



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 038 600** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **G 01 N 33/543**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

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

(21), (22) Заявка: 5033495/13, 23.03.1992
(30) Приоритет: 31.07.1990 SU 4855423/14
(46) Дата публикации: 27.06.1995
(56) Ссылки: Pappas M.G. et al. Trans Roy. Soc. Med. Hyg, v.79, p.136, 1985.

(71) Заявитель:
Институт иммунобиотехнологии
(72) Изобретатель: Осипов А.П.,
Горовиц Б.М., Горовиц Е.Л., Дзантиев Б.Б.
(73) Патентообладатель:
Институт иммунобиотехнологии

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

(57) Реферат:
Использование: биотехнология. Сущность:
мембрана состоит из подложки из
ацетатцеллюлозы или из нитроцеллюлозы, на

которой адсорбирован поликатион, например
поли-4-винил-пиридинийбромид или
полиэтиленимин.

RU 2 038 600 C1

RU 2 038 600 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 038 600** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **G 01 N 33/543**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 5033495/13, 23.03.1992

(30) Priority: 31.07.1990 SU 4855423/14

(46) Date of publication: 27.06.1995

(71) Applicant:
Institut immunobiotekhnologii

(72) Inventor: Osipov A.P.,
Gorovits B.M., Gorovits E.L., Dzantiev B.B.

(73) Proprietor:
Institut immunobiotekhnologii

(54) **MEMBRANE FOR SEPARATING COMPONENTS OF IMMUNOLOGIC REACTION**

(57) Abstract:

FIELD: biological engineering. SUBSTANCE:
membrane has a sublayer made of acetate
cellulose or nitrocellulose over which a

polycation is absorbed, for instance,
poly-4-vinyl-pyridine bromide or
polyethylene imine. EFFECT: enhanced
effectiveness of separation process.

Изобретение относится к биотехнологии, а именно 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.

Важным пунктом при проведении процедуры ИФА является стадия отделения меченых антител (антигена), не связанных в иммунокомплекс, от меченых антител (антигенов), связанных в иммунокомплекс. В процедурах ИФА гетерогенного типа для этого проводят иммобилизацию антител (антигена) на твердых нерастворимых носителях. Это, однако, приводит к значительному увеличению времени анализа.

Также известны способы разделения компонентов иммунохимической реакции с использованием фильтрации на пористых нитроцеллюлозных мембранах, что упрощает процедуру и исключает необходимость иммобилизации одного из компонентов в том случае, когда размер анализируемого соединения превышает диаметр пор.

В качестве прототипа предлагается микропланшет с фильтрующим дном, изготовленным из нитроцеллюлозной мембраны (диаметр пор 0,54 мкм), используемый в методе определения висцерального лейшманиоза человека [1]. Образец паразитов инкубировали с формалином, наносили на микропланшеты, далее инкубировали с анализируемой пробой. Разделение в данном случае осуществлялось вследствие большого размера антигена.

Данная мембрана не позволяет осуществлять разделения компонентов в нижеописанном методе.

Известен способ проведения иммуноферментного анализа биологически активных веществ, осуществляемый следующим образом. К исследуемому образцу добавляют антитела, ковалентно иммобилизованные на водорастворимом поликатионе или полианионе, например полиметакриловой кислоте (ПМАК), и конъюгат антител (антигенов), меченых ферментом, при этом в растворе одновременно протекают реакции: связывания иммобилизованных антител с антигеном и мечеными антигенами (антителами). После образования растворимых иммунокомплексов раствор приводят в контакт с нерастворимым положительно заряженным носителем (полимером), вследствие чего компоненты, связанные с иммобилизованными антителами, адсорбируются на носителе в результате кооперативных ионных взаимодействий между молекулами отрицательно заряженного полианиона, содержащего иммунокомплекс антигена с мечеными ферментом антителами, и положительно заряженным носителем. После промывания носителя с целью удаления неспецифически связавшегося конъюгата антител с ферментом на него наносят раствор субстрата фермента и количественно измеряют концентрацию продукта, которая

пропорциональна концентрации определяемого антигена и служит характеристикой его содержания в исследуемом растворе. Концентрацию антигена в исследуемом образце определяют с помощью калибровочного графика, полученного при использовании стандартных препаратов.

Для разделения компонентов иммунологической реакции, в результате которой образуется отрицательно заряженный комплекс полианиона и антигена, связанного с антителом, меченым ферментом, предлагается использовать мембрану, которая представляет собой подложку из ацетат- или нитроцеллюлозы, на которой адсорбирован поликатион. В качестве поликатиона можно использовать поли-4-винил-пиридинийбромид (ПВП), хитозан, полиэтиленмин и др.

Если в качестве носителя используют положительно заряженную мембрану, а продукт ферментативной реакции является нерастворимым и удерживается на мембране, то детекцию можно проводить визуально.

Заряженные мембраны получают следующим образом. Нитро- или ацетатцеллюлозные фильтры помещают в раствор поликатиона и инкубируют в нем в течение 1-2 ч при комнатной температуре.

Пример 1. Анализ иммуноглобулинов G (IgG) человека.

В качестве антител использовали γ -глобулиновую фракцию кроличьей антисыворотки против IgG человека, дополнительно очищенную ионообменной хроматографией на DEAE-Sephacel.

Иммунсорбенты на основе ПМАК получали ковалентным связыванием антигенов или антител с ПМАК, используя в качестве сшивающих агентов водорастворимые карбодиимиды (1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)-карбодиимид гидрохлорид или 1-циклогексил-3-(2-морфолино-4-этил)-карбодиимид *p*-толуол-фосфат) совместно с *N*-оксисукцинимидом.

В качестве антигена использовали коммерческий препарат IgG человека.

В качестве фермента использовали пероксидазу хрена с $RZ=3,0$ (ПХ).

Конъюгат IgG человека с пероксидазой (ПХ/ЕС1.11.1.7) получали методом окисления углеводного компонента фермента периодатом натрия.

Нерастворимый заряженный полимер готовили следующим образом.

Нитроцеллюлозные фильтры производства фирмы "Синпор" инкубировали в растворе $1 \cdot 10^{-7}$ М поли-4-винил-пиридинийбромид с молекулярной массой 80000 в калий-фосфатном буфере pH 7,2 (КФБ) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем фильтры блокировали в 3%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина в КФБ в течение 1 ч при комнатной температуре.

В серию инкубационных пробирок, содержащих IgG человека в концентрациях $1 \cdot 10^{-9}$, $5 \cdot 10^{-10}$, $2 \cdot 10^{-10}$, $1 \cdot 10^{-10}$, $5 \cdot 10^{-11}$, $2 \cdot 10^{-11}$ М в 0,01 калий-фосфатном буфере pH 7,2, 0,05% Твин-20, 0,15M NaCl, добавляли 0,1 мл раствора конъюгата IgG-пероксидаза (1

$\cdot 10^{-11}$ М). Затем в пробирку добавляли 0,1 мл раствора иммуносорбента ($1 \cdot 10^{-10}$ М), инкубировали 5 мин при комнатной температуре.

Разделяли компоненты раствора пропуская его через нитроцеллюлозный фильтр с иммобилизованным ПВП. Детекцию ферментной метки на фильтре вели инкубацией его в растворе субстратов, содержащем 3,3'-диаминобензидин (0,5 мг/мл), перекись водорода $1 \cdot 10^{-3}$ М и добавки солей кобальта (0,2%).

Пересчет интенсивности окрашивания фильтра в концентрацию измеряемого IgG производили по калибровочному графику, полученному со стандартными препаратами IgG. Чувствительность метода составила $5 \cdot 10^{-11}$ М.

П р и м е р 2. Анализ HBS-антигена.

В качестве антител использовали γ -глобулиновую фракцию кроличьей антисыворотки против HBS-антигена.

Иммуносорбенты на основе ПМАК получали как в примере 1.

В качестве антигена использовали коммерческий препарат HBS-антигена.

В качестве фермента использовали пероксидазу хрена с RZ=3,0 (ПХ).

Конъюгат IgG, специфичных к HBS-антигену, с пероксидазой (ПХ/ЕС1.11.1.7) получали методом окисления углеводного компонента фермента периодатом натрия.

Нерастворимый заряженный полимер готовили следующим образом.

Ацетатцеллюлозные мембраны производства фирмы "Полимерсинтез" (Владимир) инкубировали в $1 \cdot 10^{-7}$ М растворе полиэтиленimina с молекулярной массой 50000 в калий-фосфатном буфере pH 7,2 (КФБ) в течение 2 ч при комнатной

температуре. Затем фильтры блокировали в 3%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина в КФБ в течение 1 ч при комнатной температуре.

5 В серию инкубационных пробирок, содержащих HBS-антиген в концентрациях 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 и 1,25 нг/мл в 0,01 калий-фосфатном буфере pH 7,2, 0,05% Твин-20, 0,15М NaCl, добавляли 0,1 мл раствора конъюгата IgG-пероксидаза 10 ($1 \cdot 10^{-11}$ М). Затем в пробирку добавляли 0,1 мл раствора иммуносорбента ($1 \cdot 10^{-10}$ М) и инкубировали 5 мин при комнатной температуре.

15 Разделение компонентов раствора проводили пропуская его через нитроцеллюлозный фильтр с иммобилизованным поликатионом. Детекцию ферментной метки на фильтре вели инкубацией его в растворе субстратов, содержащем 3,3'-диаминобензидин (0,5 мг/мл), перекись водорода $1 \cdot 10^{-3}$ М и добавки 20 солей кобальта (0,2%).

Пересчет интенсивности окрашивания фильтра в концентрацию измеряемого HBS-антигена производили по 25 калибровочному графику, полученному со стандартными препаратами HBS. Чувствительность метода составляет 2,5 нг/мл.

30 Таким образом, предлагаемая мембрана позволяет значительно упростить и ускорить процесс иммуноферментного анализа.

Формула изобретения:

35 МЕМБРАНА ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ, представляющая собой целлюлозную основу, отличающаяся тем, что в качестве целлюлозной основы используют 40 ацетат- или нитроцеллюлозу, на которой адсорбирован поликатион.

40

45

50

55

60