



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 95620

(13) U

(51) МПК

G01N 33/487 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2014 08578	(72) Винахідник(и):	Машейко Іван Володимирович (UA), Кулініч Анна Олександрівна (UA), Шевцова Алла Іванівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	28.07.2014	(73) Власник(и):	ДЕРЖАВНИЙ ЗАКЛАД "ДНІПРОПЕТРОВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ", вул. Дзержинського, 9, м. Дніпропетровськ, 49044 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	25.12.2014		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.12.2014, Бюл.№ 24		

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ СПЕЦИФІЧНИХ БІЛКІВ У БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ

(57) Реферат:

Спосіб визначення концентрації специфічних білків у біологічних рідинах включає проведення адсорбції аналізованого зразка на нітроцелюлозній мембрані, блокування вільних сайтів зв'язування, інкубацію з первинними антитілами, з подальшим промиванням та інкубацією із вторинними антитілами, міченими пероксидазою хрому, внесення субстрату і фарбування мембрани. На стадії адсорбції зразки у відповідному розведенні наносять на поверхню нітроцелюлозної мембрани по 3 μ l, для блокування використовують твін-фосфатний буфер, що містить 20 мг/мл знежиреного сухого молока. На стадії інкубації використовують моноспецифічні поліклональні антитіла до білка, що визначається, на етапі підготовки мембрани до фарбування інкубують з вторинними, кон'югованими з пероксидазою хрому, антитілами до первинних антитіл, отримане на мембрані зображення конвертується у цифровий формат з подальшим колориметричним аналізом за інтенсивністю забарвлення крапок нанесених зразків і розрахунком концентрації білка, що визначається, за калібрувальним графіком.

UA 95620 U

Корисна модель належить до біології, медицини і ветеринарії, а саме до способів визначення вмісту окремих білків у біологічних рідинах, що може бути використано у роботі науково-дослідних та клінічних лабораторій при діагностиці різноманітних патологічних станів.

У останнє десятиріччя широкого застосування у вирішенні задач клінічної лабораторної діагностики набули методи цифрового відео-денситометричного аналізу. Розвиток даного напрямку стимулюється стрімким вдосконаленням комп'ютерних технологій, здешевленням комплектуючих та зниженням затрат на розробку програмно-аналітичних комплексів. Ще одним поштовхом до широкого застосування відеоцифрових систем є впровадження у лабораторну практику мікроаналітичних методів. Переваги мініатюризації для клінічних біохімічних і імунологічних досліджень полягають у зменшенні необхідних для аналізу об'ємів досліджуваного матеріалу й реагентів, підвищенні продуктивності при проведенні вимірювань, можливості створення систем серійного й мультиплексного аналізу на основі використання матричного формату. Саме сполучення підходів мініатюризації із системами відеоцифрової реєстрації створює базу для розробки принципово нових варіантів лабораторно-діагностичних методів. Застосування відеоцифрових систем дозволяє вирішити задачу по одержанню напівкількісних і кількісних результатів та їх документуванню, забезпечує об'єктивну оцінку та оперативний аналіз даних.

Найбільш близьким до запропонованої корисної моделі є спосіб визначення концентрації альбуміну у сечі методом прямого твердофазного імуноферментного аналізу у мікроматричному форматі на базі аналітичної платформи з відеоцифровою реєстрацією [Старовойтова Т.А. Аналитическая платформа для проведения биохимических и иммунологических исследований в микроматричном формате с видеоцифровой регистрацией / Т.А. Старовойтова, В.В. Зайко, Н.А. Стериополо [и др.] // Биомедицинский журнал Medline.ru. - 2010. - Т. 11. № 1. - С. 44-62], який включає нанесення зразків сечі, до яких попередньо додавали відому кількість сухого альбуміну, на нітроцелюлозну мембрану «Schleicher&Schull» (Германія) за допомогою 30-пінового аплікатора, з подальшим блокуванням вільних зон мембрани нейтральним білком, наступну інкубацію з антитілами до альбуміну людини, міченими пероксидазою хрому, фарбування нітроцелюлозної мембрани, вимірювання інтенсивності забарвлення крапок нанесених зразків та розрахунок концентрації альбуміну у сечі за калібрувальним графіком. Для реєстрації результатів використовується апаратно-програмний комплекс «Експерт-Лаб» і спеціалізоване програмне забезпечення «Експерт-Лаб Відеодот» (Росія). Перевагами даного методу є використання 30-пінового аплікатора, що дозволяє одночасно наносити велику кількість зразків; інкубування з антитілами до альбуміну людини, міченими пероксидазою хрому, що дозволяє провести підготовку до фарбування нітроцелюлозної мембрани в один етап і значно скоротити час на дослідження; реєстрація результатів з використанням спеціалізованого апаратно-програмного комплексу, що дозволяє проводити серійні дослідження у однакових умовах, зменшуючи похибку при обчисленні.

Недоліками найближчого аналога, які можуть перешкоджати досягненню очікуваного технологічного результату є: 1) необхідність внесення на підготовчому етапі певної мінімальної кількості дослідних зразків у мікропланшет, що не дозволяє аналізувати малі за об'ємом проби; 2) використання як агента для блокування нейтрального білка, що не виключає можливості неспецифічної взаємодії з ним компонентів інкубаційного буферу; 3) використання мічених пероксидазою хрому антитіл до альбуміну одразу після етапу блокування, що збільшує тривалість контакту мембрани з компонентами інкубаційного буферу, сприяючи неспецифічній сорбції пероксидази хрому та отриманню більш темного фону під час фарбування; 4) необхідність застосування для реєстрації результатів спеціалізованого апаратно-програмного комплексу, що унеможливорює широке застосування запропонованої методики.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу визначення концентрації специфічних білків у біологічних рідинах шляхом формування нового набору та співвідношення головних компонентів - специфічних антитіл до відповідного білка, вторинних антитіл кон'югованих з пероксидазою хрому проти первинних антитіл, дослідних зразків і компонентів буферу для блокування та промивки, що дозволить пристосувати його для визначення концентрації окремих білків, спростити аналіз, підвищити відтворюваність отриманих даних. Згідно із запропонованим способом, з іммобілізованим на поверхні нітроцелюлозної мембрани білком взаємодіють первинні антитіла, з якими, в свою чергу, взаємодіють вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому, ступінь подібної взаємодії оцінюється за кількістю окисненого пероксидазою субстрату шляхом конвертації отриманого на мембрані зображення у цифровий формат з подальшим аналізом за інтенсивністю забарвлення крапок нанесених зразків та розрахунком концентрації за калібрувальним графіком.

Поставлена задача вирішується тим, що у запропонованому способі визначення концентрації білків, що включає проведення адсорбції аналізованого зразка на нітроцелюлозній мембрані, блокування вільних сайтів зв'язування, інкубацію з первинними антитілами, з подальшим промиванням та інкубацією із вторинними антитілами, міченими пероксидазою хрому, внесення субстрату, згідно з корисною моделлю матеріал, що аналізується, наносять на поверхню нітроцелюлозної мембрани по 3 μ l (плазму у розведенні 1:1000, зразки сечі не розводять), для блокування використовують твін-фосфатний буфер, що містить 20 мг/мл сухого молока, на стадії інкубації використовують моноспецифічні поліклональні антитіла до білка, що визначається, на етапі підготовки мембрани до фарбування інкубують з вторинними антитілами, що зв'язані з пероксидазою хрому, до первинних антитіл.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом, який може бути досягнутий, виявляється наступний: використання нітроцелюлозної мембрани як носія дозволяє безпосередньо наносити досліджувану біологічну рідину у підбраному робочому розведенні, що значно спрощує підготовку зразків до аналізу та є найбільш оптимальним для виявлення вірогідної різниці в концентрації білка; блокування вільних сайтів зв'язування твін-фосфатним буфером, що містить 20 мг/мл знежиреного сухого молока та 0,1 % твіну-80 впродовж 1 години забезпечує повне перекриття всіх вільних сайтів зв'язування на поверхні нітроцелюлозної мембрани та запобігає появі неспецифічних взаємодій; проведення інкубації з первинними антитілами впродовж 12 годин, дозволяє отримати рівномірний шар антитіл у місцях розміщення зразків; подальше промивання мембрани забуференим фізіологічним розчином та інкубація із вторинними антитілами, міченими пероксидазою хрому, впродовж 2 годин дозволяє запобігти надлишковій сорбції мічених пероксидазою хрому вторинних антитіл та отримати більш світлий фон під час фарбування; наступне фарбування розчином, що містить трис-HCl - 0,1 М (pH=7,4), діамінобензидин - 0,02 % та перекис водню (H_2O_2) - 0,011 % дозволяє візуалізувати місця нанесення зразків і оцінити концентрацію відповідного білка за інтенсивністю забарвлення крапок.

Сукупність ознак запропонованого способу визначення концентрації специфічних білків у біологічних рідинах є суттєвою, оскільки відповідає очікуваному технічному результату.

Відомості, що підтверджують можливість використання заявленого способу з досягненням вищевказаного технічного результату, наведені нижче.

Приклад.

Для апробації способу проводили визначення концентрації α_1 -кислого глікопротеїну у 100 зразках плазми крові. На поверхню нітроцелюлозної мембрани («Millipore», США) наносили по 3 μ l зразків плазми крові у розведенні 1:1000 і чекали 10-15 хвилин до повного висихання мембрани. Проводили блокування вільних сайтів зв'язування поверхні мембрани у фосфатному буфері, що містить 20 мг/мл сухого молока та 0,1 % твіну-80 при температурі 18 °C впродовж 1 години. Подальші етапи включали наступне: 1) інкубація з первинними моноспецифічними поліклональними антитілами до α_1 -кислого глікопротеїну при температурі 4 °C впродовж 12 годин; 2) триразове промивання мембрани забуференим фізіологічним розчином та інкубація при температурі 18 °C впродовж 2 годин із вторинними антитілами до первинних антитіл, міченими пероксидазою хрому; 3) триразове промивання мембрани забуференим фізіологічним розчином та фарбування розчином, що містить трис-HCl - 0,1 М (pH=7,4), діамінобензидин - 0,02 % та перекис водню (H_2O_2) - 0,011 %; 4) зупинка реакції промиванням у дистильованій воді. Конвертація отриманого на мембрані зображення (Фігура 1) у цифровий формат з подальшим колориметричним аналізом програмою Gel-Pro Analyzer 3.1 (Media Cybernetics, Inc) за інтенсивністю забарвлення крапок нанесених зразків та розрахунок концентрації α_1 -кислого глікопротеїну за калібрувальним графіком. Для контрольного визначення концентрації α_1 -кислого глікопротеїну у дослідних зразках плазми крові як референсний застосували метод ракетного імуоелектрофорезу [Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу / Под. ред. Н. Аксельсена. - М.: Мир, 1987. - 216 с.].

Отримані результати визначення концентрації α_1 -кислого глікопротеїну у плазмі крові здорових донорів методами ракетного імуоелектрофорезу та імуодотом узагальнювали і співставляли між собою (Фігура 2). Наявне добре співпадіння результатів, що доводить рівняння лінії тренду ($ax+b$): коефіцієнт а близький до одиниці, а величина відхилення b менша за похибку методу. Коефіцієнт кореляції Пірсона r_{xy} дорівнює 0,962 (при $p=0,01$). З цього можна зробити висновок, що відмінності між результатами референсного і розробленого нами методу статистично незначущі.

Технічний результат, що досягається при використанні корисної моделі, визначається використанням нітроцелюлозної мембрани як сорбенту та комбінації специфічних первинних

антитіл до білка, що визначається, з вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому, до первинних антитіл, що дозволяє значно спростити, підвищити продуктивність, специфічність та відтворюваність твердофазного імуноферментного аналізу специфічних білків в порівнянні із запропонованими раніше способами.

- 5 Розроблений спосіб може бути використаний у лабораторній діагностиці різноманітних патологічних станів.

Перелік фігур креслення

Додаток 1

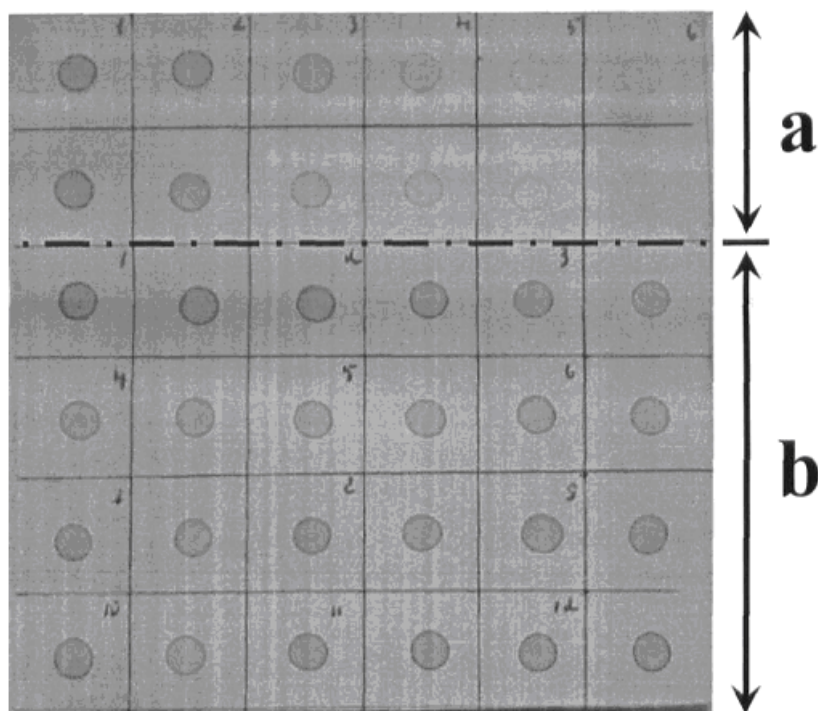
- 10 Фігура 1. Підготовлена до розрахунку концентрації α_1 -кислого глікопротеїну нітроцелюлозна мембрана з калібрувальною плазмою крові та дослідними зразками у відповідних розведеннях, а - серія розведень (1-6) калібрувальної плазми крові (1:100 - 1:3200); б - дослідні зразки (1-12) плазми крові у розведенні 1:100.

Додаток 2

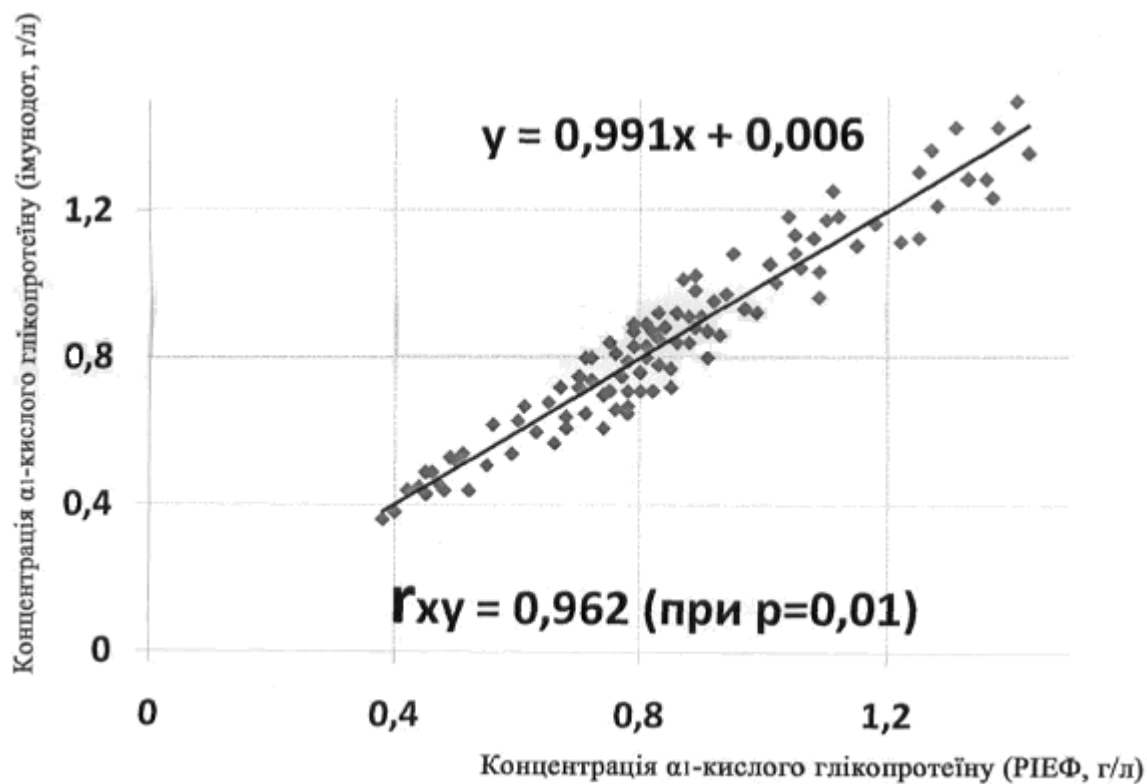
- 15 Фігура 2. Співставлення результатів вимірювання концентрації α_1 -кислого глікопротеїну у плазмі крові здорових донорів методами ракетного імуноелектрофорезу (РІЕФ) та імунодот (г/л), r_{xy} - коефіцієнт кореляції Пірсона (при $p=0,01$).

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 20 Спосіб визначення концентрації специфічних білків у біологічних рідинах, що включає проведення адсорбції аналізованого зразка на нітроцелюлозній мембрані, блокування вільних сайтів зв'язування, інкубацію з первинними антитілами, з подальшим промиванням та інкубацією із вторинними антитілами, міченими пероксидазою хрому, внесення субстрату і фарбування мембрани, який **відрізняється** тим, що на стадії адсорбції зразки у відповідному розведенні наносять на поверхню нітроцелюлозної мембрани по 3 μ л, для блокування використовують твін-фосфатний буфер, що містить 20 мг/мл знежиреного сухого молока, на стадії інкубації використовують моноспецифічні поліклональні антитіла до білка, що визначається, на етапі підготовки мембрани до фарбування інкубують з вторинними, кон'югованими з пероксидазою хрому, антитілами до первинних антитіл, отримане на мембрані зображення конвертується у цифровий формат з подальшим колориметричним аналізом за інтенсивністю забарвлення крапок нанесених зразків і розрахунком концентрації білка, що визначається, за калібрувальним графіком.
- 30



Фиг. 1



Фіг. 2

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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