



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/543 (2020.01); G01N 33/558 (2020.01); G01N 2430/00 (2020.01)

(21)(22) Заявка: 2019138779, 29.11.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.11.2019Дата регистрации:
27.02.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.11.2019

(45) Опубликовано: 27.02.2020 Бюл. № 6

Адрес для переписки:

119071, Москва, Ленинский пр-т, 33, корп. 2,
ФГУ "ФИЦ Биотехнологии РАН", патентный
отдел

(72) Автор(ы):

Бызова Надежда Алексеевна (RU),
Таранова Надежда Алексеевна (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: US 20050208593 A1, 22.09.2005. US
20050148097 A1, 07.07.2005. РУДАКОВ О.Б. и
др. Определение бисфенола А, триклозана и
нонилфенола в материалах и экстрактах
методом ТСХ, совмещенным с цифровой
цветометрией // Сорбционные и
хроматографические процессы, 2016, Т.16, N.5,
стр.686-694. PENG X. et al. A signal-enhanced
lateral flow strip biosensor for (см. прод.)

(54) УСТРОЙСТВО ДЛЯ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССНОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ И ВНЕЛАБОРАТОРНОЙ ОДНОВРЕМЕННОЙ ДЕТЕКЦИИ ТОКСИЧНЫХ КОНТАМИНАНТОВ - ПОВЕРХНОСТНО АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НОНИЛФЕНОЛА И БИСФЕНОЛА А В ПИТЬЕВЫХ, БЫТОВЫХ, ПРИРОДНЫХ И СТОЧНЫХ ВОДАХ

(57) Реферат:

Заявленное устройство предназначено для иммунохроматографической экспрессной лабораторной и внелабораторной одновременной детекции токсичных контаминантов - поверхностно активных веществ (ПАВ) нонилфенола и бисфенола А в питьевых, бытовых, природных и сточных водах. Устройство представляет собой мультимембранный композит с нанесенными иммунореагентами (тест-полоску). Мультимембранный композит состоит из рабочей нитроцеллюлозной мембраны на твердой полистироловой основе с нанесенными

иммунореагентами, стекловолоконной мембраны с нанесенными иммунореагентами, мембраны для впитывания и сепарации исследуемого образца и конечной адсорбирующей мембраны для впитывания компонентов образца после прохождения реакции. Отличительной особенностью заявленного устройства является то, что в контрольную зону (К.З.) нанесены поликлональные козьи антитела, специфичные к иммуноглобулинам кролика. В первую тестовую зону (Т.З.1) нанесен конъюгат нонилфенола с белком-носителем бычьим сывороточным альбумином (БСА). Во вторую тестовую зону

(Т.3.2) нанесен конъюгат бисфенола А с белком-носителем соевым ингибитором трипсина (СИТ). На стекловолоконную мембрану нанесена смесь конъюгатов поликлональных кроличьих антител, специфичных к нонилфенолу, с коллоидным золотом и поликлональных кроличьих антител, специфичных к бисфенолу А, с коллоидным золотом. Для проведения анализа не требуется никаких дополнительных приспособлений. Продолжительность анализа составляет 10 мин без учета пробоподготовки. Технической задачей

заявленной полезной модели является одновременная детекция двух токсичных контаминантов - нонилфенола и бисфенола А в пробах воды. Технический результат заявленной полезной модели заключается в одновременной детекции на одной тест-полоске двух токсичных контаминантов - поверхностно активных веществ нонилфенола и бисфенола А с использованием простой одностадийной процедуры проведения анализа, обеспечиваемой за счет нанесения на тест-полоску всех необходимых реагентов.

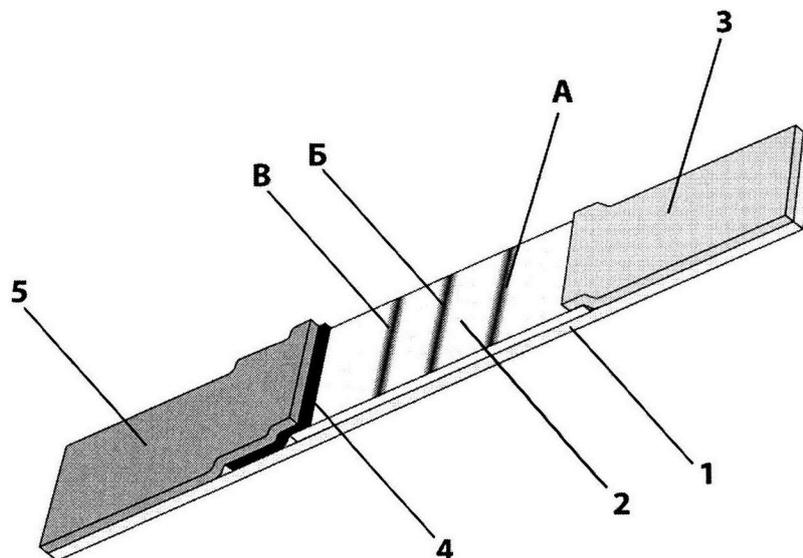


Рис. 1

(56) (продолжение):

ultrasensitive and on-site detection of bisphenol // FOOD AND AGRICULTURAL IMMUNOLOGY, 2017, V.29, pp.1-12.

RU 196383 U1

RU 196383 U1

Полезная модель относится к определению токсичных контаминантов - поверхностно активных веществ нонилфенола и бисфенола А и может быть использована как экспрессное средство лабораторного и внелабораторного контроля для обеспечения безопасности разных видов потребительской продукции (питьевой и бытовой воды) и мониторинга окружающей среды (природных и сточных вод).

Устройство предназначено для иммунохроматографической экспрессной лабораторной и внелабораторной одновременной детекции токсичных контаминантов - поверхностно активных веществ нонилфенола и бисфенола А в питьевых, бытовых, природных и сточных водах.

Поверхностно активные вещества, используемые человеком в повседневной жизни, распространяются в составе сточных вод и, в связи с возрастающими объемами потребления, являются загрязнителями мирового масштаба. Широко применяются в промышленности представители анионных ПАВ - линейные алкилбензолсульфонаты и неионные ПАВ - нонилфенолполиэтоксилаты, которые в процессе деградации образуют стабильные продукты - октилфенол и нонилфенол.

Наиболее опасными ПАВ являются бисфенол А, нонилфенол, бензофеноны и бензотриазол. Структура бисфенола А сходна со структурой эстрогенов - эстрадиола и диэтилстильбэстрола, в связи с чем данное соединение и его аналоги отнесены к факторам разрушения эндокринной системы. Связываясь с рецепторами эстрогенов, данные соединения нарушают нормальное функционирование щитовидной и поджелудочной желез, мозга, иммунной системы. В связи с вышеперечисленными свойствами в странах Евросоюза установлена предельно допустимая концентрация бисфенола А в воде и почве - 0,6 мг/кг. В РФ нормативы содержания бисфенола А в почве и пище не установлены, в воде установлен ПДК, равный 0,01 мг/дм. С января 2005 г. оксиэтилированные нонилфенолы (неонолы) запрещены Еврокомиссией к использованию на территории ЕС в концентрации более 0,1% в промышленных средствах очистки, товарах бытовой химии, косметике и других областях применения. В РФ установлен ПДК нонилфенолов в воде объектов рыбохозяйственного значения в пределах от 0,001 до 0,3 мг/дм³.

Для определения ПАВ используется жидкостная хроматография, газовая хроматография с масс-спектрометрической детекцией, капиллярный электрофорез. Колориметрические методы определения контаминантов с использованием наночастиц перспективны благодаря сочетанию эффекта поверхностного плазмонного резонанса и селективной адсорбции рецепторных молекул на поверхность частиц за счет различных типов взаимодействий. Несмотря на такие преимущества, как высокая точность и низкий предел обнаружения, для применения вышеперечисленных инструментальных методов необходимо дорогостоящее оборудование, высокоочищенные растворители, квалифицированный персонал, а стоимость характеристики одной пробы довольно высока.

В последнее десятилетие для определения ПАВ активно развиваются альтернативные методы - иммуноферментный анализ (ИФА), поляризационный флуороиммуноанализ (ПФИА), рассматривается применение аптамеров в качестве рецепторных молекул и различных наночастиц в качестве маркеров. Возможности иммуноанализа связаны с его методической простотой, а также производительностью, обеспечивающей одновременное тестирование до 80 проб в течение 1-2 часов, а в кинетических форматах - в течение 10-20 мин. Так, Huang и соавторы использовали моноклональные антитела к бисфенолу А для разработки гомогенного ПФИА с пределом обнаружения 5,6 нг/мл. Мартыновым и соавторами был разработан ИФА нонилфенола и его структурных

аналогов в загрязненных образцах воды с пределом обнаружения 10 нг/мл. Аналогичные результаты были представлены в последующей публикации Бураковского и Лухверчик. Представленные в литературе разработки иммунохимических тест-систем для определения ПАВ в основном сфокусированы на создании и апробации различных вариантов иммуносенсорных систем, предполагающих использование дополнительного приборного обеспечения и в связи с этим непригодных для быстрого внелабораторного тестирования.

Простой формой иммунохимического анализа является иммунохроматографический анализ (ИХА), который обнаруживает присутствие антигена (токсичного контаминанта) в жидкой пробе за 10-15 минут. ИХА основан на движении жидкой пробы вдоль мембраны, которое приводит к образованию на разных участках мембраны специфических иммунных комплексов. Конъюгированный со специфическими антителами окрашенный маркер (коллоидное золота) распределяется по мембране, и его наличие или отсутствие в определенных участках мембраны по окончании анализа является основанием для вывода о полученных результатах. Использование ИХА для детекции токсичных контаминантов обеспечивает достижение ряда преимуществ - проведение эффективного контроля во внелабораторных условиях, экспрессность проведения анализа при минимальной пробоподготовке, проведение анализа в одну стадию без необходимости в дополнительных реагентах и манипуляциях и простоту детектирования и интерпретации результатов анализа.

Несмотря на то, что ИХА активно разрабатывается и применяется для диагностики токсичных контаминантов (пестицидов, микотоксинов, ветеринарных препаратов, поверхностно активных веществ, тяжелых металлов), в научной и коммерческой литературе нет описания разработки иммунохроматографических тест-систем для одновременного определения нонилфенола и бисфенола А.

Наиболее близкими аналогами заявляемой полезной модели являются основанные на реакции антиген-антитело иммунохроматографические тест-системы для детекции одного и двух токсичных контаминантов:

тест-система для определения бисфенола А в талой воде, описанная в публикации Дзантиева и соавторов «Lateral flow immunoassay for bisphenol A: Development of test strips and their application for ecological monitoring» (Иммунохроматографический анализ бисфенола А: разработка тестов и их применение для экологического мониторинга), International Conference on Applied Physics, Power and Material Science, IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series, 2019, v. 1172, 012088. DOI: 10.1088/1742-6596/1172/1/012088;

тест-система для одновременного определения двух антибиотиков - ципрофлоксацина и хлорамфеникола, в молочных продуктах, описанная в публикации Гендриксон и соавторов ((Development of a multicomponent immunochromatographic test system for the determination of fluoroquinolone and amphenicol antibiotics in dairy products)) (Разработка многокомпонентной иммунохроматографической тест-системы для определения фторхинолоновых и амфениколовых антибиотиков в молочных продуктах), Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, v. 99, N 8, p. 3834-3842. DOI: 10.1002/jsfa.9605.

Представленная в публикации Дзантиева и соавторов тест-система представляет собой мультимембранный композит размерами 78×3,5×1,5 мм, который состоит из:

нитроцеллюлозной рабочей мембраны на твердой полистироловой основе с нанесенными в контрольную зону поликлональными козьими антителами к иммуноглобулинам кролика и нанесенным в тестовую зону конъюгатом бисфенола А с белком-носителем СИТ;

стекловолоконной мембраны с нанесенным конъюгатом поликлональных кроличьих

антител, специфичных к бисфенолу А, с коллоидным золотом;
мембраны для впитывания и сепарации исследуемого образца;
конечной адсорбирующей мембраны для впитывания компонентов образца после прохождения реакции.

5 Анализ проводят следующим образом:

1. Образцы снега расплавляют при комнатной температуре, твердые примеси отфильтровывают и полученную талую воду используют для ИХА.

2. 100 мкл фильтрованной талой воды переносят в пластиковую пробирку вместимостью 1,5 мл.

10 3. Тест-полоску погружают вертикально нижним концом мембраны для впитывания образца в жидкость на 10 мин.

4. Через 10 мин тест-полоску вынимают. Результат анализа фиксируют визуально или с использованием детектора с видеоцифровой регистрацией.

Результат анализа интерпретируют следующим образом:

15 1. Если через 10 мин на рабочей мембране тест-полоски появляются две линии (контрольная и тестовая), окрашенные в темно-красный цвет, то результат анализа считается отрицательным, т.е. в образце не содержится бисфенол А или его концентрация ниже предела обнаружения.

20 2. Если через 10 мин на рабочей мембране тест-полоски появляется одна темно-красная линия (контрольная), то результат анализа считается положительным, т.е. в образце содержится бисфенол А в концентрации равной или выше предела обнаружения.

3. Если через 10 мин на рабочей мембране тест-полоски не образуется ни одной окрашенной линии или образуется только одна тестовая окрашенная линия, то результат анализа считается недействительным.

25 Представленная в публикации Гендриксон и соавторов тест-система представляет собой мультимембранный композит размерами 80×3,5×2,0 мм, который состоит из:

нитроцеллюлозной рабочей мембраны на твердой полистироловой основе с нанесенной в контрольную зону смесью поликлональных козьих антител к

30 иммуноглобулинам мыши и кролика, нанесенным в первую тестовую зону конъюгатом хлорамфеникола с белком-носителем СИТ и нанесенным во вторую тестовую зону конъюгатом ципрофлоксацина с белком-носителем яичным альбумином;

35 стекловолоконной мембраны с нанесенной смесью конъюгатов моноклональных мышинных антител, специфичных к хлорамфениколу, с коллоидным золотом и поликлональных кроличьих антител, специфичных к ципрофлоксацину, с коллоидным золотом;

мембраны для впитывания и сепарации исследуемого образца;

конечной адсорбирующей мембраны для впитывания компонентов образца после прохождения реакции.

Анализ проводят следующим образом:

40 1. Образцы молочных продуктов разбавляют в два раза 0,15 М фосфатно-солевым буфером с рН 7,4.

2. По 100 мкл пробы вносят в лунку иммунологического микропланшета.

3. Тест-полоску погружают вертикально нижним концом мембраны для впитывания образца в жидкость на 15 мин.

45 4. Через 15 мин после начала анализа тест-полоску вынимают и результат фиксируют визуально или с использованием детектора с видеоцифровой регистрацией.

Результат анализа интерпретируют следующим образом.

1. Если через 15 мин на рабочей мембране тест-полоски появляются три линии

(контрольная и две тестовые), окрашенные в темно-красный цвет, то результат анализа считается отрицательным, т.е. в образце не содержатся хлорамфеникол и ципрофлоксацин или их концентрации ниже пределов обнаружения.

5 2. Если через 15 мин на рабочей мембране тест-полоски появляются две темно-красные линии (контрольная и первая по ходу движения жидкости тестовая), то результат анализа считается положительным по ципрофлоксацину и отрицательным по хлорамфениколу, т.е. в образце содержится ципрофлоксацин в концентрации равной или выше предела обнаружения и не содержится хлорамфеникол (или его концентрация ниже предела обнаружения).

10 3. Если через 15 мин на рабочей мембране тест-полоски появляются две темно-красные линии (контрольная и вторая по ходу движения жидкости тестовая), то результат анализа считается положительным по хлорамфениколу и отрицательным по ципрофлоксацину, т.е. в образце содержится хлорамфеникол в концентрации равной или выше предела обнаружения и не содержится ципрофлоксацин (или его концентрация
15 ниже предела обнаружения).

4. Если через 15 мин на рабочей мембране тест-полоски появляется одна темно-красная линия (контрольная), то результат анализа считается положительным по ципрофлоксацину и хлорамфениколу, т.е. в образце содержатся ципрофлоксацин и хлорамфеникол в концентрациях равных или выше пределов обнаружения.

20 5. Если через 15 мин на рабочей мембране тест-полоски не образуется ни одной окрашенной линии или образуются только тестовые линии (одна или две), то результат анализа считается недействительным.

Технической задачей заявленной полезной модели является одновременная детекция двух токсичных контаминантов - нонилфенола и бисфенола А в пробах воды.

25 Технический результат заявленной полезной модели заключается в одновременной детекции на одной тест-полоске двух токсичных контаминантов - поверхностно активных веществ нонилфенола и бисфенола А с использованием простой одностадийной процедуры проведения анализа, обеспечиваемой за счет нанесения на тест-полоску всех необходимых реагентов.

30 Предлагается устройство для иммунохроматографической экспрессной лабораторной и внелабораторной одновременной детекции токсичных контаминантов - поверхностно активных веществ нонилфенола и бисфенола А, в питьевых, бытовых, природных и сточных водах. Устройство представляет собой мультимембранный композит с нанесенными иммунореагентами (тест-полоску). Мультимембранный композит состоит
35 из рабочей нитроцеллюлозной мембраны на твердой полистироловой основе с нанесенными иммунореагентами, стекловолоконной мембраны с нанесенными иммунореагентами, мембраны для впитывания и сепарации исследуемого образца и конечной адсорбирующей мембраны для впитывания компонентов образца после прохождения реакции.

40 Указанный технический результат достигается тем, что:

в контрольную зону (К.З.) нанесены поликлональные козьи антитела, специфичные к иммуноглобулинам кролика;

в первую тестовую зону (Т.З.1) нанесен конъюгат нонилфенола с белком-носителем БСА;

45 во вторую тестовую зону (Т.З.2) нанесен конъюгат бисфенола А с белком-носителем СИТ;

на стекловолоконную мембрану нанесена смесь конъюгатов поликлональных кроличьих антител, специфичных к нонилфенолу, с коллоидным золотом и

поликлональных кроличьих антител, специфичных к бисфенолу А, с коллоидным золотом.

На прилагаемом чертеже (рис. 1) представлено заявляемое устройство, где 1 - твердая основа рабочей нитроцеллюлозной мембраны из полистирола, 2 - рабочая нитроцеллюлозная мембрана с нанесенными и высушенными иммунореагентами, 3 - конечная адсорбирующая мембрана для впитывания компонентов образца после прохождения реакции, 4 - стекловолоконная мембрана с нанесенными и высушенными иммунореагентами, 5 - мембрана для впитывания и сепарации исследуемого образца, А - К.З. с нанесенными поликлональными козьими антителами, специфичными к иммуноглобулинам кролика, Б - Т.З.2 с нанесенным конъюгатом бисфенола А с белком-носителем СИТ, В - Т.З.1 с нанесенным конъюгатом нонилфенола с белком-носителем БСА.

В таблице 1 приведена характеристика материалов, из которых изготовлены элементы заявляемого устройства.

Характеристика материалов, из которых изготовлены элементы заявляемого устройства				
№	Наименование элемента заявляемого устройства	Размер	Состав материала	Характеристика материала
1	Твердая основа рабочей мембраны	3,5 x 76 мм	полистироловый адгезивный материал	<ul style="list-style-type: none"> • цвет – белый • толщина – 250±15 мкм
2	Рабочая мембрана	3,5 x 26 мм	полимер нитроцеллюлоза	<ul style="list-style-type: none"> • средний диаметр пор – 8 мкм; • сорбционная емкость по белку – не менее 50 мг/см²; • толщина – 100±15 мкм; • скорость прохождения физиологического раствора через 4 см мембраны – 170±25 с;
3	Конечная адсорбирующая мембрана	3,5 x 27 мм	целлюлоза	<ul style="list-style-type: none"> • цвет – белый; • толщина – 280-480 мкм; • адсорбционная емкость – 8,5-15,5 мг/см²; • средний объем удержания воды – 37-47 мг/см²;
4	Мембрана для нанесения конъюгата антител с коллоидным золотом	3,5 x 6 мм	стеклянное микроволокно; или полиэфирное микроволокно	<ul style="list-style-type: none"> • ширина – 6 мм; • толщина – 400 мкм; • адсорбционная емкость – 9,8 мг/см²; • скорость прохождения воды через 4 см мембраны – 24 с;
5	Мембрана для впитывания и сепарации образца	3,5 x 27 мм	целлюлоза	<ul style="list-style-type: none"> • цвет – белый; • толщина – 280-380 мкм; • адсорбционная емкость – 10,5-15,5 мг/см²; • средний объем удержания воды – 30-40 мг/см²;

Анализ проводят следующим образом.

1. 100-120 мкл анализируемой воды (питьевой, бытовой, природной, сточной) вносят в пластиковую пробирку вместимостью 1,5 мл.

2. Тест-полоску погружают вертикально нижним концом мембраны для впитывания образца на глубину 0,5 см в жидкость и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 мин.

3. Вынимают тест-полоску и помещают ее на сухую горизонтальную поверхность на 9 мин.

4. Через 10 мин после начала движения жидкости по тест-полоске результат анализа фиксируют визуально или с использованием детектора с видеоцифровой регистрацией. Заявляемое устройство функционирует следующим образом (см. рис. 1): Если в образце присутствуют нонилфенол и бисфенол А, то они с потоком жидкости перемещаются по впитывающей мембране (5), доходят до стекловолоконной мембраны (4) и реагируют с конъюгатами коллоидного золота со специфическими антителами с образованием двойных окрашенных комплексов (растворенный антиген - антитела, меченные коллоидным золотом). Образовавшиеся двойные окрашенные комплексы под действием капиллярных сил движутся вдоль рабочей нитроцеллюлозной мембраны (2) и взаимодействуют с иммобилизованными в Т.3.1 (В) и Т.3.2 (Б) конъюгатами антигенов нонилфенола с белком-носителем БСА (Т.3.1, В) и бисфенола А с белком-носителем СИТ (Т.3.2, Б) с образованием тройных комплексов (иммобилизованный на мембране через белок-носитель антиген - меченные коллоидным золотом антитела - антиген из раствора). Избыток не связавшихся двойных окрашенных комплексов продолжает двигаться вдоль рабочей нитроцеллюлозной мембраны (2) и взаимодействует с антивидовыми антителами, иммобилизованными в К.3. (А), с образованием двойных комплексов (иммобилизованные на мембране антивидовые антитела - антитела, меченные коллоидным золотом).

Интерпретация результатов анализа производится в соответствии со схемой, представленной на рис. 2:

1. Если через 10 мин на рабочей мембране тест-полоски появляются три красные линии (К.3., Т.3.1 и Т.3.2), то результат анализа считается отрицательным, т.е. в образце не содержатся нонилфенол и бисфенол А или их концентрации ниже пределов обнаружения (рис. 2а).

2. Если через 10 мин на рабочей мембране тест-полоски появляются две красные линии (К.3. и первая по ходу движения жидкости Т.3.1), то результат анализа считается положительным по бисфенолу А и отрицательным по нонилфенолу, т.е. в образце содержится бисфенол А в концентрации равной или выше предела обнаружения и не содержится нонилфенол (или его концентрация ниже предела обнаружения), как показано на рис. 2б.

3. Если через 10 мин на рабочей мембране тест-полоски появляются две красные линии (К.3. и вторая по ходу движения жидкости Т.3.2), то результат анализа считается положительным по нонилфенолу и отрицательным по бисфенолу А, т.е. в образце содержится нонилфенол в концентрации равной или выше предела обнаружения и не содержится бисфенол А (или его концентрация ниже предела обнаружения), как показано на рис. 2в.

4. Если через 10 мин на рабочей мембране тест-полоски появляется одна красная линия (К.3.), то результат анализа считается положительным по нонилфенолу и бисфенолу А, т.е. в образце содержатся нонилфенол и бисфенол А в концентрациях равных или выше пределов обнаружения (рис. 2г).

5. Если через 10 мин на рабочей мембране тест-полоски не образуется ни одной окрашенной линии или образуются только тестовые линии (одна или две), то результат анализа считается недействительным (рис. 2д).

Эффективность данного подхода подтверждается следующими представленными ниже примерами:

Пример 1 (исследование времени получения отрицательных по нонилфенолу и бисфенолу А результатов анализа с использованием заявляемого устройства).

С использованием заявляемого устройства проводят анализ питьевой воды, не содержащей нонилфенол и бисфенол А по данным ИФА. 120 мкл образца вносят в пробирку. Заявляемое устройство (тест-полоску) погружают вертикально нижним концом мембраны для впитывания образца на глубину 0,5 см в образец и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 мин. Вынимают тест-полоску и помещают ее в паз выдвижной каретки детектирующего устройства для видеоцифровой регистрации. Результат анализа оценивают через 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15 мин с помощью программного обеспечения видеоцифрового детектора. Время анализа контролируют с помощью секундомера. Анализ проводят в пяти повторностях, используя тест-полоски пяти разных серий (полоски №№1-5).

Результаты анализа приведены в таблице 2. Интенсивности окрашивания каждой из зон связывания нормированы на ее среднее значение, полученное через 15 мин после начала анализа.

Из приведенных экспериментальных данных видно, что через 10 мин после начала анализа интенсивности окрашивания К.З. достигают 100-101,0%, зон связывания нонилфенола (Т.З.1) - 99,6-100,6% и зон связывания бисфенола А (Т.З.2) - 99,7-100,1% и практически не изменяются в течение следующих пяти минут, т.е. время анализа с использованием заявленного устройства при отсутствии в пробе нонилфенола и бисфенола А составляет 10 мин.

Таблица 2

Динамика формирования окрашенных зон связывания при одновременном иммунохроматографическом определении нонилфенола и бисфенола А в питьевой воде (при отсутствии нонилфенола и бисфенола А в пробе по данным ИФА)

Время, мин	Интенсивность окрашивания зон связывания, %														
	Тест-полоска №1			Тест-полоска №2			Тест-полоска №3			Тест-полоска №4			Тест-полоска №5		
	Т.З.1	Т.З.2	К.З.	Т.З.1	Т.З.2	К.З.	Т.З.1	Т.З.2	К.З.	Т.З.1	Т.З.2	К.З.	Т.З.1	Т.З.2	К.З.
2	18,2	9,2	17,3	18,0	12,2	20,3	16,8	11,3	21,2	18,8	10,4	20,0	17,5	9,8	20,3
3	32,1	28,8	41,5	33,4	30,2	42,2	29,6	31,0	44,5	32,9	28,6	41,6	34,3	27,6	42,6
4	44,6	39,6	58,2	45,3	41,1	58,1	43,5	40,7	59,2	45,2	38,7	60,2	44,5	38,5	55,8
5	60,5	57,8	69,4	59,6	55,9	70,8	60,1	54,5	70,5	58,4	52,6	72,5	59,2	53,6	71,5
6	69,9	64,8	78,8	67,8	65,5	81,1	68,9	66,3	83,1	67,5	65,8	83,3	68,5	63,7	82,7
7	78,6	75,5	85,8	75,8	76,9	92,3	77,5	73,9	89,8	76,9	74,0	89,6	78,3	75,0	87,8
8	88,3	85,2	96,7	87,7	86,9	99,6	89,3	87,8	98,8	88,8	86,8	97,6	88,5	87,4	98,5
9	98,5	96,8	98,9	98,2	97,8	100,1	97,8	98,8	100,0	98,7	99,2	99,7	97,8	99,5	99,6
10	100,6	99,7	100,1	99,8	100,1	100,0	99,9	100,0	101,0	99,7	99,8	100,0	99,6	99,9	100,1
11	100,4	100,3	101,0	99,9	100,2	100,2	100,2	100,3	100,5	99,9	100,3	100,2	100,0	100,0	99,9
12	100,8	100,5	100,7	101,5	101,5	100,1	101,0	100,5	100,0	100,7	100,6	100,5	100,2	100,3	100,2
13	101,0	101,1	100,9	100,2	101,3	100,8	100,8	101,0	99,9	101,0	101,1	100,2	100,5	100,4	101,2
14	100,0	100,7	100,1	100,0	101,0	101,3	100,2	100,4	100,1	100,4	100,5	100,0	100,6	100,3	100,4
15	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Пример 2 (исследование времени получения положительного по бисфенолу А результата анализа с использованием заявляемого устройства).

С использованием заявляемого устройства проводят анализ питьевой воды, содержащей бисфенол А в концентрации 0,1 мкг/мл и не содержащей нонилфенол по данным ИФА. 120 мкл образца вносят в пробирку. Заявляемое устройство (тест-полоску) погружают вертикально нижним концом мембраны для впитывания образца на глубину 0,5 см в образец и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 мин. Вынимают тест-полоску и помещают ее в паз выдвижной каретки детектирующего устройства для видеоцифровой регистрации. Результат анализа оценивают через 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15 мин с помощью программного обеспечения видеоцифрового детектора. Время анализа контролируют с помощью секундомера. Анализ проводят в пяти повторностях, используя тест-полоски пяти разных серий (полоски №№1-5).

Результаты анализа приведены в таблице 3. Интенсивности окрашивания К.З. и Т.З.1 нормированы на их средние значения, полученные через 15 мин после начала анализа. Интенсивности окрашивания Т.З.2 нормированы на ее среднее значение, полученное при отсутствии бисфенола А в пробе (см. Пример 1).

Из приведенных экспериментальных данных видно, что через 10 мин после начала анализа интенсивности окрашивания достигают 99,8-101,2% для контрольных зон (К.З.) и 99,6-100,3% - для тестовых зон связывания нонилфенола (Т.З.1) и практически не изменяются в течение следующих пяти минут. Интенсивности окрашивания тестовых зон связывания бисфенола А (Т.З.2) через 10 мин после начала анализа составляют от 0 до 0,1% и не изменяются в течение следующих пяти минут. Таким образом, время анализа воды, содержащей бисфенол А в концентрации 0,1 мкг/мл и не содержащей нонилфенол по данным ИФА, с использованием заявленного устройства составляет 10 мин.

Таблица 3

Динамика формирования окрашенных зон связывания при одновременном иммунохроматографическом определении нонилфенола и бисфенола А в питьевой воде (при отсутствии нонилфенола и концентрации бисфенола А, равной 0,1 мкг/мл по данным ИФА)

Время, мин	Интенсивность окрашивания зон связывания, %														
	Тест-полоска №1			Тест-полоска №2			Тест-полоска №3			Тест-полоска №4			Тест-полоска №5		
	Т.З.1	Т.З.2	К.З.	Т.З.1	Т.З.2	К.З.	Т.З.1	Т.З.2	К.З.	Т.З.1	Т.З.2	К.З.	Т.З.1	Т.З.2	К.З.
2	19,1	3,2	17,8	18,6	4,4	20,5	17,6	3,2	20,2	18,3	2,9	21,2	16,9	3,5	20,4
3	30,1	4,1	42,5	32,4	5,5	46,2	29,8	4,2	44,6	30,9	4,8	46,2	30,3	4,6	42,4
4	42,4	3,4	58,6	45,0	3,8	58,0	42,5	3,3	59,3	43,2	3,7	60,0	40,5	3,0	56,8
5	59,2	2,6	68,4	59,8	2,0	68,8	61,2	2,5	71,5	57,9	2,6	72,4	59,8	2,3	70,5
6	67,9	1,3	78,5	68,8	1,4	80,1	70,2	1,6	84,1	68,5	1,7	83,8	66,5	1,4	84,7
7	76,8	0,4	86,8	76,7	1,0	92,8	78,5	0,6	92,8	78,8	0,8	90,6	78,6	0,7	90,8
8	88,5	0,2	97,7	89,7	0,6	97,7	90,6	0,3	98,6	89,8	0,4	98,6	87,9	0,4	98,7
9	99,5	0,1	98,7	99,2	0,3	98,7	98,8	0,2	99,0	98,9	0,2	99,9	97,5	0,2	99,6
10	100,2	0	100,0	99,6	0,1	99,8	100,3	0,1	101,2	99,6	0	100,0	99,6	0,1	100,3
11	100,4	0	101,0	99,9	0	100,0	100,4	0	100,5	99,9	0	100,2	100,2	0	99,8
12	100,6	0	100,7	100,5	0	100,8	101,1	0	100,0	100,2	0	100,7	100,2	0	100,2
13	100,4	0	100,9	100,2	0	100,6	100,6	0	100,8	100,4	0	100,6	100,5	0	100,6
14	100,2	0	100,1	100,1	0	100,3	100,0	0	100,2	100,1	0	100,3	100,3	0	100,3
15	100,0	0	100,0	100,0	0	100,0	100,0	0	100,0	100,0	0	100,0	100,0	0	100,0

Пример 3 (исследование времени получения положительного по нонилфенолу результата анализа с использованием заявляемого устройства).

С использованием заявляемого устройства проводят анализ питьевой воды, содержащей нонилфенол в концентрации 1,0 мкг/мл и не содержащей бисфенол А по данным ИФА. 120 мкл образца вносят в пробирку. Заявляемое устройство (тест-полоску) погружают вертикально нижним концом мембраны для впитывания образца на глубину 0,5 см в образец и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 мин. Вынимают тест-полоску и помещают ее в паз выдвижной каретки детектирующего устройства для видеоцифровой регистрации. Результат анализа оценивают через 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15 мин с помощью программного обеспечения видеоцифрового детектора. Время анализа контролируют с помощью секундомера. Анализ проводят в пяти повторностях, используя тест-полоски пяти разных серий (полоски №№1-5).

Результаты анализа приведены в таблице 4. Интенсивности окрашивания К.З. и Т.З.2 нормированы на их средние значения, полученные через 15 мин после начала анализа. Интенсивности окрашивания Т.З.1 нормированы на ее среднее значение, полученное при отсутствии нонилфенола в пробе (см. Пример 1).

Из приведенных экспериментальных данных видно, что через 10 мин после начала анализа интенсивности окрашивания достигают 99,6-101,0% для контрольных зон (К.З.) и 99,2-99,8% - для тестовых зон связывания бисфенола А (Т.З.2) и практически не изменяются в течение следующих пяти минут. Интенсивности окрашивания тестовых зон связывания нонилфенола (Т.З.1) через 10 мин после начала анализа составляют от 0 до 0,2% и не изменяются в течение следующих пяти минут. Таким образом, время

анализа воды, содержащей нонилфенол в концентрации 1,0 мкг/мл и не содержащей бисфенол А по данным ИФА, с использованием заявленного устройства составляет 10 мин.

Таблица 4

Динамика формирования окрашенных зон связывания при одновременном иммунохроматографическом определении нонилфенола и бисфенола А в питьевой воде (при отсутствии бисфенола А и концентрации нонилфенола, равной 1,0 мкг/мл по данным ИФА)

Время, мин	Интенсивность окрашивания зон связывания, %														
	Тест-полоска №1			Тест-полоска №2			Тест-полоска №3			Тест-полоска №4			Тест-полоска №5		
	Т.З.1	Т.З.2	К.З.	Т.З.1	Т.З.2	К.З.	Т.З.1	Т.З.2	К.З.	Т.З.1	Т.З.2	К.З.	Т.З.1	Т.З.2	К.З.
2	3,9	9,8	17,5	4,4	11,2	20,5	5,2	10,3	20,8	4,7	11,4	21,4	3,5	9,6	19,4
3	2,5	26,8	42,0	3,5	30,0	46,2	3,7	31,4	42,6	3,8	28,8	46,4	3,6	26,6	40,3
4	1,7	39,5	58,3	2,8	41,2	58,3	2,3	41,7	59,5	2,2	38,5	61,0	2,8	37,5	57,8
5	0,9	56,8	65,4	1,5	57,9	68,8	1,7	54,7	71,3	1,0	53,6	73,4	1,3	54,6	70,4
6	0,6	65,7	76,5	0,9	68,5	80,3	1,2	66,0	85,7	0,6	67,8	85,8	0,6	65,7	84,4
7	0,3	76,5	87,5	0,4	77,9	92,8	0,5	75,9	94,8	0,3	74,3	92,6	0,4	75,8	90,3
8	0,2	88,2	97,9	0,3	85,9	97,6	0,3	86,8	98,8	0,2	87,7	98,7	0,3	88,4	98,5
9	0,1	98,8	99,5	0,1	96,8	98,7	0,2	98,6	99,4	0,1	99,5	99,8	0,1	98,2	99,6
10	0	99,7	100,0	0,1	99,2	99,6	0,2	99,5	101,0	0	99,8	100,1	0	99,3	100,0
11	0	100,2	101,1	0	100,0	100,1	0,1	100,3	100,5	0	100,1	100,4	0	100,0	99,9
12	0	100,3	100,8	0	100,5	100,4	0	100,7	100,3	0	100,6	100,7	0	100,1	100,0
13	0	100,5	100,5	0	101,0	100,6	0	101,2	100,6	0	101,2	100,5	0	100,4	100,3
14	0	100,1	100,1	0	101,0	100,3	0	100,4	100,2	0	100,6	100,2	0	100,2	100,3
15	0	100,0	100,0	0	100,0	100,0	0	100,0	100,0	0	100,0	100,0	0	100,0	100,0

Пример 4 (исследование времени получения положительных по нонилфенолу и бисфенолу А результатов анализа с использованием заявляемого устройства).

С использованием заявляемого устройства проводят анализ питьевой воды, содержащей по данным ИФА нонилфенол в концентрации 1,0 мкг/мл и бисфенол А в концентрации 0,1 мкг/мл. 120 мкл образца вносят в пробирку. Заявляемое устройство (тест-полоску) погружают вертикально нижним концом мембраны для впитывания образца на глубину 0,5 см в образец и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 мин. Вынимают тест-полоску и помещают ее в паз выдвижной каретки детектирующего устройства для видеоцифровой регистрации. Результат анализа оценивают через 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15 мин с помощью программного обеспечения видеоцифрового детектора. Время анализа контролируют с помощью секундомера. Анализ проводят в пяти повторностях, используя тест-полоски пяти разных серий (полоски №№1-5).

Результаты анализа приведены в таблице 5. Интенсивности окрашивания К.З. нормированы на их среднее значение, полученное через 15 мин после начала анализа. Интенсивности окрашивания Т.З.1 и Т.З.2 нормированы на их средние значения, полученные при отсутствии нонилфенола и бисфенола А в пробе (см. Пример 1).

Из приведенных экспериментальных данных видно, что через 10 мин после начала анализа интенсивности окрашивания контрольных зон (К.З.) достигают 99,5-101,3% и практически не изменяются в течение следующих пяти минут. Интенсивности окрашивания тестовых зон связывания нонилфенола (Т.З.1) и бисфенола А (Т.З.2) через 10 мин после начала анализа составляют от 0 до 0,2% и не изменяются в течение следующих пяти минут. Таким образом, время анализа воды, содержащей нонилфенол в концентрации 1,0 мкг/мл и бисфенол А в концентрации 0,1 мкг/мл по данным ИФА, с использованием заявленного устройства составляет 10 мин.

Таблица 5

Динамика формирования окрашенных зон связывания при одновременном иммунохроматографическом определении нонилфенола и бисфенола А в питьевой воде (при концентрации нонилфенола, равной 1,0 мкг/мл, и концентрации бисфенола А, равной 0,1 мкг/мл, и по данным ИФА)

Время, мин	Интенсивность окрашивания зон связывания, %														
	Тест-полоска №1			Тест-полоска №2			Тест-полоска №3			Тест-полоска №4			Тест-полоска №5		
	Т.З.1	Т.З.2	К.З.	Т.З.1	Т.З.2	К.З.	Т.З.1	Т.З.2	К.З.	Т.З.1	Т.З.2	К.З.	Т.З.1	Т.З.2	К.З.
2	5,2	3,0	17,8	5,4	4,0	21,0	4,2	3,0	23,8	4,7	2,9	21,7	5,5	3,5	20,4
3	3,8	4,5	42,3	4,5	5,4	44,2	3,2	5,2	46,6	4,8	5,8	46,8	4,6	4,7	40,8
4	2,4	3,4	58,5	2,8	3,3	57,3	2,3	4,3	62,5	3,2	3,9	61,5	2,8	3,3	54,6
5	1,6	2,7	66,4	1,1	2,1	68,5	1,7	3,5	71,8	2,0	2,4	73,0	1,3	2,6	68,9
6	0,7	1,3	76,3	0,6	1,5	80,2	1,2	2,6	85,2	1,6	1,5	85,5	0,6	1,7	80,2
7	0,2	0,6	87,5	0,4	1,1	92,2	0,6	1,6	95,8	0,7	0,8	92,3	0,4	1,2	91,3
8	0,1	0,3	98,1	0,3	0,4	98,6	0,5	0,9	98,6	0,4	0,6	98,6	0,2	0,8	98,2
9	0	0,2	99,6	0,1	0,2	99,0	0,3	0,6	99,7	0,2	0,3	99,8	0,1	0,4	99,4
10	0	0,1	100,0	0	0,1	99,5	0,1	0,2	101,3	0,1	0,2	100,2	0	0,2	99,7
11	0	0	100,1	0	0	100,1	0	0,1	101,5	0	0,1	100,4	0	0,1	99,9
12	0	0	100,8	0	0	100,4	0	0	101,3	0	0	100,8	0	0	100,1
13	0	0	100,5	0	0	100,6	0	0	100,4	0	0	100,6	0	0	100,3
14	0	0	100,1	0	0	100,3	0	0	100,2	0	0	100,3	0	0	100,3
15	0	0	100,0	0	0	100,0	0	0	100,0	0	0	100,0	0	0	100,0

Краткое описание чертежей

На рис. 1 изображена схема заявляемого устройства для иммунохроматографической экспрессной лабораторной и внелабораторной одновременной детекции токсичных контаминантов - поверхностно активных веществ нонилфенола и бисфенола А. 1 - твердая полистирольная основа рабочей нитроцеллюлозной мембраны; 2 - рабочая нитроцеллюлозная мембрана; 3 - конечная адсорбирующая мембрана для впитывания компонентов образца после прохождения реакции; 4 - стекловолоконная мембрана с нанесенной и высушенной смесью конъюгатов коллоидного золота с поликлональными кроличьими антителами, специфичными к нонилфенолу и поликлональными кроличьими антителами, специфичными к бисфенолу А; 5 - мембрана для впитывания и сепарации исследуемого образца; А - К.З. с нанесенными поликлональными козьими антителами, специфичными к иммуноглобулинам кролика; Б - Т.З.2 с нанесенным конъюгатом бисфенола А с белком-носителем СИТ; В - Т.З.1 с нанесенным конъюгатом нонилфенола с белком-носителем БСА.

На рис. 2 изображен алгоритм интерпретации результатов анализа. В том случае, когда на рабочей мембране тест-полоски появляются три красные линии (в К.З., Т.З.1 и Т.З.2), результат анализа считается отрицательным (рис. 2а). В том случае, когда на рабочей мембране тест-полоски появляются две красные линии (в К.З. и Т.З.1), результат анализа считается положительным по бисфенолу А и отрицательным по нонилфенолу (рис. 2б). В том случае, когда на рабочей мембране тест-полоски появляются две красные линии (в К.З. и Т.З.2), результат анализа считается положительным по нонилфенолу и отрицательным по бисфенолу А (рис. 2в). В том случае, когда на рабочей мембране тест-полоски появляется одна красная линия (в К.З.), результат анализа считается положительным по нонилфенолу и бисфенолу А (рис. 2г). В том случае, когда на рабочей мембране тест-полоски не образуется ни одной окрашенной линии или образуются только тестовые линии (одна или две), результат анализа считается недействительным (рис. 2д).

(57) Формула полезной модели

Устройство для иммунохроматографической экспрессной лабораторной и внелабораторной одновременной детекции токсичных контаминантов - поверхностно активных веществ нонилфенола и бисфенола А, содержащее тест-полоску, состоящую из полистироловой подложки, на которую наклеены нитроцеллюлозная мембрана с нанесенными и высушенными иммунореагентами, стекловолоконная мембрана с

нанесенными и высушенными иммунореагентами, мембрана для впитывания и сепарации исследуемого образца и конечная адсорбирующая мембрана для впитывания компонентов образца после прохождения реакции, на нитроцеллюлозную мембрану нанесены контрольная и две тестовые зоны, отличающиеся тем, что в контрольную 5 зону нанесены поликлональные козьи антитела, специфичные к иммуноглобулинам кролика, в первую тестовую зону нанесен конъюгат нонилфенола с белком-носителем бычьим сывороточным альбумином и во вторую тестовую зону нанесен конъюгат бисфенола А с белком-носителем соевым ингибитором трипсина, на стекловолоконную мембрану нанесена смесь конъюгатов поликлональных кроличьих антител, специфичных 10 к нонилфенолу, с коллоидным золотом и поликлональных кроличьих антител, специфичных к бисфенолу А, с коллоидным золотом.

15

20

25

30

35

40

45

1

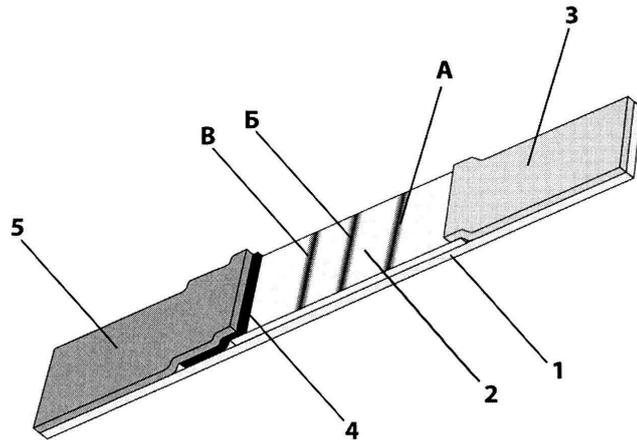


Рис. 1

2

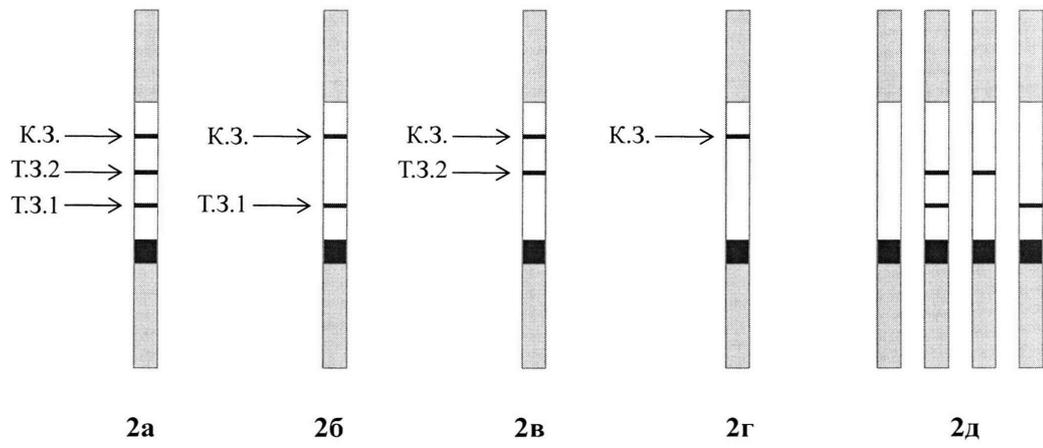


Рис. 2