



УКРАЇНА

(19) **UA**  
(51) МПК

(11) **144483**

(13) **U**

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

**G01N 33/561** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2020 00587**

(22) Дата подання заявки: **31.01.2020**

(24) Дата, з якої є чинними  
права інтелектуальної  
власності: **13.10.2020**

(46) Публікація відомостей  
про державну  
реєстрацію: **12.10.2020, Бюл.№ 19**

(73) Володілець (володільці):

**ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НААН,**  
вул. В. Стуса, 38, м. Львів-34, 79034 (UA)

## (54) СПОСІБ ПОСИЛЕННЯ РЕАКЦІЇ ПРЕЦИПІТАЦІЇ ЗА ІМУНОЕЛЕКТРОФОРЕЗУ

(57) Реферат:

Спосіб посилення реакції преципітації за імуноелектрофорезу включає використання стандартного обладнання для імуноелектрофоретичного дослідження взаємодії специфічних антитіл з антигеном. Для виявлення зон преципітації додають 1,0 % розчин кополімеру флуоресцеїну (готовий продукт) у дозі 5 мкл до 10 мл антигена (чи інактивованого збудника у складі вакцини).

UA 144483 U



Корисна модель належить до галузі біології, зокрема до імунології та біотехнології і клінічної діагностики, а саме стосується способів виявлення зони преципітації за зустрічного електрофорезу за додавання розчину кополімеру флуоресцеїну до збудника хвороби (антигена чи інактивованого збудника у складі вакцини). Корисна модель може бути використана в імунології та клінічній практиці для встановлення присутності у крові антитіл та стійкого імунітету до хвороби.

Імуноелектрофорез широко використовують у лабораторній практиці. Відомо, що за певних умов антиген і антитіло за електрофорезу рухаються у протилежних напрямках. Для цього реагуючі компоненти вносять в окремі лунки в агаровому гелі, який готують на буфері. Оскільки більшість преципітуючих антитіл належать до класу імуноглобулінів G (IgG), які мають слабкий негативний заряд за рН 8-9, вони рухаються до катода. Антитіла ж мають позитивний заряд і рухаються до анода. Відповідно антитіла в лунках гелю розміщують ближче до анода, а антиген - до катода. За дії електричного поля міграція антиген-антитіло відбувається назустріч один одному. За імуноелектрофорезу (зустрічного електрофорезу, електросинтезу) видимі преципітати можуть проявлятися через 30-60 хв. електрофорезу (інколи через 2 год.; Гааль Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул/ Э. Гааль, Г. Медьеша, Л. Верецки. - М.: Мир, 1982. - С. 446).

Реакцію імуноелектрофорезу (РІЕФ) застосовують для прижиттєвої діагностики алеутської хвороби у норок (Cho H. J., Ingram D. J. Antigen and antibody in Aleutian disease in mink. I. Precipitation Reaction by Agar-Gel Electrophoresis// The J. Immunol. - 1972. - V. 108, № 2. - P. 555-557; Cho H. J., Ingram D. J. Accurate and rapid test for detecting Aleutian disease infected mink// Fur. Trade Journal. - 1972. - V. 50. - P. 8.; Cho H. J., Ingram D. J. Antigen and antibody in Aleutian disease in mink. II. The reaction of antibody with Aleutian disease agent using immunodiffusion and immunoelectroosmophoresis// Can. J. Comp. Med. - 1973. - V. 37, № 3. - P. 217-223). Як антиген використовують фреонові екстракти печінки, селезінки і лімфатичні вузли експериментально заражених норок. РІЕФ відзначається високою специфічністю і дозволяє виявляти хворих норок через 6-15 діб після зараження. У підсисних цуценят вона позитивна протягом першої години після ссання молока у хворих самиць. У середньому, за всіх форм захворювання, за допомогою РІЕФ виявляють 98-100 % хворих тварин. За експериментального зараження тварин РІЕФ виявляє хворобу через 6-7 діб. В умовах господарства за прямого контакту дослідних і хворих тварин, інфікованих виявляють вже через 30-60 діб. (Парвовірусні інфекції собак і хутрових звірів/ Л.Є. Корнієнко, В.І. Головаха, Б.М. Ярчук та ін. - Біла Церква, 2001. - С. 55).

Недолік використання РІЕФ для діагностики хвороби: за відсутності видимих преципітатів антиген-антитіло рекомендовано занурити гель в 12,5 % NaCl упродовж 7-10 хв. і промити в дистильованій воді не менше 12 год. Додаткові маніпуляції з агаровим гелем призводять до збільшення часу встановлення діагнозу, а в окремих випадках, за руйнування крихкого гелю - до втрати результатів і проведення повторних досліджень.

Найближчим аналогом корисної моделі є спосіб виявлення преципітатів антиген-антитіло за РІЕФ для діагностики алеутської хвороби у норок (Наставление по применению наборов антигена и контрольной сыворотки для серологической диагностики алеутской болезни норок в реакции иммуноэлектроосмофореза. - М., 1994. - С. 7). Особливістю вказаного способу є внесення реагуючих компонентів (сироватки крові хворої чи здорової тварини і специфічних антитіл) в окремі лунки в агаровому гелі та проведення імуноелектрофорезу впродовж 30-60 хв.

Однак, після проведення імуноелектрофорезу і за сумнівних результатів агаровий гель занурюють в 12,5 % NaCl на 7-10 хв, а потім промивають в дистильованій воді не менше 12 год. або ж проводять повторні дослідження. Вказані особливості досліджень уповільнюють діагностику захворювання і вибраковку хворих тварин, а також сповільнюють застосування профілактичних заходів із ліквідації хвороби.

Корисна модель усуває недоліки найближчого аналога і за додавання розчину кополімеру флуоресцеїну (готовий продукт; патент України № 98749, МПК C08G 77/46, C08G 63/66, C08G 63/12, C08G 63/685, C08G 63/668. Спосіб одержання кополіестерів природних двоосновних  $\alpha$ -амінокислот та поліетерів гліколів/ Дронь І.А., Тарас Р.С., Воронов С.А., Варваренко С.М., Нагорняк М.І., Фігурка Н.В., Носова Н.Г., Самарик В.Я., Воронов А.С., Ференс М.В., Тарнавчик І.Т. (Україна); Національний університет "Львівська політехніка"; заявл. 13.10.2014, опубл. 12.05.2015. - Бюл. № 9) до антигена чи інактивованого збудника у складі вакцини за імуноелектрофорезу забезпечує візуалізацію зон преципітації та усуває необхідність занурення гелю в 12,5 % NaCl впродовж 7-10 хв. і промивання в дистильованій воді не менше 12 год.

В основу корисної моделі поставлена задача забезпечити виявлення зон преципітації за імуноелектрофорезу і підвищити ефективність та вірогідність діагностики хвороби додатковим

введенням розчину кополімеру флуоресцеїну (готовий продукт) до антигена чи інактивованого збудника у складі вакцини.

5 Технічний результат досягають додаванням до антигена чи інактивованого збудника у складі вакцини 1,0 % розчину кополімеру флуоресцеїну (готовий продукт) об'ємом 5 мкл до 10 мл антигена.

За патентно-інформаційного пошуку знайдений аналог, в якому є суттєві ознаки, спільні з корисною моделлю: використання антигена чи інактивованого збудника у складі вакцини за імуоелектрофорезу, що забезпечує преципітацію антиген-антитіло в агаровому гелі; подібність складу агарового гелю у найближчому аналогу та корисній моделі.

10 Однак, наявність зазначених спільних з найближчим аналогом ознак є не достатніми для одержання технічного результату корисної моделі. Аналогів, які б за сукупністю ознак повністю співпадали з ознаками корисної моделі, не знайдено.

У джерелах патентної і науково-технічної інформації не знайдено аналогів з ознаками, що відрізняють заявлений спосіб від найближчого аналога і забезпечують технічний результат: виявлення зон преципітації додаванням 1,0 % розчину кополімеру флуоресцеїну (готовий продукт) у дозі 5 мкл до 10 мл антигена чи інактивованого збудника у складі вакцини.

20 Поставлена задача вирішується тим, що у способі посилення реакції преципітації за імуоелектрофорезу, що включає використання стандартного обладнання для імуоелектрофоретичного дослідження взаємодії специфічних антитіл з антигеном, згідно з корисною моделлю, для виявлення зон преципітації додають 1,0 % розчин кополімеру флуоресцеїну (готовий продукт) у дозі 5 мкл до 10 мл антигена (чи інактивованого збудника у складі вакцини).

Приклади конкретного виконання способу

Приклад 1

25 Оскільки антиген чи інактивований збудник у складі вакцини є протеїнами (чи частинами протеїнових молекул) для підтвердження ефективності заявленого способу в умовах лабораторії молекулярної біології та клінічної біохімії Інституту біології тварин НААН були проведені дослідження із взаємодії кополімеру флуоресцеїну (готовий продукт) з протеїнами сироватки крові (бичачим сироватковим альбуміном; фіг. 1). На фіг. 1 зображено електрофорез розчину кополімеру флуоресцеїну з бичачим сироватковим альбуміном, де 1 - бичачий сироватковий альбумін, зафарбований бромфеноловим синім; 2 - 1,0 % розчин кополімеру флуоресцеїну (готовий продукт); 3 - комплекс кополімеру флуоресцеїну з бичачим сироватковим альбуміном; ↓ - вказана зона взаємодії внесених в лунку компонентів (зона зв'язування кополімеру флуоресцеїну з бичачим сироватковим альбуміном).

35 Виявлено, що у першій лунці за електрофорезу в агаровому гелі бичачий сироватковий альбумін, зафарбований бромфеноловим синім, рухався до анода. Аналогічний результат отримано за електрофорезу комплексів: у другій лунці - 1,0 % розчин кополімеру флуоресцеїну, та у третій - кополімер флуоресцеїну з бичачим сироватковим альбуміном. При цьому, у третій лунці за електрофорезу кополімеру флуоресцеїну з бичачим сироватковим альбуміном встановлена зона з інтенсивнішим зафарбуванням, що характеризує утворення комплексу між компонентами. Вільний (незв'язаний з протеїном) флуоресцеїн рухається за дії електричного поля аналогічно, як у другій лунці.

45 Для підтвердження результату проведено вертикальний електрофорез зразків бичачого сироваткового альбуміну та комплексу кополімеру флуоресцеїну з бичачим сироватковим альбуміном. Для цього виготовлено два зразки: № 1 - бичачий сироватковий альбумін (5 мг/мл), і № 2 - комплекс кополімеру флуоресцеїну з бичачим сироватковим альбуміном (5 мкл 1,0 % кополімеру на 10 мл розчину бичачого сироваткового альбуміну з вмістом 5 мг/мл). Після електрофорезу гель фотографували (фіг. 2): поліакриламідний 12,5 % гель з незафарбованими (А) і зафарбованими (Б) зразками: № 1 - бичачий сироватковий альбумін; № 2 - комплекс кополімеру флуоресцеїну з бичачим сироватковим альбуміном. Стрілками відмічено зафарбований бичачий сироватковий альбумін.

50 Встановлено, що за електрофорезу у лунці незафарбованого гелю (А) зразок № 1 (бичачий сироватковий альбумін) відсутній вміст, а у зразку № 2 на старті залишається полімер (фіг. 2, А і Б; зразок № 2). Після зафарбування (фіг. 2, Б) виявлено, що бичачий сироватковий альбумін за дії електричного поля у лунці № 1 пройшов більшу відстань від старту, ніж у лунці № 2.

55 Отже, кополімер флуоресцеїну здатний взаємодіяти з бичачим сироватковим альбуміном, що призводить до збільшення розміру комплексу і сповільнення рухливості його за електрофорезу. Виявлена здатність кополімеру флуоресцеїну зв'язувати протеїн послужила підґрунтям для використання його як маркера зони преципітації і способу посилення реакції преципітації за імуоелектрофорезу.

60

Приклад 2

Для апробування корисної моделі використана встановлена здатність комплексу кополімеру флуоресцеїну зв'язувати протеїни, а як приклад використання способу застосування антигена: вакцини проти геморагічної хвороби кролів (Лапімун ГЕМ-2). У склад вакцини входять інактивовані віруси двох штамів: БГ-04 $\geq$ 640 ГАО і ГБК-2 $\geq$ 640 ГАО та допоміжні компоненти.

Для досліджень відібрано молодняк кроликів 1-місячного віку породи Термонська біла. Кролям вводили вакцину підшкірно за лопаткою в дозі 1,0 мл відповідно до інструкції виробника. До вакцинування (контроль), через 14, 21 і 28 днів з крайової вушної вени кролів брали кров у пробірки з гепарином. До 10 мл антигена (вакцини проти геморагічної хвороби кролів - Лапімун ГЕМ-2) додавали 5 мкл 1,0 % розчину кополімеру флуоресцеїну (готовий продукт) у двох модифікаціях: МФ-37 і МФ-47. Модифікації розчину кополімеру флуоресцеїну відрізняються за вмістом флуорисцеїну.

На фіг. 3 наведено результати зустрічного імунофорезу з встановлення напруженості імунітету молодняку кролів впродовж 21 доби після вакцинації за використанням корисної моделі: зразки №№ 1, 2, 3, відповідно, № 1 - без використання і з застосуванням кополімеру флуоресцеїну у двох модифікаціях: № 2 - МФ-37 і № 3 - МФ-47.

Аналіз результатів свідчить, що до вакцинації вміст протеїнів зон преципітації антиген-антитіло (без використання і з застосуванням кополімеру флуоресцеїну у складі антигена) у тварин був у межах 6,9-39,5 % (фіг. 4 - денситограми зон преципітації антиген-антитіло за імунофорезу з встановлення напруженості імунітету молодняку кролів впродовж 21 доби після вакцинації. Стрілками вказані зони преципітації. Таблица 1).

Таблица 1

Вміст протеїнів у зоні преципітації за імуноелектрофорезу з встановлення напруженості імунітету молодняку кролів впродовж 21 доби після вакцинації

Умови досліджень	Вміст протеїнів у зразках за імуноелектрофорезу, %		
	Контроль (до вакцинації)	доби досліджень після вакцинації	
		14	21
1 (без полімеру)	6,9	9,0	20,0
3 (полімер МФ-47)	22,2	37,8	25,8
2 (полімер МФ-37)	39,5	32,9	30,2
1 (без полімеру)	31,5	20,3	24,0

Через 14 днів після вакцинації вміст протеїнів зони преципітації за використання кополімеру флуоресцеїну у складі антигена був майже однаковим (32,9-37,8 %), а без використання полімеру на 12,6-28,8 % нижчим. Встановлені зміни зберігались за дослідження напруженості імунітету через 21 добу. Різниця між результатами за використання кополімеру флуоресцеїну у складі антигена порівняно з антигеном - 5,8-6,2 %.

Повторними дослідженнями вмісту протеїнів у комплексі кополімер флуоресцеїну у складі антиген+антитіло підтверджено, що за додавання в зразки антигена у комплексі з кополімером флуоресцеїну інтенсивніше проявляються зони преципітації (фіг. 5, 6). На фіг. 5 - результати зустрічного імунофорезу з встановлення напруженості імунітету молодняку кролів впродовж 28 днів після вакцинації за використання корисної моделі: зразки №№ 1, 2, 3, відповідно, № 1 - без використання і з застосуванням кополімеру флуоресцеїну у двох модифікаціях: № 2 - МФ-37 і № 3 - МФ-47. На фіг. 6 - денситограми зон преципітації антиген-антитіло з встановлення напруженості імунітету молодняку кролів впродовж 28 днів після вакцинації. Стрілками вказані зони преципітації.

Аналіз результатів свідчить, що до вакцинації вміст протеїнів зон преципітації антиген-антитіло (без використання і з застосуванням кополімеру флуоресцеїну у складі антигена) у тварин був у межах 14,0-30,2 % (Таблица 2).

Таблиця 2

Вміст протеїнів у зоні преципітації за зустрічного імуоелектрофорезу з встановлення напруженості імунітету молодняку кролів упродовж 28 діб після вакцинації

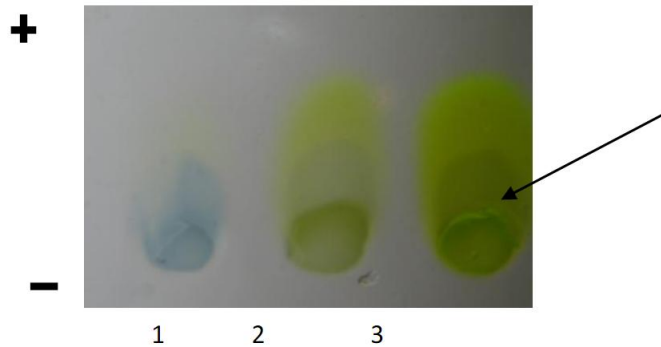
Умови досліджень	Вміст протеїнів у зразках за імуоелектрофорезу, %			
	Контроль (до вакцинації)	добы досліджень після вакцинації		
		14	21	28
1 (без полімеру)	14,0	11,2	7,4	20,5
3 (полімер МФ-47)	23,0	33,7	26,0	29,0
2 (полімер МФ-37)	32,9	49,5	63,5	36,7
1 (без полімеру)	30,2	5,6	3,0	13,8

5 Через 14 діб після вакцинації за використання комплексу кополімеру флуоресцеїну МФ-37 у складі антигена вміст протеїнів зони преципітації становив 49,5 %, менший (33,7 %) за додавання полімеру МФ-47, а без використання полімеру на 22,5-43,9 % нижчим, ніж з додаванням полімерів. Встановлені зміни зберігались за дослідження напруженості імунітету через 21 і 28 доби між зразками, в які додавали кополімер флуоресцеїну, порівняно зі зразками без полімеру. Різниця між результатами за використання комплексу кополімеру флуоресцеїну у складі антигена, порівняно з антигеном становила відповідно 19,6-60,5 % та 8,5-22,9 %.

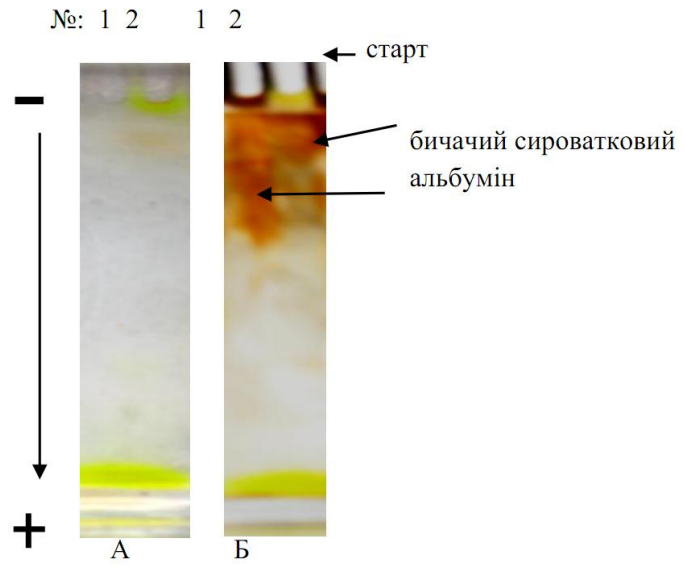
10 Отже, використання комплексу кополімеру флуоресцеїну у складі антигена за проведення діагностичних досліджень з використанням імуоелектрофорезу посилює реакцію преципітації з антитілами сироватки (плазми) крові імунізованих тварин (кролів), що проявляється на 8,5-60,5 % вищим вмістом протеїнів у вказаній зоні. Ефективніше проявлення зон преципітації встановлено за використання у складі комплексу антигена з кополімером флуоресцеїну зразка полімеру МФ-37.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

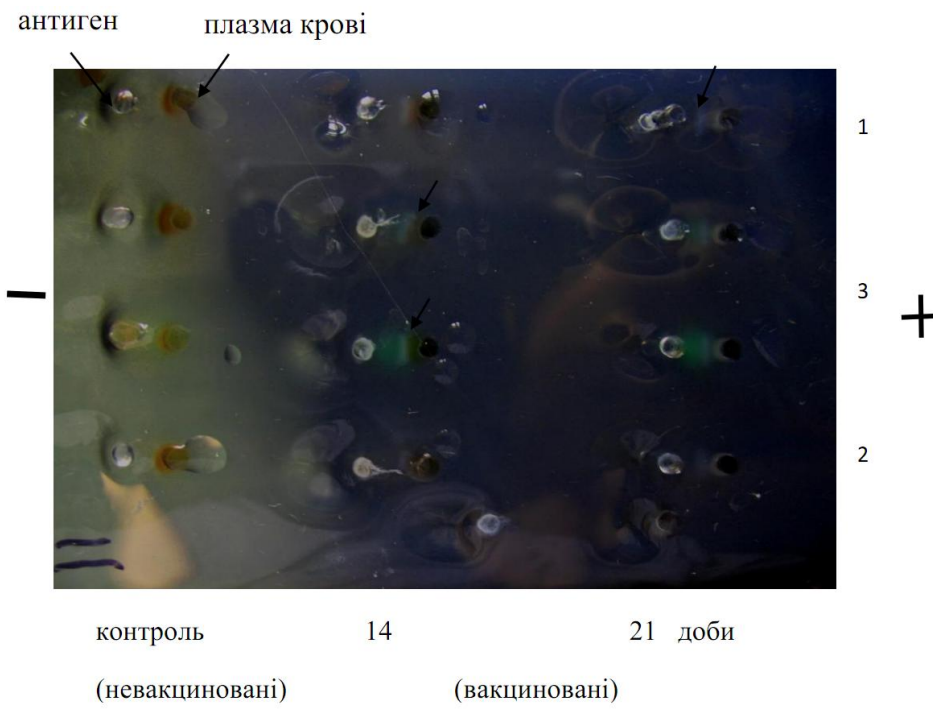
20 Спосіб посилення реакції преципітації за імуоелектрофорезу, що включає використання стандартного обладнання для імуоелектрофоретичного дослідження взаємодії специфічних антитіл з антигеном, який **відрізняється** тим, що для виявлення зон преципітації додають 1,0 % розчин кополімеру флуоресцеїну (готовий продукт) у дозі 5 мкл до 10 мл антигена (чи інактивованого збудника у складі вакцини).



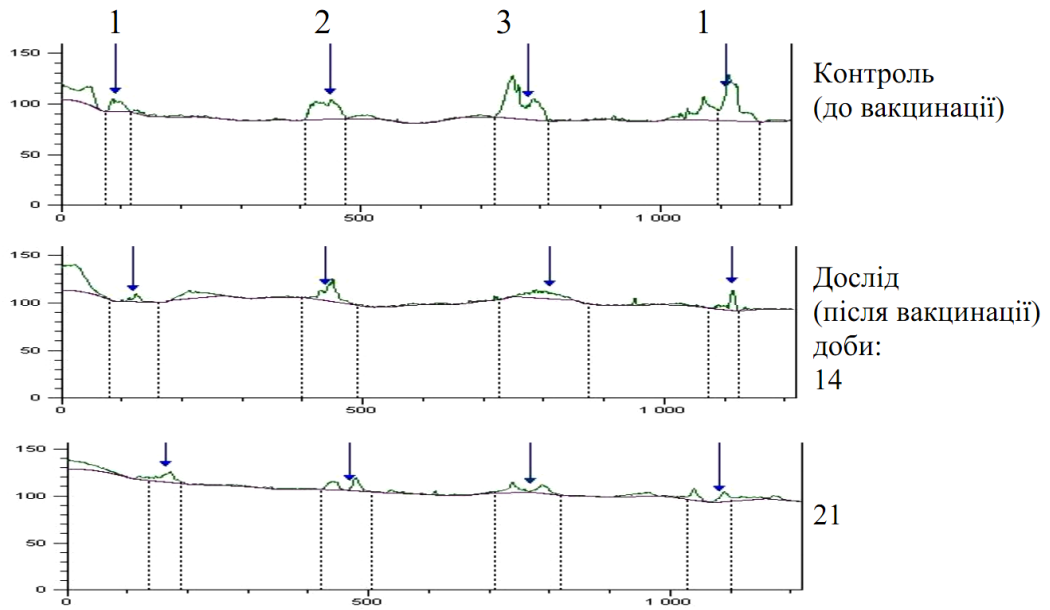
Фіг. 1



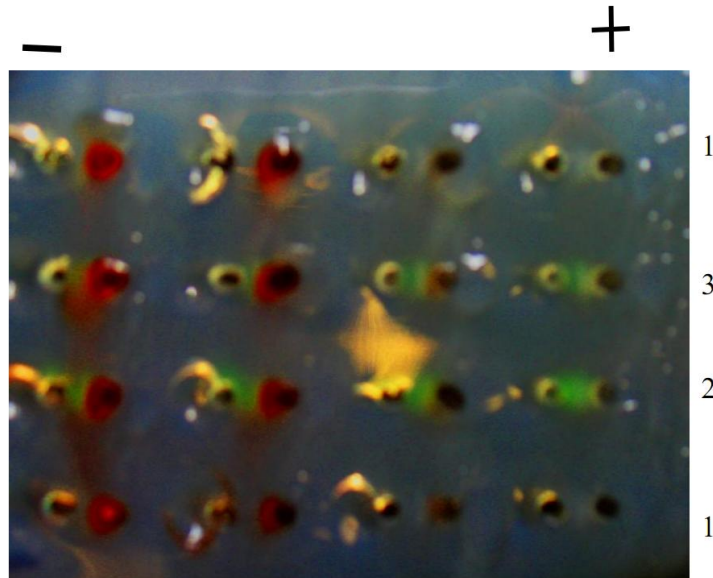
Фіг.2



Фіг.3



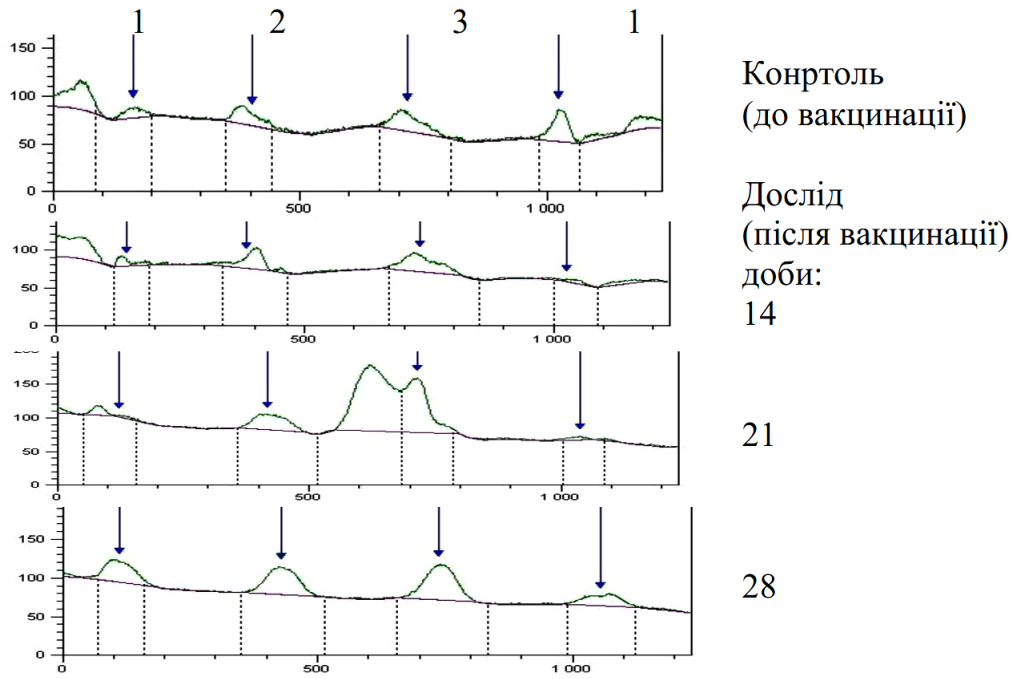
Фіг.4



контроль      14      21      28 діб  
(невакциновані)      (вакциновані)

Фіг.5





Фіг.6

---

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

---

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,  
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601