РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 748 901** (13) **C1**

(51) МПК
G01N 33/53 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/5306 (2021.02); G01N 33/53 (2021.02)

(21)(22) Заявка: **2020132257, 30.09.2020**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.09.2020

Дата регистрации:
01.06.2021

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **30.09.2020**

(45) Опубликовано: **01.06.2021** Бюл. № **16**

Адрес для переписки:
117593, Москва, ул. Соловьиный пр-д, 14, кв. 352, Попова Анна Олеговна

(72) Автор(ы):
Сотников Дмитрий Васильевич (RU),
Жердев Анатолий Виталиевич (RU),
Дзантиев Борис Борисович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **ZVEREVA E. A. ET ALL "CUT-OFF ON DEMAND: ADJUSTMENT OF THE THRESHOLD LEVEL OF AN IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY FOR CHLORAMPHENICOL", ANALYTICAL METHODS, V. 7, N 15, PP. 6378-6384, 2015. US 10281465 B2, 07.05.2019. RU 2016151622 A, 27.06.2018. EP 2853894 A1, 01.04.2015.**

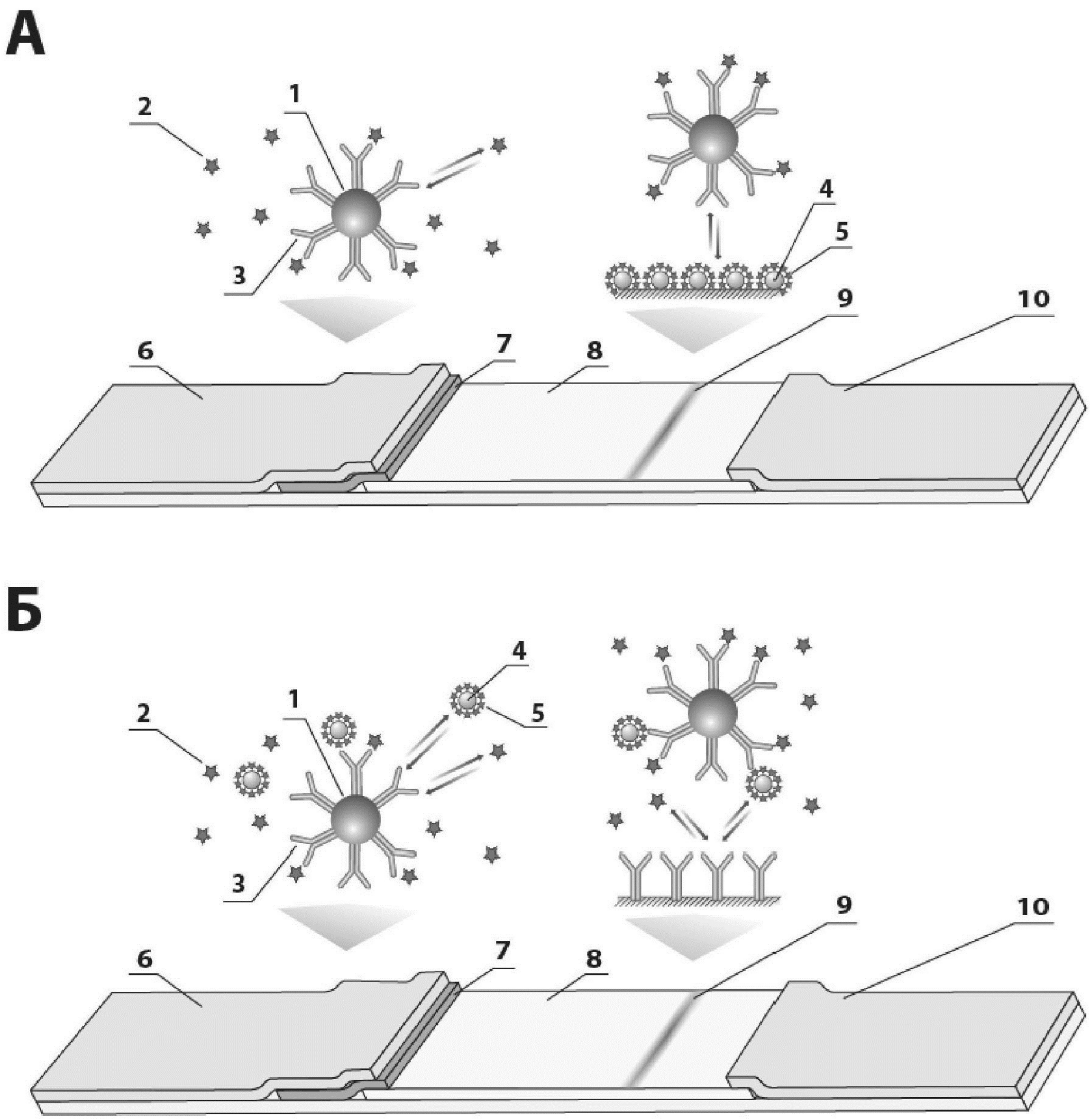
(54) СПОСОБ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА С ДВОЙНОЙ КОНКУРЕНЦИЕЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к иммунологии и аналитической биохимии и представляет собой способ иммунохроматографического анализа. Способ иммунохроматографического конкурентного анализа включает иммобилизацию специфических антител против определяемого соединения на поверхности маркерных частиц и в тестовой зоне рабочей мембраны, при этом образование окрашенного комплекса в тестовой зоне происходит при добавлении конъюгата белка-носителя с несколькими молекулами аналита за счет поливалентного взаимодействия, а в случае наличия в пробе определяемого соединения его молекулы блокируют активные центры антител как на маркерных частицах, так и в тестовой зоне. Техническим результатом является повышение чувствительности метода. 3 ил.

RU 2748901 C1

RU 2748901 C1



Фиг. 1

RU 2748901 C1

RU 2748901 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 748 901** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
G01N 33/5306 (2021.02); G01N 33/53 (2021.02)

(21)(22) Application: **2020132257, 30.09.2020**

(24) Effective date for property rights:
30.09.2020

Registration date:
01.06.2021

Priority:
(22) Date of filing: **30.09.2020**

(45) Date of publication: **01.06.2021** Bull. № **16**

Mail address:
117593, Moskva, ul. Solovinyj pr-d, 14, kv. 352, Popova Anna Olegovna

(72) Inventor(s):
Sotnikov Dmitrii Vasilevich (RU),
Zherdev Anatolii Vitalievich (RU),
Dzantiev Boris Borisovich (RU)

(73) Proprietor(s):
Federalnoe gosudarstvennoe uchrezhdenie «Federalnyi issledovatelskii tsentr «Fundamentalnye osnovy biotekhnologii» Rossiiskoi akademii nauk» (FITs Biotekhnologii RAN) (RU)

(54) METHOD FOR HIGHLY SENSITIVE IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ANALYSIS WITH DOUBLE COMPETITION

(57) Abstract:

FIELD: immunology; biochemistry.

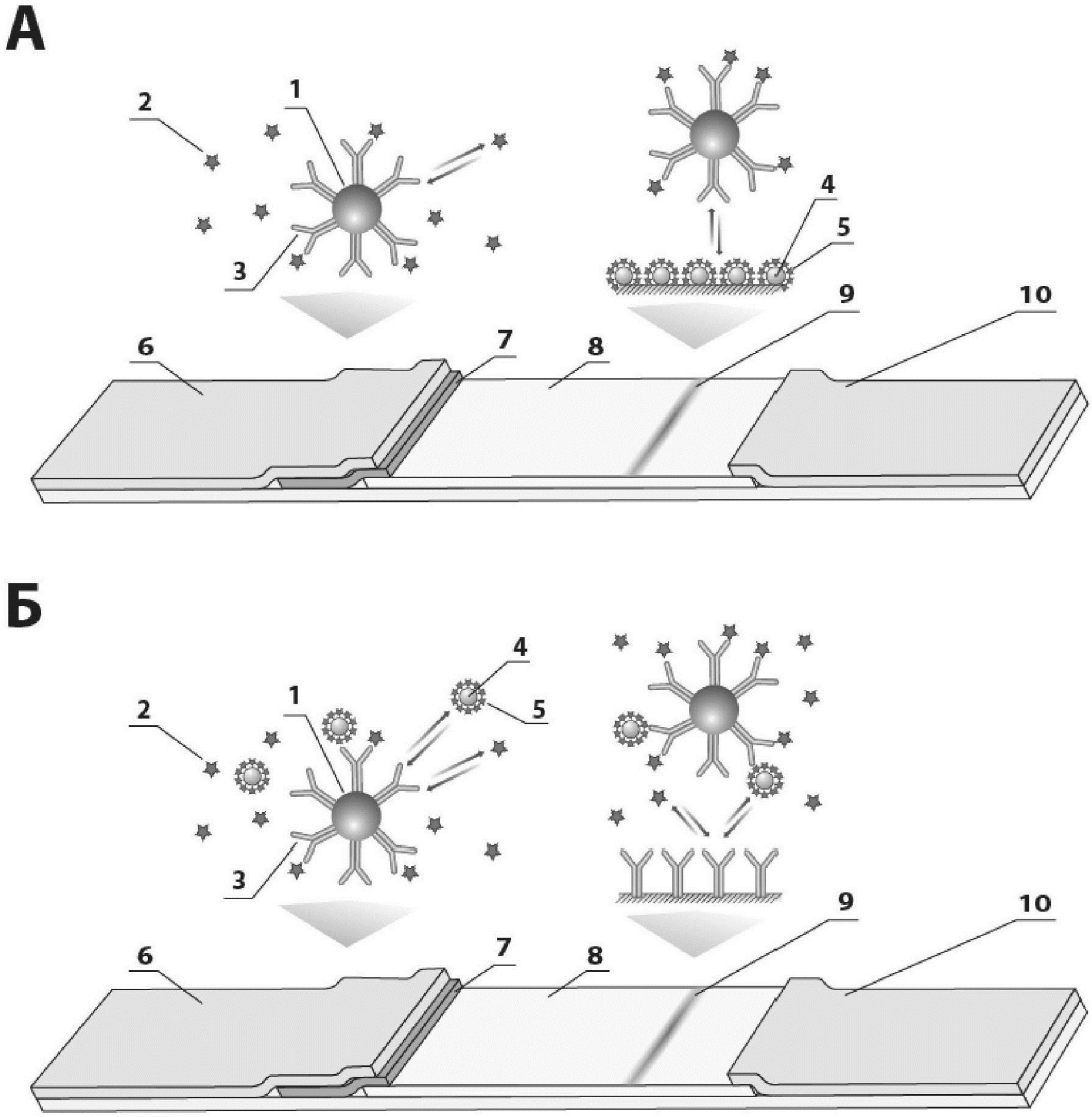
SUBSTANCE: invention relates to immunology and analytical biochemistry and is a method for immunochromatographic analysis. The method for immunochromatographic competitive analysis involves the immobilization of specific antibodies against the compound to be determined on the surface of marker particles and in the test zone of the working membrane, while the formation of a colored complex in the test zone occurs when a conjugate of a carrier protein with several analyte molecules is added due to polyvalent interaction, and in the case of the presence in the sample of the compound to be determined, its molecules block the active centers of antibodies both on the marker particles and in the test zone.

EFFECT: increasing the sensitivity of the method.

1 cl, 3 dwg

RU 2748901 C1

RU 2748901 C1



Фиг. 1

RU 2748901 C1

RU 2748901 C1

Изобретение относится к иммунологии и аналитической биохимии и представляет собой способ иммунохроматографического анализа, предназначенный для высокочувствительного выявления в пробах низкомолекулярных аналитов.

Иммунохроматографический анализ для определения различных антигенов может быть реализован в нескольких различных форматах. В аналитических системах с моновалентными антигенами комплексообразование антиген-антитело не регистрируется напрямую. В них реализуются конкурентные схемы анализа. Наиболее распространенным способом реализации конкурентной иммунохроматографии является схема, которая заключается в следующем:

На пористой мембране (как правило, нитроцеллюлозной) иммобилизуют конъюгат антигена с белком-носителем. Участок с нанесенным конъюгатом антигена с белком-носителем называют тестовой или аналитической зоной. На другой участок тест-полоски наносят конъюгат специфических антител с маркером (как правило, коллоидным золотом). Жидкость движется под действием капиллярных сил и смывает коллоидный конъюгат. Меченые антитела начинают с ее фронтом перемещаться по мембране. Если определяемый антиген в пробе отсутствует, то меченые антитела, дойдя до зоны с иммобилизованным антигеном, концентрируются там, образуя окрашенную полосу (Рис. 1, схема А). Присутствующие в пробе антигены блокируют активные центры антител, что делает невозможным их связывание с антигеном в аналитической зоне. Таким образом, отсутствие в тестовой зоне окрашенной полосы свидетельствует о положительном результате анализа (выявлении антигена в концентрации не ниже порогового уровня), тогда как формирование окрашенной полосы означает, что содержание антигена ниже детектируемого уровня. Такой способ конкурентной иммунохроматографии, например, был использован Зверевой и соавт. для определения антибиотика – хлорамфеникола [Zvereva E. A. et al. Cut-off on demand: adjustment of the threshold level of an immunochromatographic assay for chloramphenicol //Analytical Methods. – 2015. – Т. 7. – №. 15. – С. 6378-6384.]. Описанный в статье способ рассматривается в настоящей заявке как прототип.

Предметом изобретения является способ конкурентного иммунохроматографического анализа, в котором специфические антитела против определяемого соединения иммобилизуются и на поверхности маркерных частиц (Ab*) и в тестовой зоне рабочей мембраны (Abi), а конъюгат белка-носителя с несколькими молекулами антигена иммобилизуется на начальном участке теста (PAg). При попадании жидкой пробы на тест-полоску она смешивается сначала с компонентом PAg, затем – с Ab*, в результате чего происходит реакция с образованием комплекса PAg-Ab*. Под действием капиллярных сил компоненты жидкой пробы мигрируют вдоль тест-полоски и в тестовой зоне происходит взаимодействие иммобилизованных антител (Abi) с комплексом PAg-Ab* за счет наличия у PAg нескольких валентностей. В результате этого взаимодействия в тестовой зоне образуется тройной окрашенный комплекс Abi-PAg-Ab*. Образование этого комплекса может происходить и альтернативным путем: Abi вначале взаимодействует с непрореагировавшим PAg, а затем образовавшийся комплекс Abi-PAg вступает в реакцию со свободным конъюгатом Ab*. В случае наличия в пробе определяемого соединения оно взаимодействует с Ab*, блокируя возможность связывания Ab* как с PAg. После достижения фронтом жидкости тестовой зоны аналит также блокирует Abi, дополнительно снижая вероятность образования окрашенного комплекса Abi-PAg-Ab* (Рис. 1, схема Б). Таким образом, в отличие от прототипных методик, в предложенном способе конкурентной иммунохроматографии аналит блокирует не один, а два связывающих реагента, что повышает эффективность конкуренции и снижает предел детекции аналита.

Пример. Иммунохроматографическое конкурентное определение антибиотика – хлорамфеникола

Для изготовления иммунохроматографических тест-систем использовали набор mdi Easypack («Advanced Microdevices», Индия), включающий в себя рабочие нитроцеллюлозные мембраны CNPH90 с размером пор 15 мкм, подложку под конъюгат PT-R5, мембрану для нанесения образца FR1(0.6) и конечную адсорбирующую мембрану AP045.

Конъюгат коллоидного золота с моноклональными антителами против хлорамфеникола (клон B10) наносили на мембраны из раствора с OD520 = 2,0 в количестве 16 мкл на см полосы.

В стандартной схеме конкурентной иммунохроматографии аналитическая зона была образована конъюгатом хлорамфеникола с бычьим сывороточным альбумином (10:1 моль/моль). На 1 см полосы наносили 2 мкл препарата (1,0 мг/мл в 50 мМ фосфатно-солевом буфере pH 7,4).

В альтернативной схеме, которая является предметом разработки, в аналитической зоне иммобилизовали антитела B10 в концентрации 1 мг/мл. На 1 см полосы наносили 2 мкл препарата (1,0 мг/мл в 50 мМ фосфатно-солевом буфере pH 7,4). Конъюгат хлорамфеникола с бычьим сывороточным альбумином наносили на мембрану для нанесения образца из раствора с концентрацией 0,2 мкг/мл и высушивали в течение ночи при комнатной температуре.

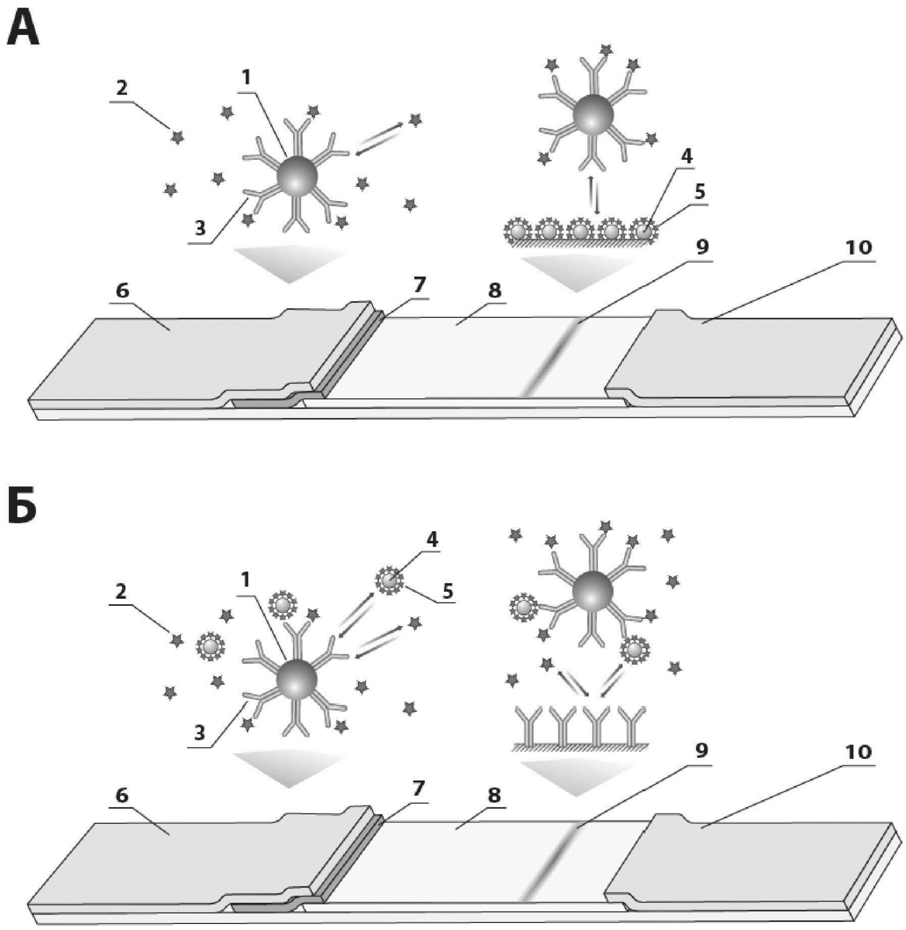
После сборки мембранных компонентов их разрезали на полоски шириной 3,5 мм. Каждую полоску упаковывали в ламинированную алюминиевую фольгу с помощью мини-конвейера, используя 0,5 г расфасованного силикагеля в качестве осушителя. Нарезка и упаковка производились при 20–22 ° C в специальной комнате с относительной влажностью не более 30%.

Полученные результаты иммунохроматографического тестирования градуировочных растворов, содержащих известные концентрации хлорамфеникола, представлены на рис. 2 (для прототипного способа) и рис. 3 (для предложенного альтернативного способа). Как видно из представленных данных, предел детекции хлорамфеникола предложенным способом иммунохроматографии (1 нг/мл) на порядок ниже, чем прототипным способом (10 нг/мл), что подтверждает эффективность предложенного подхода.

(57) Формула изобретения

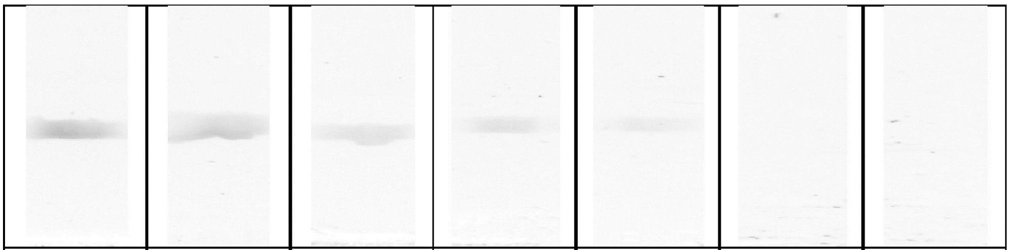
Способ иммунохроматографического конкурентного анализа, отличающийся тем, что специфические антитела против определяемого соединения иммобилизуются и на поверхности маркерных частиц и в тестовой зоне рабочей мембраны; причем образование окрашенного комплекса в тестовой зоне происходит при добавлении конъюгата белка-ностителя с несколькими молекулами аналита за счет поливалентного взаимодействия; а в случае наличия в пробе определяемого соединения его молекулы блокируют активные центры антител как на маркерных частицах, так и в тестовой зоне.

1



Фиг. 1

2



0	0,01	0,1	1	10	100	1000
Концентрация хлорамфеникола (нг/мл)						

Фиг. 2

0	0,01	0,1	1	10	100	1000
Концентрация хлорамфеникола (нг/мл)						

Фиг. 3