



УКРАЇНА

(19) UA (11) 34330 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 33/50

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СИРОВАТКОВИХ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ G, A, M ЛЮДИНИ

1

2

(21) u200802362

(22) 25.02.2008

(24) 11.08.2008

(46) 11.08.2008, Бюл.№ 15, 2008 р.

(72) САВЧУК ЛІЛІЯ ЯРОСЛАВІВНА, UA

(73) ІВАНО-ФРАНКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ НАФТИ І ГАЗУ, UA

(57) Спосіб визначення сироваткових імуноглобулінів G, A, M, що включає приготування основи для розчинення в ній агарового гелю, змішування гелю з антисироваткою, вирізання лунок в гелі,

внесення антигену, проведення імунодифузії з отриманням кілець преципітації в агаровому гелі, оцінку преципітату і підрахунок кількості імуноглобулінів за калібровочними графіками, відносно контрольної сироватки людини з відомими концентраціями трьох імуноглобулінів G, A, M, який **відрізняється** тим, що як основу для приготування агарового гелю використовують боратний буфер з рН 8,4 і з вмістом тетраборату натрію (бури) і борної кислоти.

Корисна модель стосується галузі медицини, а саме - лабораторної імунології: визначення сироваткових імуноглобулінів G, A, M людини. Відомі найбільш поширені тести для їх визначення - радіоімунний аналіз.

2. Імуноферментний аналіз.

3. Метод електрофорезу.

4. Метод простої радіальної імунодифузії в агаровому гелі.

Радіоімунний і імуноферментний - це імуносорбентні аналізи, які дають можливість визначати антигени і антитіла за допомогою лігандів, мічених реагентами (радіоізотопами чи ферментами). Ці методи високочутливі і економічні в використанні реактивів, дозволяють обстежувати велику кількість хворих за невеликий проміжок часу [А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. Иммунология. -М.: Мир, 2000.- 530-531с], але мають ряд недоліків: дороговартність тест - наборів; необхідність завжди мати велику кількість обстежуваних хворих (оскільки при кожній постановці розводяться контрольні сироватки і обстеження стає ще дорожчим, тому більш доцільно проводити такі тести тільки в великих централізованих лабораторіях); шкідливість реагентів для здоров'я людей, які проводять дослідження.

Відомий ще один спосіб визначення сироваткових імуноглобулінів G, A, M за допомогою електрофорезу. Цей аналіз полягає в імунодифузії і формуванні дуг преципітації білками крові в агаровому гелі, які попередньо розділені в електричному полі. Метод не є складним в виконанні і

дає можливість отримувати результати за досить короткий проміжок часу, але вимагає складного обладнання і хороших навиків у дослідника [Иммунологические методы.// под ред. Г. Фримеля - М.: Медицина, 1987. - 73-75с, 82-88с].

Найбільш близьким до запропонованого способу і відомий для будь - якої лабораторії є спосіб визначення сироваткових імуноглобулінів Ig G, Ig A, Ig M по методу Манчіні (1964): однієї радіальної дифузії в агаровому гелі [В.В. Меньшиков. Реакции преципитации: иммунные глобулины.// Справочник. Лабораторные методы исследования. -М.: Медицина, 1987. - 291-295].

Цей метод полягає в вимірюванні діаметра кілець преципітації, які утворюються внаслідок імунодифузії, досліджувальної сироватки (антигену) в шарі гелю, що містить антисироватку (антитіла). Величина преципітата відображає кількість антитіл в гелі, яка еквівалентна концентрації антигену внесеного в лунку. Площа преципітата чи квадрат діаметра кільця, прямо пропорційна кількості внесеного в лунку антигену і обернено пропорційна концентрації антитіл в агарі. При цьому між концентрацією досліджуваного антигену і площею преципітата існує лінійна залежність. Оскільки антиген - це наша досліджувальна сироватка хворої людини з невідомою концентрацією імуноглобулінів G, A, M, то маючи стандартні, контрольні сироватки крові людини з відомою концентрацією трьох імуноглобулінів G, A, M, використовуючи калібровочні графіки, знаходять невідомі рівні трьох імуноглобулінів в сироватці хворого.

UA (19) 34330 (11) 34330 (13) U

Основні етапи простої радіальної імунодифузії полягають в наступному: Готують медінал - вероналовий буфер з рН 8,6 - основу для агарового гелю. Розчиняють агар в медінал - вероналовому буфері. Змішують агар з антисироваткою (при $t +56^{\circ}\text{C}$). Заливають чашки Петрі сумішшю агар - антисироватка. Вирізають лунки в гелі. Вносять антиген. Відбувається імунодифузія з утворенням кілець преципітації в агаровому гелі. Відмивають. Висушують. Оцінюють преципітат. Підраховують кількість імуноглобулінів по калібровочних графіках відносно контрольної сироватки людини з відомими концентраціями імуноглобулінів G, A, M.

Суттєвим в даному випадку є приготування медінал-вероналового буферу (основи агарового гелю): для отримання 500мл буферу використовують - 1,38г. вероналу: 5.5 - диетилбарбітурової кислоти, порошку погано розчинного у воді і 8,76г. медіналу: 5.5 - диетилбарбітурату натрію, добре розчинного у воді.

Готують його так:

1. Підігривають 200мл дистильованої води і розчиняють медінал.
2. Додають 200мл дистилляту.
3. Висипають веронал.
4. Підігривають його до повного розчинення.
5. Залишають все на добу.
6. Через 24 години доводять буфер до мітки 500мл.

7. Отримують медінал - вероналовий буфер з рН 8,6 (основу для агарового гелю).

Власне складники буферу (основи агарового гелю) спричинили проблему: в зв'язку з зростанням наркозалежних людей в Україні практично стало неможливим отримати його інгредієнти: барбітурати (медінал і веронал).

Задачею винаходу є вдосконалення способу визначення імуноглобулінів G, A, M шляхом введення нових інгредієнтів при приготуванні буферу чи пошуку нової основи для агарового гелю, що дозволить захистити дослідника від шкідливих речовин; зробіть більш дешевшим і зменшить час проведення тесту.

Отже, перед нами виникло завдання замінити медінал - вероналовий буфер (основу для агарового гелю) на інший, більш доступний буфер або ж більш екологічно чисту основу, на якій можна приготувати агаровий гель: оскільки невеликі відхилення рН основи, на якій готують агаровий гель, не впливають на процес імунодифузії.

Поставлене завдання вирішується завдяки тому, що у способі визначення сироваткових імуноглобулінів G, A, M, який включає в себе приготування основи для розчинення в ній агарового гелю, змішування гелю з антисироваткою, вирізання лунок в гелі, внесення антигену, проведення імунодифузії з отриманням кілець преципітації в агаровому гелі, оцінку преципітата і підрахунок кількості імуноглобулінів по калібровочних графіках, відносно контрольної сироватки людини з відомими концентраціями трьох імуноглобулінів G, A, M; згідно з винаходом, як основу для приготування агарового гелю використовують боратний буфер з рН 8,4 і з вмістом тетраборату натрію (бури) і борної кислоти. Інколи як основу для агарового гелю

використовують дистильовану воду, в якій розчиняють агар.

Введення нових компонентів, на якому готують агаровий гель: бури і борної кислоти (боратний буфер) або ж просто дистильованої води дозволяє економити кошти: бура, борна кислота і дистильована вода коштують набагато дешевше, ніж медінал і веронал; зменшити затрати часу на приготування буферу: компоненти боратного буферу розчиняються краще, швидше, а на дистилляті - зразу ж можна готувати агаровий гель; заміна будь-якого буферу (основи для агарового гелю) тільки на дистильовану воду дає можливість працювати в більш екологічно чистій обстановці, оскільки медінал, веронал відносяться до сенсibiliзуючих речовин, а бура і борна кислота - до малотоксичних речовин, які навіть при зберіганні в сухому стані здатні випаровуватись і при постійній дії на організм людини здатні підвищувати виділення амінокислот з організму, а також підвищувати активність холінестерази в крові.

Згідно з винаходом, підбір основи, на якій готують агаровий гель здійснюється за допомогою речовин: бури і борної кислоти, і при проведенні тесту ми отримуємо боратний буфер: з рН 8,4, на основі якого ми готуємо агар і при внесенні в який, антисироватки і антигену, вони дифундують і утворюють кільця преципітації, які є такого ж діаметру якого були б при медінал - вероналовому буфері з рН 8,6; або ж дистильованої води, на основі якої ми готуємо агар, і при проведенні дослідження отримуємо кільця преципітації, які є такого ж діаметру якого були б при медінал - вероналовому буфері з рН 8,6 і боратному буфері з рН 8,4.

Отже, визначення сироваткових імуноглобулінів G, A, M ми проводимо за методом радіальної імунодифузії по Манчїні, в якій змінюємо тільки перший етап (основу для агарового гелю): медінал - вероналовий буфер замінюємо на боратний буфер або ж на дистильовану воду.

Приклад 1.

Готують медінал - вероналовий буфер (основу для агарового гелю):

1. Підігривають 200мл дистильованої води і розчиняють медінал.
2. Додають 200мл дистилляту.
3. Висипають веронал.
4. Підігривають його до повного розчинення.
5. Залишають все на добу.
6. Через 24 години доводять буфер до мітки 500мл.
7. Отримують медінал - вероналовий буфер з рН 8,6.

Боратний буфер (основу для агарового гелю) отримують таким чином:

1. Розчиняють 1г борної кислоти в 250мл дистильованої води (1,24% розчин борної кислоти).
2. Розчиняють 1,9г бури в 100мл дистильованої води (1,9% розчин бури).
3. Змішують 110мл 1,24% розчин борної кислоти і 90мл 1,9% розчин бури.
4. Одержують боратний буфер.
5. Розводять боратний буфер в 2 рази (робочий розчин).

Для пояснення суті нововведення та його переваг над прототипом проведено наступний експеримент (лабораторне дослідження):

1. Готують медінал - вероналовий буфер (основу для агарового гелю).
2. Зважують 2 грами агару.
3. В вогнестійку колбу вливають 100мл медінал - вероналового буферу.
4. Ставлять колбу на водяну баню.
5. Доводять буфер до кипіння.
6. Забирають з водяної бані.
7. Додають 2гр агару і розмішують.
8. Ставлять колбу на водяну баню до повного розчинення агару.
9. Розливають агаровий гель в пробірки Васермана.
11. Готують боратний буфер (основу для агарового гелю).
12. Розчиняють в ньому агар.
(Способи приготування двох буферів – основ для розчинення агару, наведено вище).
13. Розводять стандартну сироватку в 4 рази методом „перекатки“:
відкривають ампулу зі стандартом;
додають до неї 1мл фізіологічного розчину і розчиняють;
беруть чотири пластмасові пробірки і підписують;
в пробірку №1 вливають вміст ампули зі стандартною сироваткою;
в пробірки №2, №3, №4 дозатором додають по 0,5мл фізіологічного розчину;
в пробірку №2 дозатором відбирають 0,5мл розведеного стандарту з першої пробірки добре перемішують;
в пробірку №3 відбирають 0,5мл суміші з другої пробірки, перемішують;
в пробірку №4 відбирають 0,5мл суміші з третьої пробірки, перемішують;
з четвертої пробірки відбирають 0,5мл суміші і вливають.
14. Розводять антисироватки проти Ig G, IgA, Ig M:
відкривають 3 ампули з антисироватками;
додають в кожную по 1мл фізіологічного розчину і розчиняють.
15. Беруть три інсулінові шприци.
16. В перший набирають 0,6мл антисироватки проти Ig G.
17. В другий – 0,6мл антисироватки проти IgA.
18. В третій – 0,6мл антисироватки проти Ig M.
19. Беруть шість чашок Петрі.
20. Підписують відповідно: G1, A1, M1 - в ці чашки вносять агаровий гель, розчинений в медінал - вероналовому буфері.
21. В чашки Петрі з написами G2, A2 , M2 - вносять гель, приготований на боратному буфері.
22. Беруть три пробірки з агаровим гелем, приготованому на медінал вероналовому буфері.
23. Розігрівають на водяній бані до повного розчинення.
24. Охолоджують до +56°C.
25. В першу пробірку з агаром додають 0,3мл антисироватки проти Ig G.

26. В чашку Петрі (G1) вливають вміст першої пробірки і ставлять на рівну поверхню для рівномірного розподілу гелю.

27. В другу пробірку з агаровим гелем - 0,3мл антисироватки проти Ig A.

28. В чашку Петрі (A1) вливають вміст другої пробірки і ставлять на рівну поверхню.

29. В третю пробірку з агаровим гелем – 0,3мл антисироватки проти Ig M.

30. В чашку Петрі (M1) вливають вміст третьої пробірки і ставлять на рівну поверхню для рівномірного розподілу гелю.

31. Всі три чашки кладуть на 40хв в холодильник.

32. Беруть три пробірки з агаровим гелем, приготованому на боратному буфері.

33. Розігрівають на водяній бані до повного розчинення.

34. Охолоджують розігрітий агар на медіналовому буфері до +56°C.

35. В першу пробірку з агаром додають 0,3мл антисироватки проти Ig G.

36. В чашку Петрі (G2) вливають вміст першої пробірки і ставлять на рівну поверхню для рівномірного розподілу гелю.

37. В другу – 0,3мл антисироватки проти Ig A.

38. В чашку Петрі (A2) вливають вміст другої пробірки і ставлять на рівну поверхню.

39. В третю – 0,3мл антисироватки проти Ig M.

40. В чашку Петрі (M2) вливають вміст третьої пробірки і ставлять на рівну поверхню для рівномірного розподілу гелю.

41. Всі три чашки кладуть на 40хв в холодильник.

42. Виймають всі шість чашок з холодильника.

43. В кожній чашці в агаровому гелі пробійником роблять по 19 лунок.

44. В чотири верхні лунки дозатором по 0,2мкл розкачують стандартну сироватку відповідно : в першу - цільну; в другу - розведену в двічі; в третю - в тричі; в четверту - в чотири рази.

45. Беруть 15 досліджувальних сироваток хворих.

46. В кожную з шести чашок відповідно, по черзі розкачують кожную досліджувальну сироватку хворого по 0,2мкл.

47. Всі шість чашок ставлять в вологі камери.

48. Проводять імунодифузію одночасно на агарах, розчинених на різних буферах (основах).

49. Через добу беруть чашки Петрі з вологих камер і заливають оцтовою кислотою.

50. Через 5хв зливають оцет і промивають чашки Петрі водою.

51. Отримують в чашках Петрі: G1 і G2, A1 і A2, M1 і M2 однакові за розмірами кільця преципітації (див. фото 1, 2, 3).

52. Знімають прозорою лінійкою діаметр кільця і записують в журнал (див. табл.).

53. Підносять діаметр кільця преципітації до квадрату.

54. По трьох калібровочних кривих: відповідної для кожного імуноглобуліна, знаходять рівень трьох сироваткових імуноглобулінів G, A, M для кожного хворого.

Приклад 2.

Для пояснення суті нововведення та його переваг і для підтвердження теоретичної заміни практикою, ми провели з дослідженням, вказаним вище, паралельно ще один експеримент, окрім агарів, розчинених в медінал - вероналовому буфері і боратному буфері: одночасно провели імунодифузію на агаровому гелі, приготованому на новій основі - дистильованій воді. І в кінцевому підсумку отримали однакові преципітати в агарових гелях, приготованих на трьох різних основах: на медінал - вероналовому буфері, на боратному буфері і на дистильованій воді.

Суть винаходу пояснюється в таблиці і на фотографіях, де зображені:

в табл. - кільця преципітації Ig G і Ig A, отримані в агарових гелях, приготованих на трьох різних основах: медінал - вероналовому буфері, на боратному буфері і на дистильованій воді.

на фото 1 - чашка Петрі зліва : кільця преципітації Ig G, які утворились в агарі, розчиненому на медінал - вероналовому буфері;

- чашка Петрі справа : кільця преципітації Ig G, які утворились в агарі, розчиненому на боратному буфері.

на фото 2 - чашка Петрі зліва: кільця преципітації Ig G в агаровому гелі, приготованому на дистильованій воді;

справа чашка Петрі з преципітатами Ig G, які утворились в агаровому гелі, розчиненому в боратному буфері.

на фото 3 - кільця преципітації Ig A, утворені в агарових гелях, приготованих на трьох основах (зліва на право): на медінал - вероналовому буфері, на боратному буфері і на дистильованій воді. Спосіб здійснюється таким чином: заміною медінал – вероналового буферу, на основі якого готують агаровий гель, на боратний або на дистильовану воду, яка дозволяє зробити дослідження екологічно чистішим і безпечнішим.

Таблиця

Результати експерименту: кільця преципітації Ig G і Ig A, отримані на трьох різних основах

Порядкові номери стандартних сироваток і сироваток хворих	Діаметри кілець преципітації IgG 1 отриманих в агаровому гелі, розчиненому в медінал – вероналовому буфері (мм)	Діаметри кілець преципітації IgG 2 отриманих в агаровому гелі, розчиненому в боратному буфері (мм)	Діаметри кілець преципітації IgG 3, отриманих в агаровому гелі, розчиненому в дистильованій воді (мм)	Діаметри кілець преципітації IgA 1, отриманих в агаровому гелі, розчиненому в медінал – вероналовому буфері (мм)	Діаметри кілець преципітації IgA 2, отриманих в агаровому гелі, розчиненому в боратному буфері (мм)	Діаметри кілець преципітації IgA 3, отриманих в агаровому гелі, розчиненому в дистильованій воді (мм)
1 (St)	10,80	10,80	10,80	8,00	8,00	8,00
12 (St)	9,50	9,50	9,50	7,50	7,50	7,50
14 (St)	8,80	8,80	8,80	6,50	6,50	6,50
18 (St)	7,90	7,90	7,90	5,60	5,60	5,60
1	10,80	10,80	10,80	8,00	8,00	8,00
2	9,60	9,60	9,60	7,50	7,50	7,50
3	8,50	8,50	8,50	6,60	6,60	6,60
4	9,50	9,50	9,50	8,00	8,00	8,00
5	9,00	9,00	9,00	5,20	5,20	5,20
6	9,00	9,00	9,00	8,00	8,00	8,00
7	9,20	9,20	9,20	5,20	5,20	5,20
8	9,70	9,70	9,70	7,50	7,50	7,50
9	9,50	9,50	9,50	7,50	7,50	7,50
10	9,50	9,50	9,50	8,00	8,00	8,00
11	9,50	9,50	9,50	8,00	8,00	8,00
12	9,50	9,50	9,50	8,00	8,00	8,00
13	8,80	8,80	8,80	5,60	5,60	5,60
14	8,50	8,50	8,50	7,50	7,50	7,50
15	10,60	10,60	10,60	6,50	6,50	6,50

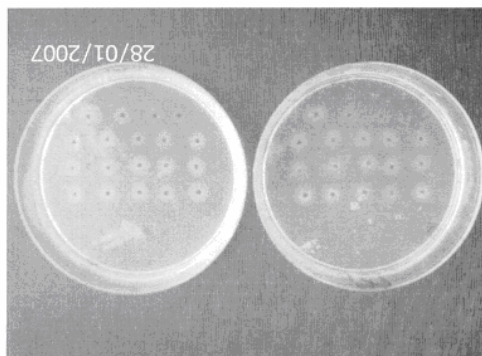


Фото 1

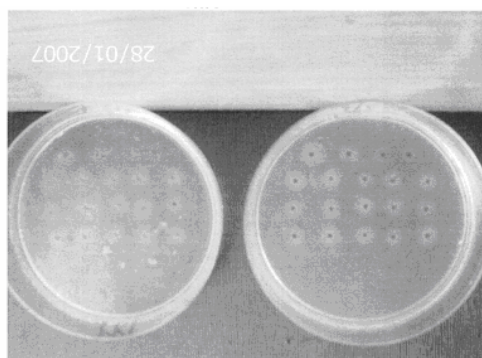


Фото 2

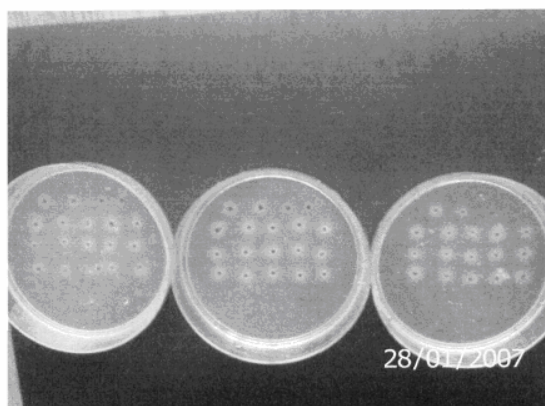


Фото 3