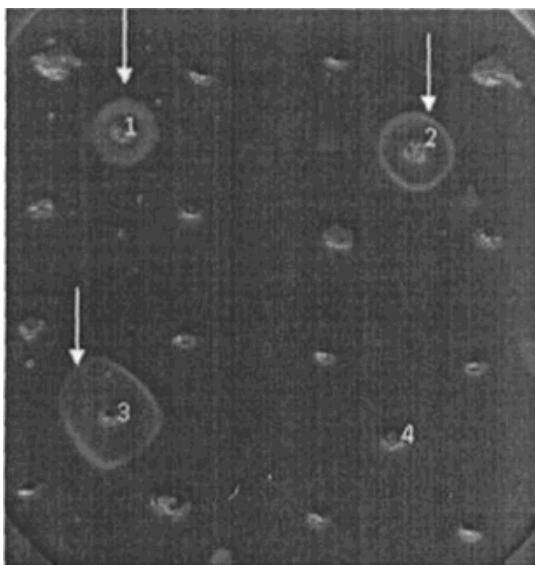
Для підтвердження універсальності способу досліджено взаємодію хітозану з антисенс-олігодезоксинуклеотидами. Хітозан - це природний нетоксичний, біосумісний, біодеградабельний і низькоімунотенний полімер, який знайшов широке застосування як допоміжний компонент для доставки генного матеріалу. Було використано різні концентрації коротких одноланцюгових молекул ДНК. В обох випадках чітко видно кільця преципітації (фіг. 2).

При вищій концентрації антисенс-олігодезоксинуклеотидів зона преципітації є ближчою до центральної лунки.

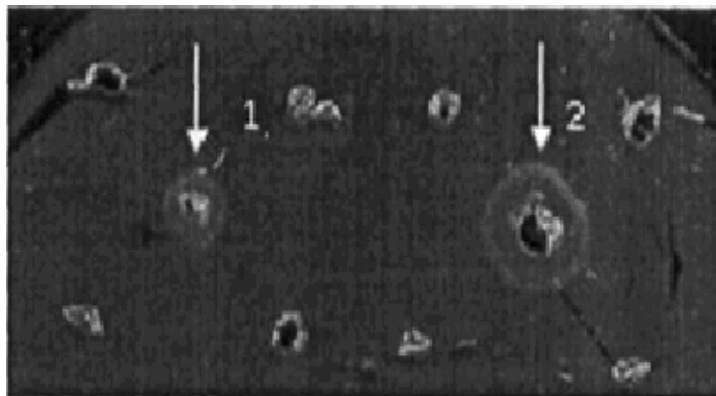
- Отже, запропонований спосіб є універсальним. Перевагою його полягає в тому, що одночасно можна провести скринінг багатьох сполук на здатність зв'язувати олігодезоксинуклеотиди. Цей спосіб не потребує використання дорогих приладів і матеріалів. Для отримання результату достатньо нанокількостей олігодезоксинуклеотидів.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 10 Спосіб виявлення поліплексів олігодезоксинуклеотидів з катіонними олігоелектролітами, що включає вільну дифузію у гелі агарози досліджуваних речовин, який **відрізняється** тим, що одноланцюгові молекули ДНК використовують у наномольних кількостях і для візуалізації результату не потрібно жодного обладнання.



Фіг.1



Фіг.2

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601