

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011154163/10, 30.12.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.12.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 30.12.2011

(43) Дата публикации заявки: 10.07.2013 Бюл. № 19

(45) Опубликовано: 27.10.2013 Бюл. № 30

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: POSTHUMA-TRUMPIE G.A. ET AL, Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey, Anal Bioanal Chem, 2009, v.393, no.2, p.569-582. ДРЫГИН Ю.Ф. И ДР. Высокочувствительный иммунохроматографический экспресс-метод определения зараженности растений вирусом табачной мозаики. - Биохимия, 2009, т.74, (см. прод.)

Адрес для переписки:

119071, Москва, Ленинский пр-кт, 33, стр.5,
ООО "РЭД", заместителю генерального
директора А.Е. Урусову

(72) Автор(ы):

Урусов Александр Евгеньевич (RU),
Жердев Анатолий Виталиевич (RU),
Дзантиев Борис Борисович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной
ответственностью "РЭД" (RU)

(54) СПОСОБ СНИЖЕНИЯ ПРЕДЕЛА ОБНАРУЖЕНИЯ
ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ СОДЕРЖАНИЯ
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к способу снижения предела обнаружения иммунохроматографических методов контроля содержания низкомолекулярных соединений. Способ включает проведение в ходе движения реагентов вдоль иммунохроматографической тест-полоски конкурентного взаимодействия специфических антител с определяемым соединением (антигеном) в пробе и конъюгатом антиген-белок, иммобилизованным на поверхности рабочей мембраны тест-полоски. Выявляют

окрашенные комплексы в результате иммобилизации коллоидного маркера в составе комплекса с конъюгатом антиген-белок. При этом первая стадия представляет собой конкурентное взаимодействие свободных специфических антител с антигеном в пробе и с иммобилизованным на поверхности рабочей мембраны конъюгатом антиген-белок. Вторая стадия представляет собой взаимодействие образовавшихся комплексов специфических антител и конъюгата антиген-белок с антивидовыми антителами, меченными коллоидным маркером. Предложенное изобретение позволяет уменьшить количество

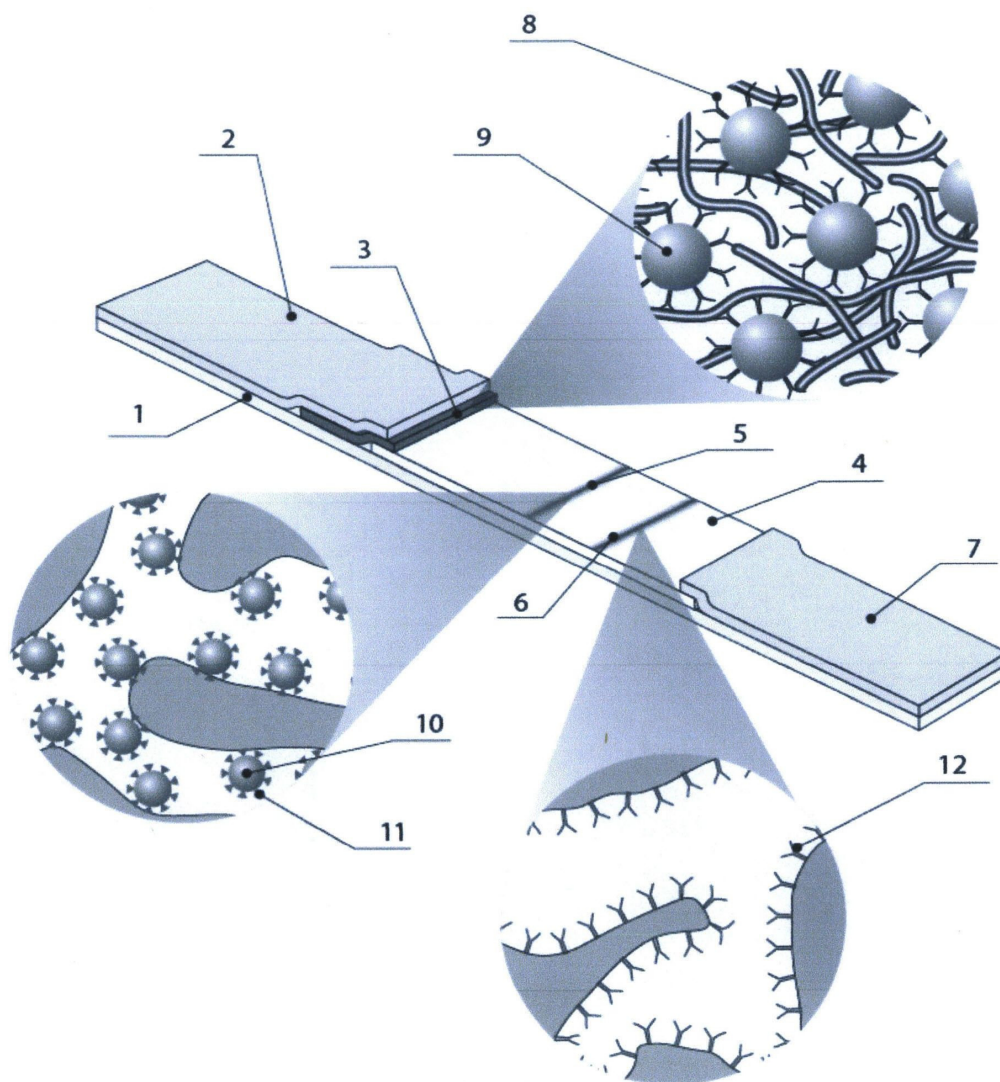


Рис. 1.

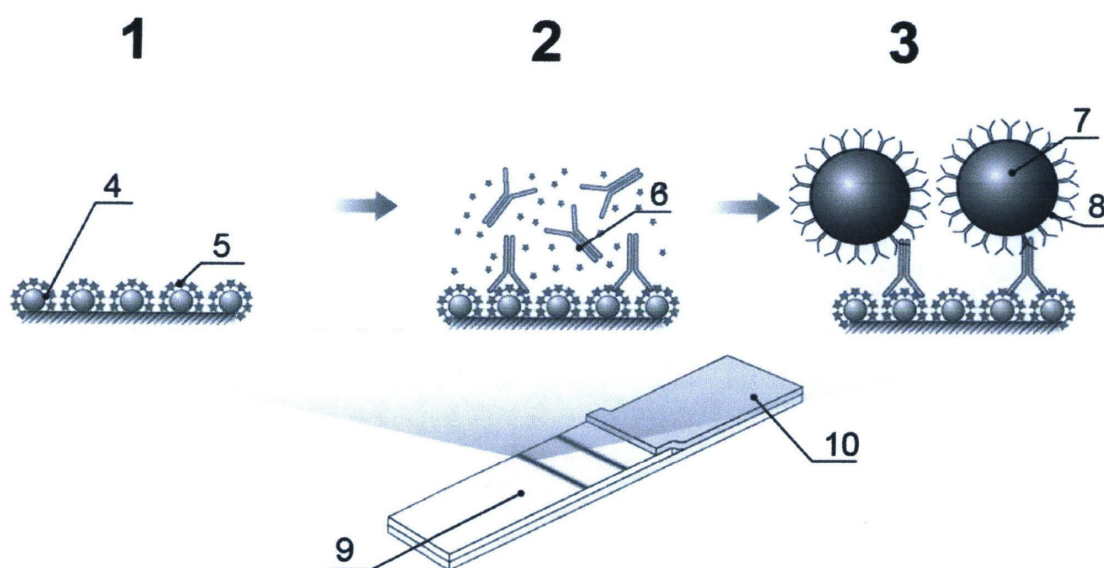


Рис. 2

(56) (продолжение):

№9 с.1212-1220. CHOI D.H. ET AL., A dual gold nanoparticle conjugate-based lateral flow assay (LFA) method for the analysis of troponin I, 2010, Biosensors and Bioelectronics, v.25, no.8, p.1999-2002.

RU 2 4 9 7 1 2 6 C 2

RU 2 4 9 7 1 2 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)*G01N 33/52* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2011154163/10, 30.12.2011**(24) Effective date for property rights:
30.12.2011

Priority:

(22) Date of filing: **30.12.2011**(43) Application published: **10.07.2013 Bull. 19**(45) Date of publication: **27.10.2013 Bull. 30**

Mail address:

**119071, Moskva, Leninskij pr-kt, 33, str.5, OOO
"REhD", zamestitel'ju general'nogo direktora A.E.
Urusovu**

(72) Inventor(s):

**Urusov Aleksandr Evgen'evich (RU),
Zherdev Anatolij Vitalievich (RU),
Dzantiev Boris Borisovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju
"REhD" (RU)**

(54) METHOD TO REDUCE LIMIT OF DETECTION OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC METHODS TO CONTROL CONTENT OF LOW-MOLECULAR COMPOUNDS

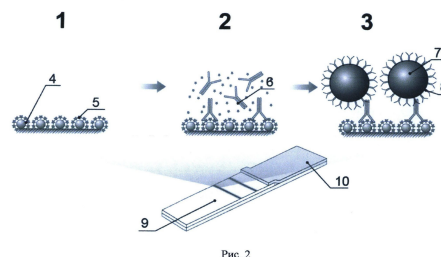
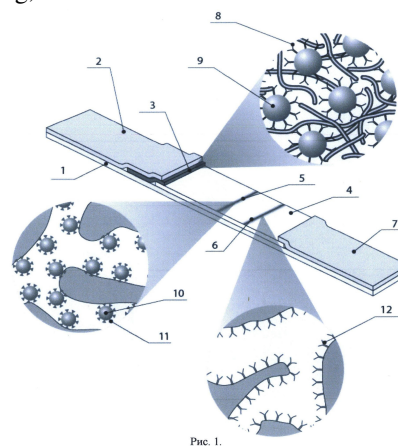
(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: method includes performance of competitive interaction of specific antibodies in process of reagent motion along an immunochromatographic dipstick with a determined compound (antigene) in the sample and conjugate antigen-protein immobilised on the surface of the working membrane in the dipstick. The coloured complexes are detected as a result of immobilisation of a colloid marker within the complex with the antigen-protein conjugate. At the same time the first stage is competitive interaction of free specific antibodies with the antigen in the sample and with the antigen-protein conjugate immobilised on the surface of the working membrane. The second stage is interaction of produced complexes of specific antibodies and the antigen-protein conjugate with antispecies antibodies marked with the colloid marker.

EFFECT: invention makes it possible to reduce quantity of specific antibodies at the stage of competitive interaction and thus to reduce the detection limit.

5 dwg, 1 ex



Описание изобретения

Иммунохроматографический анализ нашел широкое распространение в различных областях медицины (тест-системы на маркеры заболеваний), контроля качества пищевых и кормовых продуктов (тест-системы на микотоксины, антибиотики), в
 5 решении ряда социальных проблем (определение наркотических соединений). Данный подход используется для анализа антигенов различной природы. В зависимости от определяемого соединения осуществляются различные схемы проведения взаимодействия иммунореагентов (G.A - Posthuma-Trumpie, J. Korf, A. van Amerongen, Anal Bioanal Chem, 2009,393,2,569-582; R.C. Wong, H.Y. Tee, Lateral flow immunoassay, NY,
 10 Springer, 2009, p.1-19). Если анализируются низкомолекулярные соединения, к которым относится множество практически значимых веществ, таких как микотоксины, антибиотики, пестициды и др., следует исходить из моновалентной природы взаимодействия этих веществ с антителами. Поэтому в таких случаях используется конкурентная схема анализа, в которой свободный и иммобилизованный антигены конкурируют за центры связывания меченных маркером антител.

Рассмотрим типичный конкурентный иммунохроматографический тест (прототип) (R.C. Wong, H.Y. Tee, Lateral How immunoassay, NY, Springer, 2009, p.1-19). Тест-полоска
 20 представляет собой пластиковую подложку, на которой зафиксированы рабочая мембрана (обычно нитроцеллюлозная), мембрана для конъюгата коллоидного золота, адсорбирующая мембрана для образца и конечная впитывающая мембрана (Рис.1).

При изготовлении такой тест-полоски на поверхность рабочей мембраны наносятся тестовые и контрольные зоны с иммобилизованным конъюгатом антигена с белком и
 25 антивидовыми антителами соответственно. Отдельно готовится мембрана под конъюгат - на нее наносятся раствор конъюгата коллоидного золота со специфическими антителами, различные стабилизаторы и консерванты. Мембрана под образец пропитывается раствором детергентов различной природы для обеспечения более эффективного тока жидкости вдоль рабочей мембраны. Все необходимые для
 30 образования сигнала взаимодействия инициируется погружением мембраны под образец в раствор пробы.

Проба, поступая на тест-полоску, взаимодействует с мечеными антителами, после чего вместе с ними двигается по рабочей мембране, доходя до зоны с
 35 иммобилизованным конъюгатом антигена с белком. Если в образце определяемое соединение отсутствовало, меченые антитела связываются с иммобилизованным конъюгатом, давая в этой зоне окрашенную линию. В случае присутствия антигена в пробе центры связывания антител заняты, и антитела проходят дальше, не давая окраски в аналитической зоне. Таким образом, образование и интенсивность
 40 окрашенной полосы в аналитической зоне свидетельствуют о наличии и концентрации антигена в пробе.

Для большинства задач необходима реализация тест-системы с максимально низким пределом обнаружения. Данное требование реализуется посредством
 45 максимального снижения количества специфических антител. Однако при достижении этого параметра у конкурентного иммунохроматографического теста есть ограничения. Чем ниже концентрация специфических антител, тем меньшее количество антигена в пробе будет требоваться для предотвращения связывания с фазой, и,
 50 следовательно, будет ниже предел обнаружения. Однако, так как специфические антитела связаны с окрашенным маркером, то снижение их концентрации повлечет за собой снижение интенсивности сигнала. Таким образом, чем лучше предел обнаружения системы, тем ниже интенсивность сигнала и, как следствие, хуже

воспроизводимость и достоверность результата. Помимо этого, при получении конъюгата специфических антител с коллоидным маркером на поверхности коллоида иммобилизуется значительное количество антител - до 100 и более (Л.А. Дыкман, В.А. Богатырев, С.Ю. Щеголев, Н.Г. Хлебцов. Золотые наночастицы. Синтез, свойства, биомедицинское применение. 2008, Москва, Наука). Высокая концентрация антител увеличивает порог для конкурентного вытеснения, тогда как для связывания с иммобилизованным конъюгатом антиген-белок достаточно одной молекулы антител. В то же время при работе со специально полученными конъюгатами коллоидного маркера с малым числом молекул антител маркер становится стерическим препятствием для взаимодействия иммобилизованного на коллоиде антитела с иммунореагентом на поверхности мембраны.

Нами было предложено разделить стадии конкурентного взаимодействия и введения окрашенной метки. Это позволяет значительно снизить количество антител на стадии специфического взаимодействия, что, в свою очередь, приводит к повышению чувствительности системы и обеспечению достаточной интенсивности окраски в отсутствие конкурента.

Рассмотрим предлагаемую процедуру анализа. Через рабочую мембрану последовательно пропускаются предварительно совместно проинкубированная смесь свободных специфических антител и пробы. В случае наличия антигена в пробе центры связывания специфических антител оказываются заняты антигеном и взаимодействия в аналитической зоне рабочей мембраны не происходит. В противном случае свободные центры связывания антител связываются с иммобилизованным конъюгатом антиген-белок в аналитической зоне. После отмывки буферным раствором через тест-полоску пропускается раствор антивидовых антител, меченных коллоидным золотом. В результате в аналитической зоне образуются специфические комплексы, которые дают окрашенную полосу.

Для реализации такого метода тест-полоска изготавливалась отличным от прототипа способом. В ее комплектацию не входили мембрана под образец и мембрана под конъюгат, а вместо них использовались растворы специфических антител и конъюгата коллоидного маркера с антивидовыми антителами.

Описанная выше схема анализа, в которой детектируемое визуально или приборно окрашивание обеспечивается за счет последовательного взаимодействия а) свободных специфических антител с антигеном в пробе и конъюгатом антиген-белок и б) образовавшихся комплексов специфических антител и конъюгата антиген-белок с антивидовыми антителами, мечеными коллоидным маркером, представлена на Рис.2.

Данное методическое решение обладает существенными преимуществами по сравнению с известными разработками иммунохроматографических тестов, в которых также реализуется усиление сигнала.

Такой альтернативой является система усиления сигнала в иммунохроматографии с использованием серебра. Принцип данной системы заключается в восстановлении иона серебра из раствора нитрата серебра под действием гидрохинона (Дрыгин Ю.Ф., Блинцов А.Н., Осипов А.Л., Григоренко В.Г., Андреева И.П., Усков А.И., Варицев Ю.А., Анисимов Б.В., Новиков В.К., Атабеков И.Г. Биохимия. 2009. Т. 74. №9. С.1212-1220). При этом происходит формирование серебряной оболочки вокруг золотой наночастицы, что значительно увеличивает интенсивность окрашивания в зоне связывания и, благодаря этому, снижает предел обнаружения (Дрыгин Ю.Ф., Блинцов А.Н., Осипов А.П., Григоренко В.Г., Андреева И.П., Усков А.И., Варицев Ю.А., Анисимов Б.В., Новиков В.К., Атабеков И.Г. Биохимия. 2009. Т. 74. №9. С.1212-1220).

Недостатками данного подхода являются высокий фоновый сигнал при анализе в сложных матриксах, а также низкая стабильность усиливающего реагента.

Вторым аналогом является схема использования двух конъюгатов золота разного размера, описанная в работе (D.H. Choi, S.K. Lee, Y.K. Oh, B.W. Bae, S.D. Lee, S. Kirn, Y.B. Shin and M.-G. Kirn, Biosensors and Bioelectronics, 2010, 25, 8, 1999-2002). В данном случае используются две последовательно установленные мембраны под конъюгат, на первой из них иммобилизованы антитела против бычьего сывороточного альбумина, на второй - специфические антител против исследуемого антигена. Используются коллоиды разного размера, что позволяет, с одной стороны, разделить их в процессе движения по мембране, препятствуя смешиванию до достижения контрольной и аналитических зон, а с другой - усилить аналитический сигнал. Однако стабильность такой тест-системы невысока, т.к. как реагенты должны смываться с мембраны без задержки.

Эффективность предложенного в патенте подхода подтверждается представленным ниже примером.

Пример 1. Определение афлатоксина В1 иммунохроматографическим методом. В аналитический набор, помимо тест-полоски, входят три дополнительных реагента - промывочный раствор (фосфатный буфер с детергентом), конъюгат коллоидного золота с антивидовыми антителами (в концентрации 1 единица оптической плотности при 520 нм) и раствор специфических антител против афлатоксина В1 (2,5 нг на один тест при ширине тест-полоски 3,5 мм). Сама же тест-полоска лишена дополнительных мембран и представляет из себя расположенные на подложке рабочую мембрану с иммобилизованными реагентами аналитической и контрольной зоны (конъюгатом афлатоксина В1 с бычьим сывороточным альбумином и иммуноглобулинами мыши соответственно) и соприкасающуюся с ней впитывающую мембрану. Анализ выглядит следующим образом:

- Анализируемая проба смешивается с раствором специфических антител и инкубируется в течение 5 минут. За это время происходит взаимодействие антигена в пробе с центрами связывания антител.

- В полученную смесь опускается тест-полоска нижней частью рабочей мембраны на высоту около 2 мм. После инкубации в течение 5 минут фронт жидкости доходит до аналитической зоны, где антитела, в зависимости от наличия антигена в пробе, взаимодействуют с иммобилизованным конъюгатом афлатоксин В1-бычий сывороточный альбумин.

- Опуская нижний край рабочей мембраны, тест-полоску помещают в промывочный раствор (фосфатно-солевой буфер с детергентом) на 5 минут для проведения промывки рабочей мембраны от несвязавшихся антител.

- Для визуализации результатов анализа через полосу пропускается раствор конъюгата коллоидного золота с антивидовыми антителами.

Для сравнения были изготовлены тест-полоски по традиционной методике. При этом использовались те же специфические антитела (в составе конъюгата с коллоидным золотом на один тест тратится 100 нг антител) и конъюгированный с бычьим сывороточным альбумином микотоксин. Для проведения анализа готовые тест-полоски погружали в раствор анализируемых проб с различной концентрацией афлатоксина В1 и инкубировали в течение 10 минут.

Для количественной оценки связывания маркера в обоих случаях тест-полоски сканировали на сканере Lide 90 (Canon) с разрешением 600 dpi, без автоматического контрастирования и цветокоррекции. На полученных цифровых изображениях

выделяли прямоугольную область, захватывающую не менее чем 90% окрашенной зоны, и с помощью программы Total Lab (Nonlinear Dynamics, Великобритания) получали численное значение интенсивности окрашивания аналитической зоны.

Условия проведения анализа были подобраны так, чтобы амплитуды сигнала для
5 обеих схем были близки, обеспечивая одинаковую степень достоверности визуальной регистрации результатов анализа и одинаковую точность приборной регистрации.

Изображения тест-полосок после тестирования проб с разным содержанием афлатоксина В1 представлены на рис.3 (предлагаемая схема проведения анализа) и
10 Рис.4 (традиционная схема), а результаты цифровой регистрации - на рис.5. Как видно из рисунков, предел обнаружения при использовании схемы без усиления составляет 1 нг/мл для визуального определения и 80 нг/мл при использовании приборной обработки данных, в то время как для предложенной схемы данные значения составляют 0,1 нг/мл и 20 пг/мл соответственно. Выигрыш в величине предела
15 обнаружения - 10 раз для визуальной и 4 раза для приборной детекции.

На рис.1 представлена схема организации тест-полоски для проведения конкурентного иммунохроматографического анализа (А.Е. Урусов, С.Н. Костенко, П.Г. Свешников, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев. Журнал аналитической химии. 2011, Том 66, №8, С.884-890). 1 - пластиковая основа, 2 - мембрана адсорбирующая образец,
20 3 - подложка под конъюгат, 4 - рабочая мембрана, 5 - аналитическая зона, 6 - контрольная зона, 7 - конечная адсорбирующая мембрана, 8 - специфические антитела, 9 - частицы коллоидного золота, 10 - белок-носитель, 11 - антиген, 12 - антивидовые антитела. На рис.2 представлена схема иммунохроматографического анализа с усилением аналитического сигнала конъюгатом коллоидное золото -
25 антивидовые антитела. 1 - иммобилизация конъюгата микотоксин-БСА, 2 - конкурентное взаимодействие, 3 - усиление сигнала, 4 - БСА, 5 - микотоксин, 6 - специфические антитела, 7 - коллоидное золото, 8 - антивидовые антитела, 9 - рабочая
30 мембрана, 10 - впитывающая мембрана. На рис.3 приведен внешний вид тест-полосок после проведения определения афлатоксина В1 с усилением коллоидным золотом. Стрелкой отмечена контрольная зона. На рис.4 приведен внешний вид тест-полосок после проведения определения афлатоксина В1 при использовании традиционной
35 схемы анализа. Стрелкой отмечена контрольная зона. С - концентрация афлатоксина В1, I - амплитуда сигнала. На рис.5 представлены калибровочные кривые определения афлатоксина В1 в предлагаемой и традиционной иммунохроматографических системах, полученные на основании экспериментальных данных рис.3 и 4, соответственно. 1 - предлагаемая система, 2 - традиционная система. С - концентрация
40 афлатоксина В1, I - амплитуда сигнала.

Формула изобретения

Способ снижения предела обнаружения иммунохроматографических методов контроля содержания низкомолекулярных соединений, основанный на проведении в
45 ходе движения реагентов вдоль иммунохроматографической тест-полоски конкурентного взаимодействия специфических антител с определяемым соединением (антигеном) в пробе и конъюгатом антиген-белок, иммобилизованным на поверхности рабочей мембраны тест-полоски, и выявления окрашенных комплексов в
50 результате иммобилизации коллоидного маркера в составе комплекса с конъюгатом антиген-белок, отличающийся тем, что детектируемое визуально или приборно окрашивание обеспечивается за счет последовательного взаимодействия а) свободных специфических антител с антигеном в пробе и конъюгатом антиген-белок и б)

образовавшихся комплексов специфических антител и конъюгата антиген-белок с антивидовыми антителами, меченными коллоидным маркером.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

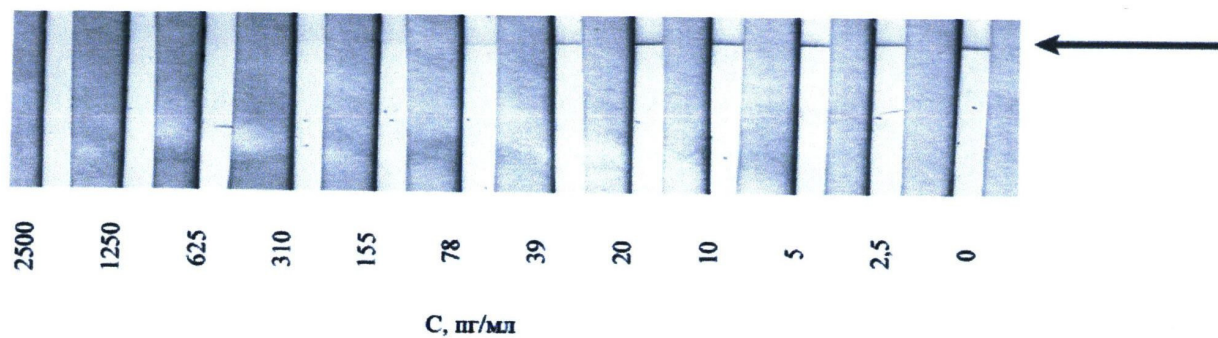


Рис. 3

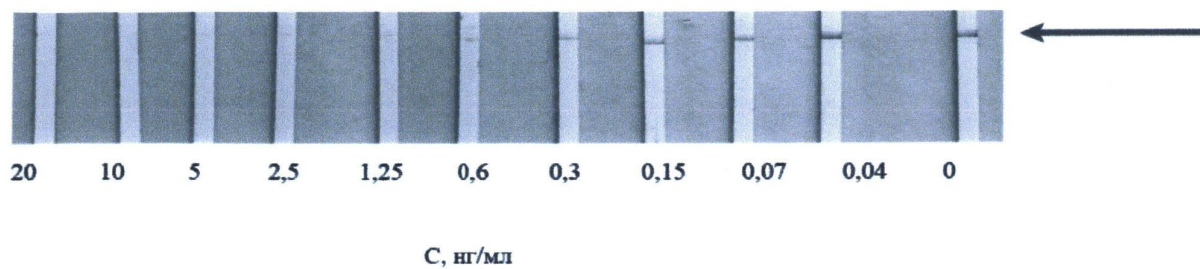


Рис. 4

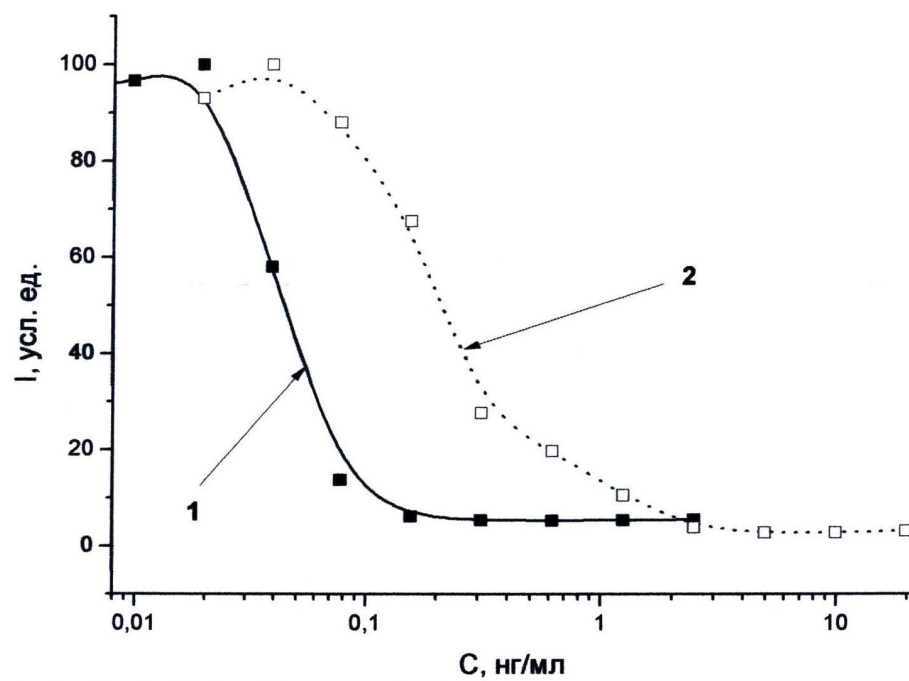


Рис. 5