



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012131977/15, 26.07.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.07.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.07.2012

(43) Дата публикации заявки: 10.02.2014 Бюл. № 4

(45) Опубликовано: 10.12.2014 Бюл. № 34

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU2395092 C2, 20.07.2010. KR20100138619 A, 31.12.2010. YUAN J., et al., Lanthanide complex-based fluorescence label for time-resolved fluorescence bioassay. J Fluoresc. 2005 Jul;15(4):559-68. YOO J., et al., Quantitative analysis of a prostate-specific antigen in serum using fluorescence immunochromatography. J Immunoassay Immunochem. 2010;31(4):259-65. doi: 10.1080/15321819.2010.524855

Адрес для переписки:

119071, Москва, Ленинский пр-кт, 33, стр.2,
Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,
Патентоведу Т.М. Мелентьевой

(72) Автор(ы):

Сотников Дмитрий Васильевич (RU),
Жердев Анатолий Виталиевич (RU),
Дзантиев Борис Борисович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биохимии
имени А.Н. Баха РАН Российской академии
наук (ИНБИ РАН) (RU)

(54) СПОСОБ ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА С ДИССОЦИИРУЮЩЕЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МЕТКОЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и касается способа проведения иммунохроматографического анализа с диссоциирующей флуоресцентной меткой, в котором на мембранной тест-полоске формируют комплексы, в состав которых входят молекулы антигена или антигенов, специфичные к ним антитела и молекулы метки. При этом после проведения анализа метка экстрагируется из

рабочей мембраны тест-полоски и флуоресцентный сигнал измеряется в объеме жидкости. Способ по изобретению обеспечивает оптимальные условия для флуоресценции метки, а так же устранение мешающего влияния мембраны, которая, будучи непрозрачной, уменьшает интенсивность как возбуждающего, так и испускаемого света. 1 ил., 1 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 535 061** (13) **C2**

(51) Int. Cl.
G01N 33/52 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2012131977/15, 26.07.2012**

(24) Effective date for property rights:
26.07.2012

Priority:

(22) Date of filing: **26.07.2012**

(43) Application published: **10.02.2014** Bull. № 4

(45) Date of publication: **10.12.2014** Bull. № 34

Mail address:

**119071, Moskva, Leninskij pr-kt, 33, str.2, Institut
biokhimii im. A.N. Bakha RAN, Patentovedu T.M.
Melent'evoj**

(72) Inventor(s):

**Sotnikov Dmitrij Vasil'evich (RU),
Zherdev Anatolij Vitalievich (RU),
Dzantiev Boris Borisovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
uchrezhdenie nauki Institut biokhimii imeni
A.N. Bakha RAN Rossijskoj akademii nauk
(INBI RAN) (RU)**

(54) **METHOD FOR CARRYING OUT IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY WITH DISSOCIATING FLUORESCENT TAG**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine and concerns a method for carrying out an immunochromatographic assay with a dissociating fluorescent tag, wherein complexes comprising molecules of an antigen or antigens, specific antibodies and tag molecules are formed on a membrane test strip. After the assay is completed, the tag is extracted from

the working membrane of the test strip, and a fluorescent signal is measured in a liquid volume.

EFFECT: method according to the invention provides creating the optimum conditions for tag fluorescence, as well as eliminating the harmful influence of the membrane which is impermeable to decrease an intensity of both exciting and emitted light.

1 dwg, 1 ex

RU 2 535 061 C 2

RU 2 535 061 C 2

Изобретение относится к иммунологии и биотехнологии и представляет собой способ иммунохроматографического анализа с диссоциирующей флуоресцентной меткой.

Иммунохроматографический способ оценки содержания различных соединений широко используется в практике медицинской диагностики [Raphael C. Wong | Harley Y. Tse (Editors) (2009) Lateral Flow Immunoassay. Springer, USA].

Иммунохроматографический анализ может быть реализован в нескольких вариантах. Рассмотрим в общем виде схему «сэндвич»-формата иммунохроматографии как одного из наиболее часто используемых. Проба, потенциально содержащая определяемое соединение, под действием капиллярных сил перемещается вдоль тест-полоски. При этом она вначале взаимодействует с меченым компонентом (чаще всего антителами против определяемого соединения), затем фронт жидкости преодолевает участок (аналитическую зону) с иммобилизованным компонентом, связывающим определяемое соединение. Степень связывания метки в аналитической зоне и, соответственно, интенсивность окрашивания мембраны определяются концентрацией аналита в пробе. Основными преимуществами иммунохроматографического анализа являются быстрота получения результата (5-15 мин) и возможность бесприборной детекции. В качестве метки в подавляющем большинстве случаев используются частицы коллоидного золота. [Babacar Ngom & Yancheng Guo & Xiliang Wang & Dingren Bi. (2010) Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review // Anal Bioanal Chem 397:1113-1135]. Однако если требуется повысить чувствительность анализа, используются другие маркеры, например флуоресцентные красители [Yoo, Jisun, Jung, Young Mee, Hahn, Jong Hoon, Pyo, Dongjin (2010) 'QUANTITATIVE ANALYSIS OF A PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN IN SERUM USING FLUORESCENCE IMMUNOCHROMATOGRAPHY', Journal of Immunoassay and Immunochemistry, 31:4, 259-265]. Хотя в таком случае для регистрации сигнала требуется дополнительное оборудование, данный подход позволяет сочетать быстроту получения результата (благодаря использованию принципа иммунохроматографии) и высокочувствительную детекцию (благодаря низкому пределу обнаружения флуоресцентного красителя).

По сравнению с органическими флуоресцентными красителями флуоресцентные лантанидные (Eu^{3+} , Sm^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , ...) комплексы обладают такими преимуществами, как длительное время жизни флуоресценции (до 1000 микросекунд), большой стоксовский сдвиг (>250 нм), узкий профиль эмиссии, что позволяет применять их в методе микросекундной спектроскопии с временным разрешением [Yuan J., Wang G. (2005) Lanthanide complex-based fluorescence label for time-resolved fluorescence bioassay. J. Fluorescence, 15, 559-568].

Флуоресцентные метки на основе лантанидных комплексов успешно используют в высокочувствительных разрешенных во времени флуоресцентных иммунологических методах. Благодаря тому, что технология регистрации сигнала с временным разрешением позволяет легко отделить специфический долгоживущий флуоресцентный сигнал метки от короткоживущих фоновых шумов в биопробах и избавиться от эффектов светорассеяния (рассеяния Тиндалля, Релея и Рамана), предел детекции метода значительно повышается [Yuan J., Wang G. (2005) Lanthanide complex-based fluorescence label for time-resolved fluorescence bioassay. J. Fluorescence, 15, 559-568.], [Hemmila I. (1985) Fluoroimmunoassays and immunofluorometric assays. Clin. Chem., 31, 359-370].

Формирование комплексов с некоторыми органическими лигандами значительно усиливает флуоресценцию ионов лантаноидов. После поглощения света лигандом происходит эффективный перенос энергии с возбужденного синглетного энергетического

уровня через триплетный уровень на резонансный энергетический уровень металла [Ferrari M., Ozkan M. and Heller M.J. (2007) BioMEMS and Biomedical Nanotechnology. Volume II: Micro/Nano Technologies for Genomics and Proteomics. - Springer US].

Для диссоциативного метода анализа используют первичные комплексы полиаминополикарбоксилатных хелаторов с лантанидами, которые демонстрируют высокую стабильность и растворимость в воде. Большая часть комплексонов образует лантанидные хелаты с константами связывания порядка 10^{15} M^{-1} . Для конъюгирования метки с антителами в структуре комплексона присутствует соответствующая химическая группа, такая как, например, диазофенил-ЭДТА или аминифенил-ЭДТА. Эти комплексоны хорошо подходят для диссоциативного анализа с последующим усилением флуоресценции посредством добавления β -дикетонатов. На этом принципе построена система анализа DELFIA (Dissociative-Enhanced Lanthanide Fluorescence Immunoassay). В этой системе европий диссоциирует из комплексона (ИТЦ-ДТТА-Eu) в кислой среде, а затем измеряется флуоресценция хелата Eu с β -дикетон-три-н-октилфосфином в мицеллярном водном растворе [Yuan J., Wang G. (2005) Lanthanide complex-based fluorescence label for time-resolved fluorescence bioassay. J. Fluorescence, 15, 559-68].

Для регистрации флуоресценции лантанидных комплексов используют метод флуориметрии с временным разрешением. После краткосрочного облучения образца люминесценция всех молекул и кюветы (планшета) начинает экспоненциально расти. Короткоживущая фоновая флуоресценция быстро убывает и не мешает измерению флуоресценции метки. Это позволяет измерять исключительно долгоживущую флуоресценцию лантанидной метки. Обычно проводят множество циклов измерений для одного образца (в течение 1 с), что улучшает соотношение сигнал/шум при подсчетах [Hemmila I. (1985) Fluoroimmunoassays and immunofluorometric assays. Clin. Chem., 31, 359-70].

Несмотря на отмеченные выше достоинства диссоциирующих лантанидных меток, ранее данный подход не применялся для усиления сигнала в иммунохроматографических системах.

Если детекция сигнала метки производится не с поверхности мембраны, а из раствора, то в объеме раствора можно создать оптимальные условия для флуоресценции метки, а так же устранить экранирование светового сигнала мембраной тест-полоски. Для этого заявителями предлагается после проведения иммунохроматографического анализа экстрагировать связанные в аналитической зоне молекулы метки и проводить приборную регистрацию активности флуоресцентной метки в объеме экстрагирующего раствора.

Достоинства, сформулированные выше, подтверждены экспериментально и демонстрируются приведенным ниже примером.

Пример:

40 Определение концентрации моноклональных антител НТМ81 против рекомбинантного антигена 38 кДа *Mycobacterium tuberculosis*.

1. Получение конъюгата антител с ИТЦ-ДТТА-Eu

Для конъюгации использовали набор «DELFLIA® Eu-Labeling kit 1244-302» производства компании PerkinElmer™ (Wallac Oy, Финляндия), содержащий:

45 1) «Eu-labelling reagent» - 0,2 мг (300 нм) N^1 -(п-изотиоцианатобензил)-диэтилентриамин- $\text{N}^1, \text{N}^2, \text{N}^3, \text{N}^4$ -тетраацетат Eu^{3+} (ИТЦ-ДТТА-Eu), лиофилизированный.

2) Усиливающий раствор «DELFLIA® Enhancement Solution») - Тритон-X100, уксусная кислота и хелаторы.

2 мг моноклональных антител (мАт) ТВ38 с1.81 в 1 мл 0.1 М карбонатного буфера, рН 8.5 (антитела переводили в буфер диализом в течение 35 мин) перемешивали с 0.2 мл 7.5 мМ водного раствора «Eu-labelling reagent» (ИТЦ-ДТТА-Eu, 500-кратный избыток). Смесь оставляли на ночь при +4°C. Очистку конъюгата мАт-ИТЦ-ДТТА-Eu проводили методом гель-фильтрации с использованием колонки 1.5×28 см с носителем Sephadex G-50, уравновешенной 50 мМ трис-НСl с 0.15 М NaCl и 0.05% NaN₃, рН 7.75.

Оптическую плотность полученных фракций измеряли на спектрофотометре Shimadzu 1202 при длине волны 280 нм. Для определения количества включившейся метки аликвоты антител разводили в усиливающем растворе в соотношении 1:10000 до конечного объема 200 мкл в лунках микропланшета, инкубировали 2 мин, а затем регистрировали флуоресценцию на планшетном ридере EnSpire 2300 производства компании PerkinElmer™.

2. Определение количества антител, меченных ИТЦ-ДТТА-Eu, с использованием усиления флуоресценции

В методе использовали хелат Eu³⁺ с N¹(п-изоцианатбензил)диэтилен триамин-N¹,N²,N³,N³-тетрауксусной кислоты (ИТЦ-ДТТА-Eu) в качестве метящего реагента. К препарату меченых антитела или конъюгата антител с КЗ добавляли раствор β-дикетона (2-нафтилтрифлуороацетон β-НТА) и слабокислый усиливающий флуоресценцию раствор (рН 3,2), содержащий триоктилфосфиноксид (ТОРО) и Тритон Х-100. Ион Eu³⁺ из меченого агента переходил в раствор и связывался с лигандом. При этом раствор превращался в сильно флуоресцирующий мицеллярный раствор, содержащий Eu(β-ИТА)₃(ТОРО)₂ хелат, флуоресценцию которого измеряли методом флуорометрии с временным разрешением на приборе Wallac 1234 Fluorimetr (Perkin Elmer, Финляндия) [Ferrari M., Ozkan M., Heller M.J. (2007) BioMEMS and Biomedical Nanotechnology. Volume II: Micro/Nano Technologies for Genomics and Proteomics. - Springer US]. Параметры регистрации флуоресценции Eu³⁺: время задержки 0.1 мс, частота вспышки 1 мс, время считывания сигнала 0.4 мс, возбуждение на 340 нм и регистрация флуоресценции на 615 нм.

Построение калибровочного графика для определения количества связавшейся метки на молекулу антитела. Меченые антитела (объемом 2-20 мкл, концентрация 1-100 мкг/мл) разводили в усиливающем растворе до конечного объема 200 мкл в лунках разборного прозрачного микропланшета из набора «DELFIА® Eu-Labeling kit 1244-302», инкубировали 10 мин при комнатной температуре, затем измеряли флуоресценцию. Содержание антител во фракциях и количество включившейся метки в полученных препаратах меченых антител рассчитывали по следующим формулам:

$$C(\text{Eu}^{3+}) = \frac{E_{613} * A}{1000 * B} (\text{мкМ}),$$

где А=10000 - фактор разведения;

В=1000000 - сигнал стандартного препарата 1 нМ Eu³⁺;

$$C_1(\text{мАт}) = \frac{A_{280} - 0,008 * C(\text{Eu}^{3+})}{1,34} (\text{мг / мл});$$

$$C_2(\text{мАт}) = \frac{C_1(\text{мАт}) * 1000000}{160000} (\text{мкМ});$$

где 1,34 - поглощение 1 мг/мл антител при 280 нм, 160000 - молекулярная масса IgG,

0,008 - поглощение 1 мкМ хелатного комплекса европия при 280 нм.

Соотношение количества связавшейся метки к количеству антител составило 0,57.

3. Построение калибровочного графика для определения концентрации меченых антител, иммобилизованных на иммунохроматографической мембране, по флуоресценции Eu^{3+}

Антитела наносили на рабочую мембрану CNPC-SN12 L2-P25 (размер пор 15 мкм) «mdi Easypack» фирмы «Advanced Microdevices» (Индия). Затем отрезали участок рабочей мембраны с иммобилизованными антителами и помещали в эппендорф, заполняли эппендорф 100 мкл усиливающего раствора «DELFLIA® Enhancement Solution», инкубировали 2 мин, отбирали аликвоты 50 мкл и регистрировали флуоресценцию на планшетном ридере EnSpire 2300 производства компании PerkinElmer™.

Калибровочная кривая определения антител представлена на чертеже.

Предел детекции согласно существующим рекомендациям [Бурдун Г.Д., Марков Б.Н. (1975) Основы метрологии, 2-е изд., М.], [Чарыков А.К. (1984) Математическая обработка результатов химического анализа, Л.] определяли как концентрацию, дающую значение сигнала, равное фоновому сигналу (640 единиц) плюс 3 стандартных отклонения фонового сигнала ($3 \cdot 197$ единиц). Предел детекции антител составил 0,9 нг/мл, что соответствует пределу детекции метки $3,1 \cdot 10^{-12}$ М с учетом отношения количества связавшейся метки к количеству антител.

4. Определение предела детекции коллоидного золота, как метки в иммунохроматографическом анализе (для сравнения пределов детекции двух меток)

На иммунохроматографическую мембрану CNPC-SN12 L2-P25 наносили растворы, представляющие собой ряд разведений частиц коллоидного золота размером 25 нм. Затем сканировали изображение тест-полоски и оцифровывали, количественно оценивая интенсивность окраски коллоидного золота на мембране с помощью программы «Nonlinear Dynamics TotalLab TL120 v2009». Как и в случае с флуоресцентной меткой, предел детекции определяли как концентрацию метки, дающую интенсивность окрашивания, на три стандартных отклонения превышающую фоновый сигнал. Предел детекции коллоидного золота составил $1,3 \cdot 10^{-10}$ М, что (при соотношении 1 антитело на 1 частицу коллоидного золота) соответствует пределу детекции антител, равному 20 нг/мл.

Таким образом, предел детекции антител при использовании диссоциирующей флуоресцентной метки более чем в 20 раз ниже, чем при использовании традиционной метки - коллоидного золота (0,9 нг/мл и 20 нг/мл соответственно).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Чертеж. Калибровочный график для определения концентрации меченых антител, иммобилизованных на иммунохроматографической мембране, по флуоресценции Eu^{3+}

Формула изобретения

Способ проведения иммунохроматографического анализа с диссоциирующей флуоресцентной меткой, в котором на мембранной тест-полоске формируют комплексы, в состав которых входят молекулы антигена или антигенов, специфичные к ним антитела, и молекулы метки, отличающийся тем, что после проведения анализа метка экстрагируется из рабочей мембраны тест-полоски и флуоресцентный сигнал измеряется в объеме жидкости.

