



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 006 038** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁵ **G 01 N 33/535**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

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

(21), (22) Заявка: 4937595/13, 18.04.1991

(46) Дата публикации: 15.01.1994

(71) Заявитель:

Институт биофизики клетки РАН,
Институт теоретической и экспериментальной
биофизики РАН

(72) Изобретатель: Шильников Г.В.,

Приев А.И., Сарвазян А.П., Дзантиев Б.Б.

(73) Патентообладатель:

Институт биофизики клетки РАН

(54) СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГАПТЕНОВ

(57) Реферат:

Использование: биотехнология,
иммунология, функциональная диагностика.
Сущность изобретения: количественное
определение гаптенов с помощью
конкурентного иммуноферментного анализа в

акустической камере и регистрации
изменения начальной скорости
распространения акустических колебаний в
реакционной среде. Нижний предел
обнаружения гаптенов составляет 5×10^{-8} М.

RU 2 006 038 C1

RU 2 006 038 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 006 038** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁵ **G 01 N 33/535**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 4937595/13, 18.04.1991

(46) Date of publication: 15.01.1994

(71) Applicant:
INSTITUT BIOFIZIKI KLETKI RAN,
INSTITUT TEORETICHESKOJ I
EHKSPERIMENTAL'NOJ BIOFIZIKI RAN

(72) Inventor: SHIL'NIKOV G.V.,
PRIEV A.I., SARVAZJAN A.P., DZANTIEV B.B.

(73) Proprietor:
INSTITUT BIOFIZIKI KLETKI RAN

(54) **METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF HAPTENS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, immunology.
SUBSTANCE: method involves quantitative
determination of haptens by competitive
immunoenzyme assay in acoustic chamber,

recording of initial rate of acoustic
oscillation propagation change in reaction
medium. Lower limit of haptens detection is 5×10^{-8} M. EFFECT: enhanced sensitivity of
method.

Изобретение относится к иммунологии и может найти применение в биотехнологии и медицине при количественном определении гаптенов.

Известен способ количественного определения антигенов или гаптенов с помощью пьезоэлектрического датчика. Способ включает иммобилизацию соответствующих антител на поверхности пьезоэлектрического кристалла, инкубацию иммобилизованных антител с раствором исследуемого антигена или гаптена, возбуждение резонансной частоты в пьезоэлектрическом иммуносенсоре и регистрацию изменений данной резонансной частоты.

Недостатком этого способа является низкая точность анализа, обусловленная неопределенностью процесса иммобилизации антител на поверхности пьезоэлектрического кристалла. Другим недостатком способа является низкая чувствительность, в частности, для IgG нижний предел обнаружения составляет $1,5 \cdot 10^{-7}$ М.

Наиболее близким по технической сущности к предлагаемому является способ количественного определения гаптенов путем проведения конкурентного связывания антигаптеновых антител с исследуемым образцом и конъюгатом белок-гаптен в акустической камере и регистрации скорости распространения акустических колебаний в реакционной среде.

Недостатком известного способа является низкая точность и длительность анализа, за счет использования второй стадии реакции антиген-антитело, в ходе которой образуется нерастворимый преципитат. Эта стадия иммунохимической реакции не подчиняется строгой стехиометрии и на несколько порядков медленнее первой стадии, в ходе которой образуется только бимолекулярный комплекс антиген-антитело. Другим недостатком известного способа является низкая чувствительность определения гаптенов. Нижний предел обнаружения гаптенов составляет $5 \cdot 10^{-8}$ М.

Целью предложенного способа является повышение чувствительности и точности анализа.

Цель достигается тем, что в известном способе количественного определения гаптенов путем проведения конкурентного связывания антигаптеновых антител с исследуемым образцом и конъюгатом белок-гаптен в акустической камере и регистрации скорости распространения акустических колебаний в реакционной среде, согласно изобретению в качестве конъюгата белок-гаптен используют конъюгат фермент-гаптен, который подвергают предварительной инкубации с антителами к гаптenu, в акустическую камеру дополнительно вводят соответствующий субстрат фермента, а количество гаптена определяют по изменению начальной скорости распространения акустических колебаний в реакционной среде.

Сравнительный анализ заявляемого решения с прототипом показывает, что он отличается от известного тем, что конкурентное связывание антигаптеновых антител с гаптеном проводят в присутствии конъюгата фермент-гаптен и соответствующего субстрата этого фермента,

что позволяет определять количество гаптена по изменению начальной скорости распространения акустических колебаний в реакционной среде и тем самым работать с компонентами иммунохимической реакции в концентрациях на несколько порядков меньших, чем требуется для образования и акустического проявления стадии преципитации, необходимой для осуществления способа-прототипа.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

Определение количества гаптена в исследуемой среде проводят по калибровочной кривой, которую получают следующим образом. Раствор антигаптеновых антител заданной концентрации инкубируют несколько минут с конъюгатом фермент-гаптен. В две идентичные акустические камеры вносят раствор субстрата. Затем в одну из камер, выбранную в качестве рабочей, вносят исследуемую пробу. В другую камеру, выбранную в качестве опорной, вносят буферный раствор. После этого в обе камеры вносят смесь конъюгата фермент-гаптен с антигаптеновыми антителами, перемешивают, возбуждают в камере с исследуемой смесью стоячую акустическую волну, регистрируют скорость акустических колебаний в реакционной среде сразу после смешивания и через определенное время (длительность которого зависит от активности фермента) определяют разность полученных значений. Операции повторяют при использовании различных концентраций гаптена и строят калибровочную кривую.

П р и м е р 1. Для построения калибровочной кривой определения тестостерона смешивают раствор антител к тестостерону (концентрация IgG 50 мкг/мл) с конъюгатом α -амилаза - тестостерон в концентрации 0,5 мкг/мл и инкубируют 3 мин при 37°C в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4. В две идентичные акустические камеры вносят по 0,4 мл 1% раствора крахмала в 0,5 М фосфатном буфере, pH 6,5. Затем в одну из камер, выбранную в качестве рабочей, вносят 0,4 мл исследуемой пробы с тестостероном. В другую камеру, выбранную в качестве опорной, вносят 0,4 мл 0,05 М фосфатного буфера, pH 6,5. После этого в обе камеры вносят по 0,06 мл смеси конъюгата α -амилаза-тестостерон с антителами сывороткой к тестостерону и перемешивают магнитной мешалкой при 37 °C. В камерах создают стоячую волну и регистрируют изменения собственной частоты резонатора в области 7,4 МГц. Учитывая, что изменения собственной частоты резонатора линейно связаны с изменениями скорости распространения акустических колебаний в исследуемой среде, рассчитывают разность скоростей акустических колебаний между первой и восьмой минутами реакции (ΔU_8).

Операции повторяют при использовании различных концентраций тестостерона в диапазоне $4 \cdot 10^{-10}$ - $1,3 \cdot 10^{-8}$ М и строят калибровочную кривую.

Результаты представлены в табл. 1.

Неизвестную концентрацию тестостерона определяют, повторив процедуру с исследуемой пробой и далее сравнением результата с калибровочной кривой.

Как видно из таблицы, предел обнаружения тестостерона за восемь минут

ферментативной реакции составляет $4 \cdot 10^{-10}$ М, а погрешность измерения контрольной пробы 1,8%.

Пример 2. Для построения калибровочной кривой определения эстрадиола смешивают антитела к эстрадиолу (концентрация IgG 100 мкг/мл) с конъюгатом α -амилаза - эстрадиол в концентрации 1 мкг/мл и инкубируют 3 минуты при 37°C в 0,01 М фосфатном буфере pH 7,4. В две идентичные акустические камеры вносят по 0,4 мл 1% раствора крахмала в 0,5 М фосфатном буфере, pH 6,5. Затем в одну из камер, выбранную в качестве рабочей, вносят 0,2 мл исследуемой пробы с эстрадиолом. В другую камеру, выбранную в качестве опорной, вносят 0,2 мл 0,05 М фосфатного буфера, pH 6,5. После этого в обе камеры вносят по 0,06 мл смеси конъюгата α -амилаза-эстрадиол с антительной сывороткой к эстрадиолу и перемешивают магнитной мешалкой при 37 °С. В камерах создают стоячую волну и регистрируют изменения собственной частоты резонатора в области 7,4 МГц. Учитывая, что изменения собственной частоты резонатора линейно связаны с изменениями скорости распространения акустических колебаний в исследуемой среде, рассчитывают разность скоростей акустических колебаний между первой и восьмой минутами реакции (ΔU_8).

Операции повторяют при использовании различных концентраций эстрадиола в диапазоне $8 \cdot 10^{-10}$ - $3,8 \cdot 10^{-8}$ М и строят калибровочную кривую.

Результаты представлены в табл. 2.

Неизвестную концентрацию эстрадиола определяют, повторив процедуру с исследуемой пробой и далее сравнением результата с калибровочной кривой.

Как видно из таблицы предел обнаружения эстрадиола за восемь мин ферментативной реакции составляет $8 \cdot 10^{-10}$ М, а погрешность измерения контрольной пробы 1,6%.

Как видно из выше приведенных примеров предлагаемый способ позволяет повысить чувствительность измерений с $5 \cdot 10^{-8}$ М до $(4-8) \cdot 10^{-10}$, т. е. примерно на два порядка, а точность измерений в 2-3 раза. (56) Авторское свидетельство СССР N 960627, кл. G 01 N 33/48, 1982.

Формула изобретения:

СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГАПТЕНОВ путем конкурентного связывания антигаптеновых антител с исследуемым образцом и конъюгатом белок - гаптен в акустической камере и регистрации скорости распространения акустических колебаний в реакционной среде с последующим учетом результатов, отличающийся тем, что в качестве конъюгата белок - гаптен используют конъюгат фермент - гаптен, предварительно инкубированный с антигаптеновыми антителами, в акустическую камеру дополнительно вводят субстрат фермента, а результат учитывают по изменению начальной скорости распространения акустических колебаний в реакционной среде.

Таблица 2

С, М	ΔU_8 , мм/с
$8 \cdot 10^{-10}$	$1,0 \pm 0,3$
$2,4 \cdot 10^{-9}$	$2,5 \pm 0,3$
$4,8 \cdot 10^{-9}$	$4,4 \pm 0,3$
$9,8 \cdot 10^{-9}$	$8,0 \pm 0,3$
$1,9 \cdot 10^{-8}$	$14,5 \pm 0,4$
$3,8 \cdot 10^{-8}$	$26,4 \pm 0,4$
Контрольная проба	$25,2 \pm 0,4$

Таблица 1

С, М	ΔU_8 , мм/с
$4 \cdot 10^{-10}$	$1,1 \pm 0,3$
$8 \cdot 10^{-10}$	$2,0 \pm 0,3$
$1,6 \cdot 10^{-9}$	$3,6 \pm 0,3$
$3,2 \cdot 10^{-9}$	$6,6 \pm 0,3$
$6,4 \cdot 10^{-9}$	$12,3 \pm 0,3$
$1,3 \cdot 10^{-8}$	$20,3 \pm 0,4$
Контрольная проба	$17,7 \pm 0,3$

RU 2006038 C1

RU 2006038 C1