



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010115978/15, 22.04.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.04.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.04.2010

(45) Опубликовано: 27.07.2011 Бюл. № 21

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2251698 C1, 10.05.2005. КОЗЛОВ Л.В., КРЫЛОВА Ю.И., ЧИХ В.П., МОЛЧАНОВА Н.Н. Модифицированные методы определения функциональной активности факторов комплемента C2, C3, C4 и C5, Биоорганическая химия. 1982. т.8. № 5. С.652-659. Arlaud G.J. et. al., Structural biology of C1: dissection of a complex molecular machinery, Immunol Rev., 2001 Apr., 180, pp 136-45.

Адрес для переписки:

125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского
Роспотребнадзора, патентный отд.

(72) Автор(ы):

Козлов Леонид Васильевич (RU),
Бичучер Анна Мироновна (RU),
Гора Наталья Вадимовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное Государственное учреждение
науки "Московский научно-
исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии им. Г.Н. Габричевского"
Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия
человека (RU)

(54) СПОСОБ И НАБОР ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СУБКОМПОНЕНТОВ C1r₂s₂ ПЕРВОГО КОМПОНЕНТА
КОМПЛЕМЕНТА ЧЕЛОВЕКА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицинской иммунологии и представляет собой способ определения функциональной активности субкомпонентов C1r₂s₂ первого компонента комплемента человека, предусматривающий сорбцию в лунках микропанели активатора классического пути комплемента, внесение раствора, содержащего сыворотку морской свинки и этилендиаминтетраацетат натрия, затем после инкубации и осушения планшета внесение анализируемой пробы, содержащей комплекс C1r₂s₂ комплемента человека с неизвестной активностью, и псевдоглобулиновой фракции сыворотки крови

человека, получаемой диализом против дистиллированной воды, (R1), а также буферного раствора, содержащего ионы кальция и магния, проведение инкубации и после отмывки и осушения планшета внесение в лунки конъюгата фермента с антителами против компонента C3 человека и субстрата этого фермента, проведение расчета активности субкомпонентов C1r₂s₂ по количеству образовавшегося продукта ферментативной реакции, отличающийся тем, что в качестве активатора классического пути комплемента используют деринат, а также набор для определения функциональной активности субкомпонентов C1r₂s₂ первого

компонента комплемента человека.
Изобретение обеспечивает разработку способа
определения функциональной активности

комплекса Clr_2s_2 комплемента человека,
обладающего хорошей воспроизводимостью
результатов. 2 н.п.ф-лы, 1 ил.

R U 2 4 2 5 3 8 3 C 1

R U 2 4 2 5 3 8 3 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)*G01N 33/573* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2010115978/15, 22.04.2010**(24) Effective date for property rights:
22.04.2010

Priority:

(22) Date of filing: **22.04.2010**(45) Date of publication: **27.07.2011 Bull. 21**

Mail address:

**125212, Moskva, ul. Admirala Makarova, 10,
FGUN MNIIEhM im. G.N. Gabrichevskogo
Rospotrebnadzora, patentnyj otd.**

(72) Inventor(s):

**Kozlov Leonid Vasil'evich (RU),
Bichucher Anna Mironovna (RU),
Gora Natal'ja Vadimovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe Gosudarstvennoe uchrezhdenie nauki
"Moskovskij nauchno-issledovatel'skij institut
ehpidemiologii i mikrobiologii im. G.N.
Gabrichevskogo" Federal'noj sluzhby po nadzoru v
sfere zashchity prav potrebitelej i
blagopoluchija cheloveka (RU)**

**(54) METHOD AND KIT FOR IMMUNE-ENZYME FUNCTIONAL ACTIVITY ASSAY ON
Cl_{r2s2} SUBCOMPONENTS OF FIRST COMPONENT OF HUMAN COMPLEMENT**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention represents a method of evaluating functional activity of Cl_{r2s2} subcomponents of the first component of a human complement involving sorption in microplate wells of a classical complement cascade, introduction of a solution containing porpoise serum and sodium ethylene diamine tetraacetate; then incubation and drying of the plate is followed by introducing the analysed sample containing the Cl_{r2s2} complex of the human complement of unknown activity, and a pseudoglobulin fraction of human blood serum prepared by distilled water dialysis (R1), and also a buffer solution containing calcium and magnesium

ions, incubation, and after washing and drying of the plate, introduction of a enzyme conjugate with human C3 component and substratum antibodies into the wells, calculation of Cl_{r2s2} subcomponent activity by an amount of the produced enzyme reaction product, differing by the fact that the classical complement cascade is derivate, and also a kit for functional activity assay on Cl_{r2s2} subcomponents of the first component of the human complement.

EFFECT: invention provides developing the method of functional activity assay on Cl_{r2s2} complex of the human complement showing good reproducibility.

2 ex, 1 dwg

R U 2 4 2 5 3 8 3 C 1

R U 2 4 2 5 3 8 3 C 1

Изобретение относится к медицинской иммунологии, а именно к способам определения функциональной активности компонентов комплемента в сыворотке крови человека при диагностике ряда заболеваний и в биологических препаратах. Субкомпоненты C1r и C1s, синтезируемые в организме в равных количествах и представляющие собой зимогены протеиназ, образуют прочный Ca-зависимый тетрамерный комплекс C1r₂s₂, связанный с субкомпонентом C1q также Ca-зависимым образом и формирующий с ним компонент C1. При связывании C1 с иммунным комплексом происходит активация протеиназ C1r и C1s. Активация этих ферментов - существенный этап инициации каскада активации комплемента по классическому пути, поэтому их функциональный дефицит может быть причиной различного рода патологических состояний организма.

Наиболее перспективным из современных методов определения белков сыворотки крови является метод иммуноферментного анализа благодаря своей чувствительности, избирательности и возможности автоматизации аналитического процесса. Однако имеющиеся на сегодня методы иммуноферментного анализа белков комплемента позволяют определять лишь их содержание как антигена. Тем не менее наиболее информативным является оценка функциональной активности этих белков, которая и характеризует развитие патологического процесса. Известен способ определения функциональной активности компонентов C1r₂s₂ [1], который предусматривает сорбцию в лунках микропланшета иммуноглобулина G, затем внесение в лунки микропланшета сыворотки морской свинки в присутствии этилендиаминтетраацетата натрия для сорбции на иммуноглобулине только субкомпонента C1q. После освобождения лунок микропланшета от жидкости и их промывки в лунки вносят буферный раствор с ионами кальция, анализируемые пробы, содержащие комплекс C1r₂s₂ с неизвестной активностью, и псевдоглобулиновую фракцию сыворотки человека (супернатант после осаждения эуглобулинов сыворотки диализом против дистиллированной воды при pH 5,5) в качестве источника компонентов C4, C2 и C3. При проведении инкубации для активации комплемента происходит ковалентное связывание C3b на сорбированном иммуноглобулине в количествах, зависящих от концентрации функционально активного определяемого комплекса C1r₂s₂. Количество ковалентно связавшегося в результате активации компонента C3 определяют по продукту ферментативной реакции с помощью антител к C3-фракции иммуноглобулинов G, конъюгированных с ферментом.

Недостатком этого способа является трудность получения иммунохимически чистых препаратов иммуноглобулина G человека и плохое сохранение активирующей способности при хранении.

Задачей заявленного изобретения является разработка способа и набора на основе иммуноферментного метода, позволяющего определять функциональную активность комплекса C1r₂s₂ комплемента человека с использованием доступного и хорошо сохраняемого в обычных условиях коммерческого препарата для использования в качестве активатора классического пути комплемента.

Поставленная задача достигается путем разработки способа определения и набора. Способ определения предусматривает сорбцию в лунках микропанели аптечного препарата дерината, представляющего собой дезоксирибонуклеат натрия, хорошо сохраняемый в обычных условиях, затем внесение в лунки микропланшета сыворотки морской свинки в присутствии этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) для сорбции на деринате только субкомпонента C1q. После освобождения лунок микропланшета от жидкости и их промывки в лунки вносят буферный раствор с

ионами кальция, анализируемые пробы, содержащие комплекс $C1r_2s_2$ с неизвестной активностью, и псевдоглобулиновую фракцию сыворотки человека (супернатант после осаждения эуглобулинов сыворотки диализом против дистиллированной воды при pH 5,5) в качестве источника компонентов C4, C2 и C3. При проведении инкубации для активации комплемента происходит ковалентное связывание C3b в лунках микропанели в количествах, зависящих от концентрации функционально активного определяемого комплекса $C1r_2s_2$. Количество связавшегося в результате активации компонента C3 определяют по продукту ферментативной реакции с помощью антител к C3-фракции иммуноглобулинов G, конъюгированных с ферментом. Тем самым достигается определение функциональной активности $C1r_2s_2$ иммуноферментным методом, пригодным для стандартизации.

Техническим результатом заявленного изобретения является разработка способа определения функциональной активности комплекса $C1r_2s_2$ комплемента человека, обладающего хорошей воспроизводимостью результатов.

Пример 1. Определение функциональной активности субкомпонентов $C1r_2s_2$ первого компонента комплемента человека. Аптечный препарат дерината в 0,15 М NaCl в концентрациях 10-100 мкг/мл и вносят по 100 мкл раствора в каждую лунку плоскодонной полистироловой 96-луночной микропанели. Закрывают крышкой и оставляют на ночь при 4°C. Два раза отмывают планшет вероналовым буферным раствором, pH 7,4 (VBSE), содержащим 0,15 М NaCl, 50 мМ динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), заливая по 150 мкл в каждую лунку, затем планшет осушают путем вытряхивания остатка жидкости. В лунки планшета вносят по 100 мкл раствора VBSE и 1,25 мкл сыворотки морской свинки. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C и отмывки вероналовым буферным раствором, pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl, 0,15 мМ Ca^{2+} и 0,5 мМ Mg^{2+} (VBS^{2*}), в лунки микропанели вносят по 100 мкл раствора VBS^{2+} , содержащего 15 мкл псевдоглобулиновой фракции сыворотки человека (супернатант после осаждения эуглобулинов сыворотки диализом против дистиллированной воды при pH 5,5 - реагент R1) и анализируемую пробу, содержащую комплекс $C1r_2s_2$ с неизвестной активностью. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, двукратной отмывки фосфатным буфером, pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl и 0,05% Твин-20, (ЗФР-Т) и осушения микропанели в каждую лунку вносят по 100 мкл конъюгата пероксидазы с антителами против компонента C3 человека в том же буфере в подобранном разведении. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, отмывки ЗФР-Т и осушения планшета в каждую лунку вносят по 100 мкл субстратного буфера с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин в 15 мл цитратно-фосфатного буфера, pH 5,0, и 50 мкл 3% перекиси водорода). После 5-10 мин инкубации в темноте реакцию останавливают внесением в каждую лунку 50 мкл 14% серной кислоты. Результаты реакции учитывают с помощью спектрофотометра с вертикальным лучом измерением светопоглощения при 450 нм. Функциональную активность $C1r_2s_2$ рассчитывают по стандартной кривой (см. чертеж).

Пример 2. Набор для определения функциональной активности субкомпонентов $C1r_2s_2$ первого компонента комплемента человека содержит плоскодонную микропанель с сорбированным деринатом и C1q морской свинки, конъюгат пероксидазы с антителами к компоненту C3 комплемента человека, реагент R1, субстратный буфер и стандарт с известной активностью $C1r_2s_2$.

Из приведенных на чертеже результатов следует, что измеряемая оптическая

плотность линейно зависит от активности $C1r_2s_2$ с коэффициентом корреляции $R^2=0,995$, что позволяет достоверно определять функциональную активность $C1r_2s_2$ описанным способом с использованием описанного набора.

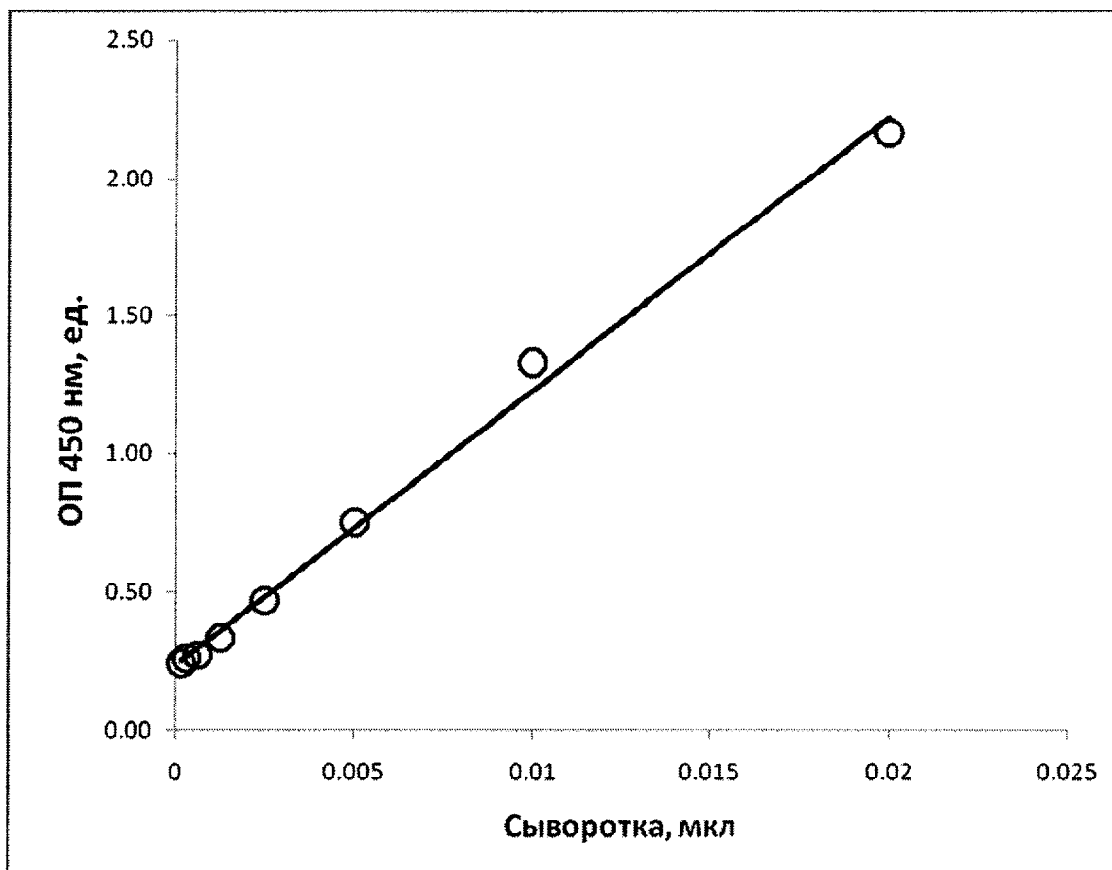
ЛИТЕРАТУРА

Козлов Л.В., Колесникова Е.А., Дьяков В.Л. Способ определения функциональной активности субкомпонентов $C1r_2s_2$ первого компонента комплемента человека. Патент РФ 2251698. Бюл. № 13. 10.05.2005.

Формула изобретения

1. Способ определения функциональной активности субкомпонентов $C1r_2s_2$ первого компонента комплемента человека, предусматривающий сорбцию в лунках микропанели активатора классического пути комплемента, внесение раствора, содержащего сыворотку морской свинки и этилендиамин-тетраацетат натрия, затем после инкубации и осушения планшета внесение анализируемой пробы, содержащей комплекс $C1r_2s_2$ комплемента человека с неизвестной активностью, и псевдоглобулиновой фракции сыворотки крови человека, получаемой диализом против дистиллированной воды, (R1), а также буферного раствора, содержащего ионы кальция и магния, проведение инкубации и после отмывки и осушения планшета внесение в лунки конъюгата фермента с антителами против компонента C3 человека и субстрата этого фермента, проведение расчета активности субкомпонентов $C1r_2s_2$ по количеству образовавшегося продукта ферментативной реакции, отличающийся тем, что в качестве активатора классического пути комплемента используют деринат.

2. Набор для определения функциональной активности субкомпонентов $C1r_2s_2$ первого компонента комплемента человека, характеризующийся тем, что он содержит плоскодонную микропанель с сорбированным деринатом и $C1q$ морской свинки, конъюгат пероксидазы с антителами к компоненту C3 комплемента человека, реагент R1, субстратный буфер и стандарт с известной активностью $C1r_2s_2$.



Определение функциональной активности Clr_2S_2 в сыворотке крови.