



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 059 972** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **G 01 N 33/50**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 93031150/13, 02.06.1993

(46) Дата публикации: 10.05.1996

(56) Ссылки: 1. Егоров А.М. и др.
Иммуноферментный анализ. Успехи
биоорганического катализа. М.: МГУ, 1979,
с.239-275. 2. Заявка Великобритании 1571418,
G 01N 33/50, 1980.

(71) Заявитель:

Институт биохимии им.А.Н.Баха РАН

(72) Изобретатель: Дзантиев Б.Б.,
Блинцов А.Н., Гапонова Н.К., Бобкова
А.Ф., Нацвлишвили Н.М., Гольдштейн
М.И., Атабеков И.Г., Изумрудов В.А., Зезин
А.Б., Резчиков А.А., Осипов А.П., Князева
В.П., Трофимец Л.Н.

(73) Патентообладатель:

Институт биохимии им.А.Н.Баха РАН

(54) **МЕМБРАНА ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ ИММУНОХИМИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ**

(57) Реферат:

Назначение: изобретение относится к
биотехнологии, а точнее к
иммуноферментному анализу. Сущность
изобретения: мембрана представляет собой

мембранный фильтр из капрона или нейлона,
или поливинилиденфторида, на поверхности
которого иммобилизованы производные
алкилированного поли-4-винилпиридина с
мол.м. 1000 - 20000 КДа.

RU 2 0 5 9 9 7 2 C 1

RU 2 0 5 9 9 7 2 C 1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 059 972** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **G 01 N 33/50**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 93031150/13, 02.06.1993

(46) Date of publication: 10.05.1996

(71) Applicant:
Institut biokhimii im.A.N.Bakha RAN

(72) Inventor: Dzantiev B.B.,
Blintsov A.N., Gaponova N.K., Bobkova
A.F., Natsvlshvili N.M., Gol'dshtejn
M.I., Atabekov I.G., Izumrudov V.A., Zezin
A.B., Rezchikov A.A., Osipov A.P., Knjazeva
V.P., Trofimets L.N.

(73) Proprietor:
Institut biokhimii im.A.N.Bakha RAN

(54) **MEMBRANE FOR SEPARATING COMPONENTS OF IMMUNO-CHEMICAL REACTION**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology. SUBSTANCE:
membrane has to be a membrane filter made of
kapron or nylon, or polyvinylidenfluoride,

onto surface of which derivatives of
alkylated poly-4-vinylpyridyne are
immobilized with 1000-2000 kDa. EFFECT:
improved precision.

Изобретение относится к биотехнологии, точнее к иммуноферментному анализу, и представляет собой мембрану для разделения компонентов иммунологической реакции.

Известны различные способы проведения твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), основанные на иммобилизации антител на твердых носителях, образовании специфических иммунокомплексов на носителе с определяемым антигеном и их выявлении с помощью ферментной метки [1]

Важным пунктом для проведения процедуры ИФА является стадия отделения меченых антител, не связанных в иммунокомплекс с определяемым антигеном, от меченых антител, связанных в иммунокомплекс. В процедурах ИФА гетерогенного типа для этого проводят иммобилизацию антител (антигена) на твердых нерастворимых носителях. Однако это приводит к значительному увеличению длительности анализа.

Можно также проводить разделение компонентов иммунохимической реакции путем фильтрации на пористых мембранах, что упрощает процедуру проведения анализа.

Известна мембрана для разделения компонентов иммунохимической реакции, выполненная из синтетического полимерного материала (поливинилхлорида), с иммобилизованным полиэлектролитом [2]

Сущность изобретения заключается в том, что в качестве полимерного материала используют мембранный фильтр из капрона или нейлона или поливинилхлорида, а в качестве иммобилизованного полиэлектролита используют производные алкилированного поли-4-винилпиридина с молекулярной массой 1000-2000 кДа. В качестве поликатиона можно использовать поли-N-этил-4-винилпиридиний бромид (М.В. $\approx$ 1000-2000 кДа), а также различные его производные поликатионы, содержащие 2-20% C_2H_4OH -групп, 2-20% гидрофобных цитильных остатков и т.п.).

Иммобилизацию поликатиона на мембранном фильтре проводят следующим образом. Мембранный фильтр из синтетического материала помещают в водный раствор поликатиона с концентрацией 10 мкг/мл и инкубируют в нем 1-2 мин при комнатной температуре. Мембраны промывают в дистиллированной воде и высушивают на воздухе при комнатной температуре.

Пример 1. Анализ HBs-антигена.

В качестве антител используют гамма-глобулиновую фракцию кроличьей антисыворотки против HBs-антигена (HBsAg) с титром $1 \cdot 10^5$.

В качестве антигена используют коммерческий препарат HBsAg.

Иммуносорбент на основе полиметакриловой кислоты (ПМАК) с молекулярной массой (MW) 200 кДа получают ковалентным связыванием антител с ПМАК, используя в качестве сшивающих агентов водорастворимые карбодимиды:

1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимид гидрохлорид или 1-циклогексил-3-(2-морфолино-4-этил)-карбодимид п-толуолсульфонат в присутствии N-оксисукцинимиды.

В качестве фермента используют

пероксидазу хрена с $RZ=3,0$ (Д403/Д280).

Конъюгат иммуноглобулинов с пероксидазой (ПХ/ЕС 1.11.1.7) получают методом окисления углеводного компонента фермента периодатом натрия.

Нерастворимый заряженный полимер готовят следующим образом. Капроновые мембраны, изготовленные по технологии НИИМедполимер (г. Москва) инкубируют 1 мин. в водном растворе поликатиона поли-N-этил-4-винилпиридиний

бромид ($\approx$ 2000 кДа) с концентрацией 10

мкг/мл при комнатной температуре. Затем мембраны промывают в дистиллированной воде и используют для разделения компонентов аналитической системы.

В серию инкубационных пробирок, содержащих по 0,1 мл раствора HBsAg в концентрациях, полученных двукратным разведением исходного раствора: 320; 160; 80; 40; 20; 10; 5; 2,5 и 1,25 нг/мл в 0,01 М К-фосфатном буфере, pH 7,2 (0,15 М NaCl; 0,05% Твин-20) добавляют 0,1 мл раствора конъюгата меченных ферментом антител ($1 \cdot 10^{-9}$ м). Затем в пробирку приливают 0,1 мл раствора иммуносорбента ($1 \cdot 10^{-9}$ м по концентрации иммуноглобулинов) и инкубируют 5 мин при комнатной температуре.

Разделение компонентов раствора проводят пропусканием его через капроновый фильтр с иммобилизованным поликатионом.

Детекцию ферментной метки на фильтре осуществляют путем инкубации его в растворе субстратов, содержащем 3,3'-диаминобензидин (0,5 мг/мл), перекись водорода (10^{-3} м) и $CoCl_2$ (0,2%).

Пересчет интенсивности окрашивания фильтра в концентрацию определяемого HBsAg проводят по калибровочному графику, полученному с использованием стандартов HBsAg в присутствии компонентов нормальной сыворотки крови.

Чувствительность метода составляет 1 нг/мл HBsAg. Время проведения анализа 10 мин.

Пример 2. Анализ X-вируса картофеля (ХВК).

В качестве антител используют гамма-глобулиновую фракцию кроличьей антисыворотки к ХВК с титром $1 \cdot 10^5$. Гамма-глобулиновую фракцию сыворотки крови выделяют двукратным осаждением в 20%-ном водном растворе полиэтиленгликоля (MW 6 кДа) с последующим диализом против 0,01 М К-фосфатного буфера (0,1 М NaCl; pH 7,4).

В качестве фермента-маркера используют щелочную фосфатазу из кишечника теленка (1000-2500 IU/мг). Введение ферментной метки в молекулу антител проводят с помощью гетеробифункционального сшивающего агента

3-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимиды, который последовательно взаимодействует с аминогруппами фермента и SH-группами частично восстановленных молекул антител.

В качестве антигена используют высокоочищенный вирусный препарат ХВК. Препаративное выделение очищенных экстрактов ХВК, его очистку и концентрирование проводят по стандартной методике, используя несколько циклов

дифференциального центрифугирования.

Растительный сок получают, растирая материал в фарфоровой ступке с добавлением 0,01 М К-фосфатного буфера (0,1 М NaCl; 0,1% тритон X-100; pH 7,4) в соотношении 1: 5 (растительная масса/объем буфера). Полученные экстракты осветляют центрифугированием при 8000 об/мин 5 мин.

В серию инкубационных пробирок, содержащих 0,1 мл исследуемого образца (растительный сок, экстракт или очищенный препарат ХВК), добавляют 0,1 мл раствора меченных ферментом антител (10^{-9} м) и инкубируют 15 мин при комнатной температуре.

Разделение компонентов аналитической смеси проводят, пропуская ее через нейлоновый фильтр (Эксперим. лаб. Р/К Хийу Калур, г. Таллинн) с иммобилизованным поликатионом, представляющий собой покрытую тонким слоем нерастворимого заряженного полимера полимерную матрицу, симметричную в сколе. Модифицированный поликатионом фильтр получают следующим образом. Нейлоновые мембраны инкубируют 1 мин в водном растворе поликатионаалкилированного поли-4-винилпиридина ($\frac{1 \text{ мг}}{\text{мл}}$ 2000 кДа),

содержащего 80% N-этильных заместителей и 20% N-оксиэтильных заместителей, при комнатной температуре. Затем мембраны промывают дистиллированной водой и используют для разделения компонентов аналитической системы.

Детекцию ферментной метки на фильтре осуществляют после инкубации его в растворе субстратов, содержащем Fast Blue RR (1 мг/мл) и альфа-нафтилфосфат (1,25 мг/мл) в 0,1 М трис-HCl буфере, pH 9,0-9,3. Пересчет интенсивности окрашивания фильтра в концентрацию измеряемого ХВК проводят по калибровочному графику, полученному с использованием стандартных препаратов ХВК.

Чувствительность метода составляет 3-8 нг/мл ХВК. Время анализа не превышает 30 мин.

П р и м е р 3. Анализ У-вируса картофеля (УВК).

В качестве антител используют гамма-глобулиновую фракцию кроличьей антисыворотки к УВК с титром $1 \cdot 10^5$.

В качестве фермента-маркера используют щелочную фосфатазу из кишечника теленка (1000-2500 IU/mg).

В качестве антигена используют высокоочищенный вирусный препарат УВК. Препаративное выделение УВК проводят по стандартной методике.

Разделение компонентов аналитической смеси проводят на поливинилиденфторидной мембране (НИИМедполимер, г. Москва) с адсорбированным поликатионом поли-N-этил-4-винилпиридиний бромидом ($\frac{1 \text{ мг}}{\text{мл}}$ 2000 кДа), содержащем в N-положении

10% цитильных групп. Предварительно мембрану инкубируют в водном растворе поликатиона (10 мг/мл) при комнатной температуре в течение 1 мин, промывают дистиллированной водой и используют для разделения компонентов аналитической

системы.

Детекцию ферментной метки на фильтре осуществляют после инкубации его в растворе субстратов, содержащем Fast Blue RR (1 мг/мл) и альфа-нафтилфосфат (1,25 мг/мл) в 0,1 М трис -HCl буфере, pH 9,2.

Приготовление всех остальных растворов и проведение анализа осуществляют по описанию в примере 2.

Чувствительность метода составляет 5 нг/мл УВК, время анализа не превышает 30 мин.

П р и м е р 4. Анализ Х-вируса картофеля (ХВК).

В анализе ХВК используют поликатион поли-N-этил-4-винилпиридиний бромид с мол.м. 1000 кДа.

Приготовление остальных растворов и реагентов для анализа ХВК, а также проведение анализа осуществляют согласно примеру 2.

Чувствительность метода 5-10 нг/мл ХВК, время анализа не превышает 30 мин.

П р и м е р 5. Анализ Х-вируса картофеля (ХВК).

В анализе ХВК используют поликатион поли-N-этил-4-винилпиридиний бромид с молекулярной массой 1000 кДа, содержащий в N-положении 20% цитильных остатков.

Приготовление остальных растворов и реагентов для анализа ХВК, а также проведение анализа осуществляют согласно примеру 2.

Чувствительность метода 5-8 нг/мл ХВК, время анализа не превышает 30 мин.

Синтетические мембранные фильтры, изготовленные из капрона, нейлона или поливинилиденфторида устойчивы в водных средах (pH 2-13), а также во многих органических растворителях. Фильтрационная и сорбционная способность таких мембранных фильтров не зависит от их расположения в фильтрующих устройствах. Предлагаемые мембранные фильтры гидрофильны, поэтому они смачиваются равномерно по всей поверхности сразу же при контакте с водой или другими водными растворами. Мембранные фильтры из капрона, нейлона и поливинилиденфторида характеризуются высокой прочностью и эластичностью в сухом и смоченном состояниях, что позволяет сохранить целостность мембран при вложении их в фильтрующее устройство, а также гофрировать их с целью получения фильтров с большими фильтрационными и сорбционными свойствами. Технология производства предложенных синтетических фильтров проста и экономична, что делает возможным их применение для массовых аналитических определений.

Формула изобретения:

МЕМБРАНА ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ ИММУНОХИМИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ, выполненная из полимерного материала с иммобилизованным полиэлектролитом, отличающаяся тем, что в качестве полимерного материала использован мембранный фильтр из капрона, или нейлона, или поливинилиденфторида, а в качестве иммобилизованного полиэлектролита использованы производные алкилированного поли-4-винилпиридина с мол.м. 1000 2000 кДа.