



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012107168/10, 27.02.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.02.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.02.2012

(45) Опубликовано: 27.06.2013 Бюл. № 18

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO 2005086647 A2, 22.09.2005. EP 1756581
B1, 16.12.2009. RU 2381033 C2, 10.02.2010.

Адрес для переписки:

650056, г. Кемерово, б-р Строителей, 47,
ФГБОУ ВПО Кемеровский технологический
институт пищевой промышленности, Л.И.
Гориславской

(72) Автор(ы):

Просеков Александр Юрьевич (RU),
Бабич Ольга Олеговна (RU),
Новоселова Марина Владимировна (RU),
Солдатова Любовь Сергеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования
"Кемеровский технологический институт
пищевой промышленности" (RU)

**(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННОЙ ГУБЧАТОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ
ЖИВОТНЫХ МЕТОДОМ ИММУНО-ПЦР**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и биотехнологии. Способ включает стадии иммобилизации антигена в лунки полистиролового 96-луночного планшета, связывания антигена с биотилированным антителом, взаимодействия биотилированного антитела с стрептавидиновым комплексом (комплекс стрептавидин - биотин - ДНК-мишень), проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием флуоресцентного зонда. При этом используют ДНК-мишень с последовательностью: AGGAGGTGGCCACGACTGCGAAGGAGGT GGC GTA GGATAGAGTCAGTCCTTGGCCTCCTTGGCCC AGTTAAGAAGTTGCAGCCACACACGCTGTTG TTGGGTTTCGGGGCGGAGTTGCAGCCATCTAC

ACAAACGATACCCTCGTGCAGCTGGAGAAGC AGCACGGCCTATTACCTGGAGGAGGATCGAA ACTGA и моноклональное антитело 15B3. Антитело реагирует с патогенным прионным белком, но не взаимодействует с нормальным, и обнаруживает PrP^{Sc} в гомогенатах зараженного материала без необходимости действия протеиназ. Способ позволяет упростить метод иммуно-ПЦР в реальном времени и повысить его чувствительность за счет иммобилизации антигена на подложке планшета без использования антител захвата, а также при использовании ДНК-мишени, не имеющей гомологов с последовательностями из базы данных GenBank, что снижает риск ложных срабатываний в результате экзогенного загрязнения. 6 табл., 2 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

G01N 33/48 (2006.01)*C12N 15/00* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2012107168/10, 27.02.2012**(24) Effective date for property rights:
27.02.2012

Priority:

(22) Date of filing: **27.02.2012**(45) Date of publication: **27.06.2013 Bull. 18**

Mail address:

**650056, g.Kemerovo, b-r Stroitelej, 47, FGBOU
VPO Kemerovskij tekhnologicheskij institut
pishchevoj promyshlennosti, L.I. Gorislavskoj**

(72) Inventor(s):

**Prosekov Aleksandr Jur'evich (RU),
Babich Ol'ga Olegovna (RU),
Novoselova Marina Vladimirovna (RU),
Soldatova Ljubov' Sergeevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego
professional'nogo obrazovaniya "Kemerovskij
tekhnologicheskij institut pishchevoj
promyshlennosti" (RU)**

(54) IMMUNO-PCR DIAGNOSTIC TECHNIQUE FOR INFECTIOUS SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY IN ANIMALS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: technique involves the stages of immobilising an antigen into the wells of a polystyrene 96-well plate, binding the antigen to a biotylated antigen, conducting a reaction of the biotylated antigen and a streptavidin complex (a complex of streptavidin - biotin - DNA target), conducting a real-time polymerase chain reaction using a fluorescent probe. What is used is the DNA target with a sequence:

ACCAOCTCCCCACCACTOCCAACCACTCOC
OTA

GGATAGAGTCAGTCCTTGGCCTCCTTGCCCC
AGTTAAGAAGTTGCAGCC

ACACACGCTGTTGTTGGGTTCGGGGCGGAGT
TGCAGCCATCTACACAA

ACGATACCCTCGTGCAGCTGGAGAAGCAGCA
CGGCCTATTACCTGGAG

GAGGATCGAACTGA, and the monoclonal antibody 15B3. The antibody reacts with a pathogenic prion protein, but not with a normal one, and detects PrP^{Sc} in homogenates of the infected material without the need of action of proteinases. The technique enables simplifying the real-time immuno-PCR method and increasing its sensitivity by immobilising the antigen on a plate substrate with using no capture antibodies, as well as using the DNA target having no homology with the GenBank database sequences.

EFFECT: reducing a risk of false responses as a result of exogenous contamination.

6 tbl, 2 ex

Изобретение относится к области медицины, ветеринарии и биотехнологии, а именно к разработке способа диагностики инфекционной губчатой энцефалопатии животных методом иммуно-ПЦР в реальном времени.

5 Трансмиссивные губчатые энцефалопатии (TSE), или прионовые инфекции, - фатальная нейродегенеративная патология, встречающаяся у человека и многих видов животных, которая включает такие заболевания, как коровье бешенство (BSE), болезнь Крейтцфельда-Якоба (CJD) в организме человека и скрепи у овец и коз. Эти болезни имеют длительные инкубационные периоды, но быстро прогрессируют с
10 момента клинического начала заболевания. Все прионовые болезни смертельные и в настоящее время эффективных способов их лечения нет.

Патогенные прионы (PrP^{Sc}) выделяют в отдельный новый класс инфекционных агентов, представляющих собой аномальную изоформу нормального прионного белка PrP. Нормальный прионный белок - это гликопротеид, локализованный на
15 клеточной поверхности и имеющий гликозилфосфатидилинозитольный «якорь».

Резко возросший интерес к группе прионных болезней и роли в их возникновении пищевого фактора во многом обусловлен начавшейся в 1986 г. эпизоотией губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота в Великобритании, на пике
20 которой в 1992 г. регистрировалось около 1000 случаев заболеваний коров в неделю, а также с выявлением молодых людей с болезнью Крейтцфельда-Якоба (новый вариант БКЯ) и доказательством возможности передачи этого заболевания людям в результате употребления в пищу мясопродуктов, полученных из зараженных животных.

25 По официальным данным в России с населением примерно 150 миллионов болезнь Крейтцфельда-Якоба ежегодно поражает около 150 человек. Учет таких пациентов ведется неактивно: случаи заболевания не выявляются и не регистрируются. Поэтому на современном этапе является важным налаживание в общегосударственном
30 масштабе работы по регистрации прионных болезней человека и животных на всей территории страны с обращением особого внимания на группы риска.

Основными методами диагностики данной патологии остаются различные варианты иммунологического анализа, а именно: иммуногистохимическое (ИГХ), вестерн-блоттинг и имуноферментный анализ (ИФА). Так, известен способ (патент
35 РФ № 2281511) - определения прионного протеина «сэндвич-методом» ИФА в ткани мозга млекопитающих с использованием пары «антитело-конъюгат», включающей антитело и конъюгат антитела с пероксидазой хрена.

Патент № DE 19963198 A1 описывает способ диагностики нейродегенеративных заболеваний на формалин-фиксированных срезах тканей, включает в себя
40 распространение и очистку образца ткани на мембране для инкубации с раствором протеазы.

В патенте № US 2007224593 A1 представлен метод диагностики трансмиссивной губчатой энцефалопатии. Изобретение включает метод диагностики и
45 прогнозирования трансмиссивных губчатых энцефалопатии у млекопитающих в целых тканях и отдельных образцах, содержащих соединения, которые образуются в результате развития неамилоидной формы прионного заболевания. Увеличение подобных соединений в образцах мозга и других образцах по сравнению с
50 нормальным уровнем контроля указывает на то, что млекопитающее страдает от заболевания, или имеется риск развития TSE, или что образец загрязнен TSE-инфицированным материалом.

Однако данные работы не позволяют устранить главные недостатки

существующих систем: высокая инфекционная опасность для оператора; длительное время проведения исследования; недостаточная чувствительность (неоднозначность интерпретации отрицательных результатов исследования); в качестве образцов для исследования используют образцы различных частей мозга, таким образом, возможно
 5 только посмертное определение присутствия патогенной формы прионного белка в организме животного.

Известен также метод диагностики прионных заболеваний с использованием иммуно-ПЦР в реальном времени (патент № WO/2005/086647). Это техническое
 10 решение является наиболее близким к заявляемому по совокупности существенных признаков (прототип).

Согласно прототипу метод диагностики состоит из следующих этапов. Этап «immunocapture» использует антитела захвата (захват молекулы), специфичные для
 15 прионов, прикрепленные к твердой поддержке, которые взаимодействуют с прионами из образца. Этап «обнаружение» включает добавление различных биотинилированных антител (детектор - молекулы), а затем добавление компоновщик - молекулы (например, авидин или стрептавидин), которая связывается с биотинилированными антителами. Этап усиления включает добавление реагента
 20 усиления, который состоит из (I) полинуклеотидной молекулы и (II) биотиновой части. Полинуклеотидная молекула представлена последовательностью бактериофага лямбда размером 250 п.н. Далее проводится полимеразная цепная реакция. Данный метод может использоваться для обнаружения биомолекул в биологических образцах, таких как кровь, нейронная ткань и моча, а также в пробах окружающей среды, таких
 25 как вода, почва, воздух и биологические материалы. Недостатки метода: невысокая чувствительность определения при низком уровне содержания прионного белка в исследуемом образце и высокая стоимость анализа.

Задачей технического решения является создание простого и
 30 высокочувствительного метода для обнаружения низкого уровня патогенных белков в исследуемом образце, в качестве которых могут выступать биологические жидкости (кровь, моча и т.д.) и различные многокомпонентные составы.

Результат достигается за счет: 1) использования ДНК-мишени, не имеющей гомологов с последовательностями из базы данных GenBank

35 AGGAGGTGGCCACGACTGCGAAGGAGGTGGCGTAGGATAGAGTCAGTCCTTGGCCTC
 CTTGGCCCAGTTAAGAAGTTGCAGCCACACACGCTGTTGTTGGGTTCGGGGCGGAGTT
 GCAGCCATCTACACAAACGATACCCTCGTGCAGCTGGAGAAGCAGCACGGCCTATTA
 CCTGGAGGAGGATCGAACTGA, что снижает риск ложных срабатываний за счет
 40 экзогенных загрязнений, 2) использования моноклонального антитела 15B3, которое реагирует с патогенным прионным белком, но не взаимодействует с нормальным, и способно обнаруживать PrP^{Sc} в гомогенатах зараженного материала без необходимости действия протеиназы К, что имеет большое значение для анализа крови и др. биологических жидкостей, 3) упрощения и удешевления анализа за счет
 45 иммобилизации антигена на подложке планшета без использования антител-захвата.

Иммуно-ПЦР-тест-система сочетает в себе универсальность иммуноферментного анализа с мощностью и чувствительностью ПНР. Данная тест-система позволяет
 50 обнаружить патогенный прионный белок с использованием специфических антител, меченных двухцепочечной ДНК (маркер). Учитывая огромные возможности усиления и специфичности ПЦР, иммуно-ПЦР-технология имеет чувствительность больше, чем все существующие системы обнаружения антигена, и может быть применена для обнаружения отдельных молекул антигена. Проведение полимеразной цепной реакции

позволяет многократно увеличивать специфический участок нуклеотидной последовательности, что существенно повышает чувствительность метода и позволяет увеличить перечень образцов, пригодных для исследования. При разработке метода ПЦР в режиме реального времени, когда проба находится в закрытой пробирке, происходит снижение инфекционной опасности для оператора.

Способ диагностики инфекционной губчатой энцефалопатии животных осуществляется следующим образом:

1 этап - иммобилизация антигена (прионный белок) в лунках полистиролового 96-луночного планшета. Проводят инкубирование, удаляют несвязанный материал, впоследствии проводится блокировка незанятых участков пластика.

2 этап - связывание антигена с биотилированным антителом. Для определения адсорбированного материала в лунки вносятся биотинилированные моноклональные антитела к патогенному прионному белку, после чего проводится инкубация планшета.

3 этап - приготовление ДНК-репортера. В качестве связующего звена между антителом и ДНК-репортером используется стрептавидин-биотиновый комплекс.

Одна молекула стрептавидина, состоящая из четырех идентичных субъединиц, способна взаимодействовать с четырьмя молекулами биотина, что позволяет использовать его как связующую молекулу между двумя биотинсодержащими соединениями. В этом случае ДНК-хвост тоже биотинилируют, а стрептавидин выполняет функцию мостика, соединяя две молекулы, содержащие остатки биотина.

Получение конъюгатов (антител и ДНК с биотином) осуществляется достаточно легко и сопровождается минимальными изменениями их иммунологической активности.

Рекомбинантный стрептавидин предварительно инкубируют с биотинилированным ДНК-репортером.

4 этап - связывание биотилированного антитела с стрептавидиновым комплексом (комплекс стрептавидин - биотин - ДНК-мишень). Добавление стрептавидинового комплекса ДНК в лунки с последующей инкубацией планшета.

5 этап - проведение полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием флуоресцентного зонда. Лунки промывают, а затем подвергаются ПЦР.

Приготовление пробы включает следующие операции.

Исследуемый материал тщательно освобождают от жира и соединительной ткани. Навеску массой 3-4 г тщательно измельчают ножом на часовом стекле. К навеске измельченного сырья приливают дистиллированную воду в соотношении 1:6 (по массе) и ведут экстракцию на холоде при 0°C в течение 30 мин. Затем центрифугированием при частоте вращения 83 с⁻¹ в течение 5 мин отделяют осадок. Надосадочную жидкость осторожно декантируют и используют для количественного определения белков.

Осадок количественно переносят в фарфоровую ступку, растирают с песком и приливают солевой раствор Вебера в соотношении 1:6 к первоначальной массе навески мышечной ткани.

Экстракцию проводят при 0°C в течение 20 мин. По истечении указанного времени экстракт отделяют центрифугированием в течение 10 мин при частоте вращения 83 с⁻¹. Надосадочную жидкость декантируют и используют для количественного определения растворимых белков, а осадок подвергают последующей обработке.

Осадок переносят в термостойкую пробирку, добавляют 10 см³ раствора

гидроксида натрия с массовой долей 10% и нагревают на водяной бане до температуры 96°C. Полученный раствор после охлаждения центрифугируют в течение 5 мин при частоте вращения 83 с⁻¹.

Конструирование ДНК-матрицы представляет собой этап построения подробной модели гена-мишени (ДНК-матрица) или иной последовательности нуклеиновой кислоты, которую планируется амплифицировать.

Чтобы снизить риск ложных срабатываний за счет экзогенных загрязнений ДНК, была разработана ДНК-матрица, не существующая в природе.

Была построена синтетическая последовательность длиной 194 п.н. (известно, что наиболее оптимальной длиной считают фрагменты в диапазоне 150-300 пар оснований), полученная случайным образом:

```
AGGAGGTGGCCACGACTGCGAAGGAGGTGGCGTAGGATAGAGTCAGTCCTTGGCC
TCCTTGGCCCAGTTAAGAAGTTGCAGCCACACACGCTGTTGTTGGGTTCTGGGGCGGAG
TTGCAGCCATCTACACAAACGATACCCTCGTGCAGCTGG
AGAAGCAGCACGGCCTATTACCTGGAGGAGGATCGAAACTGA
```

Созданная последовательность была проанализирована в GenBank с помощью программы BLAST. Используя данную программу, сравнили имеющуюся последовательность с последовательностями из базы данных и определили наличие гомологов. Анализ показал, что созданные нуклеотидные последовательности гомологов не имеют.

Антитела к патогенному прионному белку

В связи с высокой межвидовой гомологией, отмеченной для белка PrP, лучше выбирать антитела, для получения которых используют конъюгаты пептидов.

Так, в ходе анализа было выбрано мышинное моноклональное антитело 15B3 (компании Prionics), которое получено с помощью 3-х различных последовательностей (эпитопа) пептида PrP человека: 15b3-1 включает в себя остатки 142-148 GSDYEDR(YY); 15b3-2 остатки 162-170 YYRPVDQYS; 15b3-3 остатки 214-226 CITQYQRESQAYY.

15B3-1 и 15B3-2 связаны с β-листами, которые накапливаются в PrP^{Sc} и 15B3-3 признает аминокислотные остатки вблизи С-конца.

15B3 является антителом, которое специфически распознает aberrантно сложенные молекулы белка PrP^{Sc}, а не нормальные молекулы PrP (PrP^C). Специфичность антител, которая была разработана Prionics в 1997 году, была подтверждена в исследовании Biasini и коллег.

Антитела 15B3 способны обнаруживать PrP^{Sc} в гомогенатах зараженного материала без необходимости действия протеиназы К. Это имеет большое значение для анализа крови.

Экспериментально было показано, что 15B3 реагирует с PrP^{Sc} человека, крупного рогатого скота, овцы, оленя, мыши и хомяка, но не реагирует с нормальными PrP^C прионами.

Конструирование праймеров

Одними из ключевых компонентов анализа являются «праймеры» - олигонуклеотидные последовательности длиной 15-30 п.н.

Олигонуклеотидные праймеры размером 20 п.н. были подобраны с помощью программы Primer3 с учетом последовательности ДНК-матрицы:

левый праймер - с 41 п.н. - AGTCAGTCCTTGGCCTCCTT

правый праймер - с 193 п.н. - CAGTTTCGATCCTCCTCCAG

Конструирование флуоресцентного зонда

Одним из важных компонентов ПЦР в реальном времени является флуоресцентный зонд, за счет которого можно достичь более высокой специфичности детекции результатов ПЦР. Он представляет собой олигонуклеотид, к которому присоединена молекула флуорофора, прикрепленного к 5'-концу олигонуклеотида зонда и гасителя на 3'-конце зонда.

С помощью программы Primer3 была выбрана следующая область зонда размером 20 п.н. - AGAAGCAGCACGGCCTATTA с параметрами:

Флуоресцентный зонд №1 - AGAAGCAGCACGGCCTATTA

Флуоресцентный зонд №2 - ATACCCTCGTGCAGCTGGAGAAGCA

В качестве флуорофора был использован карбоксифлуоресцин (FAM) как наиболее доступный и легко обнаруживающийся с помощью всех инструментов, существующих в настоящее время на рынке. В соответствии с диапазоном флуоресценции флуорофора был подобран подходящий гаситель - BHQ-1.

Пример 1. Обнаружение прионных белков в пробах, взятых у овец, с использованием иммуно-ПЦР-тест-системы

С помощью изобретения были протестированы пробы, взятые у овец. Протокол анализа следующий:

1) Приготовление пробы

Исследуемый материал тщательно освобождают от жира и соединительной ткани. Навеску массой 3-4 г тщательно измельчают ножом на часовом стекле. К навеске измельченного сырья приливают дистиллированную воду в соотношении 1:6 (по массе) и ведут экстракцию на холоде при 0°C в течение 30 мин. Затем центрифугированием при частоте вращения 83 с⁻¹ в течение 5 мин отделяют осадок. Надосадочную жидкость осторожно декантируют и используют для количественного определения белков.

Осадок количественно переносят в фарфоровую ступку, растирают с песком и приливают солевой раствор Вебера в соотношении 1:6 к первоначальной массе навески мышечной ткани.

Экстракцию проводят при 0°C в течение 20 мин. По истечении указанного времени экстракт отделяют центрифугированием в течение 10 мин при частоте вращения 83 с⁻¹. Надосадочную жидкость декантируют и используют для количественного определения солерастворимых белков, а осадок подвергают последующей обработке.

Осадок переносят в термостойкую пробирку, добавляют 10 см³ раствора гидроксида натрия с массовой долей 10% и нагревают на водяной бане до температуры 96°C. Полученный раствор после охлаждения центрифугируют в течение 5 мин при частоте вращения 83 с⁻¹.

2) Пробу вносят по 100 мкл в лунки полистиролового 96-луночного планшета. Инкубируют при 37°C в течение 60 мин. Для выбора оптимальных условий адсорбции антигена на пластике проводится инкубирование антигена по 100 мкл на лунку в концентрациях 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 мкг/мл в течение 30, 60, 90, 120, 150, 180 минут.

3) Несвязанный материал удаляется с лунок простым встряхиванием с последующей 3-кратной отмывкой (промывочный буфер: 50 ммоль/л Tris, 150 ммоль/л NaCl, 0,5 мл/л Твин 20).

4) Блокировка незанятых участков пластика внесением раствора PBS, содержащего бычий сывороточный альбумин, в лунки планшета по 100 мкл на лунку в течение 30 минут.

5) После удаления блокирующего раствора (путем промывки) для определения адсорбированного материала в лунки вносят по 100 мкл биотинилированных моноклональных антител к патогенному прионному белку 15B3 и инкубируют планшет в течение 2 часов при 18°C.

6) Удаляются несвязанные антитела путем 3-кратного промывания лунок раствором PBS, содержащим 1 мл/л Твин (Tween), и 3 раза раствором PBS, содержащим 15 г/л бычьего сывороточного альбумина.

7) Параллельно готовят ДНК-репортер. Получение конъюгатов (антител и ДНК с биотином) осуществляется достаточно легко и сопровождается минимальными изменениями их иммунологической активности. Рекомбинантный стрептавидин предварительно инкубируют в течение 45 мин при 4°C с биотинилированным ДНК-репортером в молярном соотношении 1:2.

8) Стрептавидиновый комплекс ДНК затем добавляют в лунки и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре.

9) Лунки промывают 5 раз PBS и 10 раз дистиллированной водой, а затем подвергаются ПНР-анализу, параметры которого представлены в табл.1 и 2.

Компоненты ПНР			Таблица 1
Компонент	Конечная концентрация	Количество компонента на 50 мкл смеси	
10X ПНР-буфер	IX	5 мкл	
10 мМ смесь дНТФ	0,2 мМ каждого	1 мкл	
Праймер 1 (50 мкМ)	1 мкМ	1 мкл	
Праймер 2 (50 мкМ)	1 мкМ	1 мкл	
Taq-ДНК-полимераза	1,25 ед.	0,5 мкл	
25 мМ MgCl ₂	1-5 мМ	2-5 мкл	
ДНК-матрица	0,1-1 мкг	Варьирует от концентрации образца	
Деионизированная вода	-	До 50 мкл	

Параметры амплификации				Таблица 2
Стадия	Количество циклов	Температура, °C	Время инкубации	
Предварительная денатурация	1	95	1 мин	
Денатурация	30	95	30 с	
Отжиг		56	1 мин	
Элонгация		72	30 с	

Результаты, полученные в ходе выполнения исследований, представлены в табл.3.

Результаты эксперимента			Таблица 3
№, п/п	Наименование	Длина ПЦР-ампликона, п.н.	
1	Положительный контроль	153	
2	Исследуемый образец	-	

Пример 2. Обнаружение прионных белков в пробах *Bos taurus* (корова) с использованием иммуно-ПЦР-тест-системы

С помощью изобретения были протестированы пробы, взятые у *Bos taurus* (корова).
Протокол анализа следующий:

1) Приготовление пробы

Исследуемый материал тщательно освобождают от жира и соединительной ткани. Навеску массой 3-4 г тщательно измельчают ножом на часовом стекле. К навеске

измельченного сырья приливают дистиллированную воду в соотношении 1:6 (по массе) и ведут экстракцию на холоде при 0°C в течение 30 мин. Затем центрифугированием при частоте вращения 83 с⁻¹ в течение 5 мин отделяют осадок. Надосадочную жидкость осторожно декантируют и используют для количественного определения белков.

Осадок количественно переносят в фарфоровую ступку, растирают с песком и приливают солевой раствор Вебера в соотношении 1:6 к первоначальной массе навески мышечной ткани.

Экстракцию проводят при 0°C в течение 20 мин. По истечении указанного времени экстракт отделяют центрифугированием в течение 10 мин при частоте вращения 83 с⁻¹. Надосадочную жидкость декантируют и используют для количественного определения солерастворимых белков, а осадок подвергают последующей обработке.

Осадок переносят в термостойкую пробирку, добавляют 10 см³ раствора гидроксида натрия с массовой долей 10% и нагревают на водяной бане до температуры 96°C. Полученный раствор после охлаждения центрифугируют в течение 5 мин при частоте вращения 83 с⁻¹.

2) Пробу вносят по 100 мкл в лунки полистиролового 96-луночного планшета. Инкубируют при 37°C в течение 60 мин. Для выбора оптимальных условий адсорбции антигена на пластике проводится инкубирование антигена по 100 мкл на лунку в концентрациях 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 мкг/мл в течение 30, 60, 90, 120, 150, 180 минут.

3) Несвязанный материал удаляется с лунок простым встряхиванием с последующей 3-кратной отмывкой (промывочный буфер: 50 ммоль/л Tris, 150 ммоль/л NaCl, 0,5 мл/л Твин 20).

4) Блокировка незанятых участков пластика внесением раствора PBS, содержащего бычий сывороточный альбумин, в лунки планшета по 100 мкл на лунку в течение 30 минут.

5) После удаления блокирующего раствора (путем промывки) для определения адсорбированного материала в лунки вносят по 100 мкл биотинилированных моноклональных антител к патогенному прионному белку 15B3 и инкубируют планшет в течение 2 часов при 18°C.

6) Удаляют несвязанные антитела путем 3-кратного промывания лунок раствором PBS, содержащим 1 мл/л Твин (Tween) и 3 раза раствором PBS, содержащим 15 г/л бычьего сывороточного альбумина.

7) Параллельно готовят ДНК-репортер. Получение конъюгатов (антител и ДНК с биотином) осуществляется достаточно легко и сопровождается минимальными изменениями их иммунологической активности. Рекомбинантный стрептавидин предварительно инкубируют в течение 45 мин при 4°C с биотинилированным ДНК-репортером в молярном соотношении 1:2.

8) Стрептавидиновый комплекс ДНК затем добавляют в лунки и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре.

9) Лунки промывают 5 раз PBS и 10 раз дистиллированной водой, а затем подвергают ПЦР-анализу, параметры которого представлены в табл.4 и 5.

Компоненты ПНР			Таблица 4
Компонент	Конечная концентрация	Количество компонента на 50 мкл смеси	
10X ПЦР-буфер	IX	5 мкл	
10 mM смесь дНТФ	0,2 mM каждого	1 мкл	

Праймер 1 (50 мкМ)	1 мкМ	1 мкл
Праймер 2 (50 мкМ)	1 мкМ	1 мкл
Тaq-ДНК-полимераза	1,25 ед.	0,5 мкл
25 мМ MgCl ₂	1-5 мМ	2-5 мкл
ДНК-матрица	0,1-1 мкг	Варьирует от концентрации образца
Деионизированная вода	-	До 50 мкл

Таблица 5			
Параметры амплификации			
Стадия	Количество циклов	Температура, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95	1 мин
Денатурация	30	95	30 с
Отжиг		56	1 мин
Элонгация		72	30 с

Результаты, полученные в ходе выполнения исследований, представлены в табл.6.

Таблица 6		
Результаты эксперимента		
№, п/п	Наименование	Длина ПЦР ампликона, п.н.
1	Положительный контроль	153
2	Исследуемый образец	-

Формула изобретения

Способ диагностики инфекционной губчатой энцефалопатии животных методом иммуно-ПЦР, включающий стадии иммобилизации антигена в лунки полистиролового 96-луночного планшета, связывания антигена с биотилированным антителом, взаимодействия биотилированного антитела с стрептавидиновым комплексом (комплекс стрептавидин-биотин-ДНК-мишень), проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием флуоресцентного зонда, отличающийся тем, что используется ДНК-мишень, не имеющая гомологов с последовательностями из базы данных GenBank AGGAGGTGGCCACGACTGCGAAGGAGGTGGCGTAGGATAGAGTCAGTCCTTGGCCTC CTTGGCCCAGTTAAGAAGTTGCAGCCACACACGCTGTTGTTGGGTTCGGGGCGGAGTT GCAGCCATCTACACAAACGATACCCCTCGTGCAGCTGGAGAAGCAGCACGGCCTATTA CCTGGAGGAGGATCGAAACTGA, и моноклональное антитело 15B3, которое реагирует с патогенным прионным белком, но не взаимодействует с нормальным, и обнаруживает PrP^{Sc} в гомогенатах зараженного материала без необходимости действия протеиназ.