



УКРАЇНА

(19) UA (11) 37295 (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) u200807056

(22) 21.05.2008

(24) 25.11.2008

(46) 25.11.2008, Бюл.№ 22, 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 по каліброваних графіках, відносно контрольної сироватки людини з відомими концентраціями трьох імуноглобулінів G, A, M, який **відрізняється** тим, що як основу для приготування агарового гелю використовують дистильовану воду, в якій розчиняють агар.

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

1. 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 визначити 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: дороговартністість 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, досліджуваної сироватки (антигену) в шарі гелю, що містить антисироватку (антитіла). Величина преципітату відображає кількість антитіл в гелі, яка еквівалентна концентрації антигену внесеного в лунку. Площа преципітату 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 преципітату 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.

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

(13) U

(11) 37295

(19) UA

буфері. Змішують агар з антисироваткою (при t +56С). 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 розчинному у воді і 8,76г. медіналу : 5.5 - диетилбарбітурату натрію, добре розчинному 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 корисної моделі є вдосконалення способу визначення сироваткових імуноглобулінів G, A, M шляхом введення нових інгредієнтів при приготуванні буферу - нової основи для агарового гелю, що зробить тест більш дешевшим і дозволить зменшити час на його проведення.

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 корисною моделлю, як основу для приготування агарового гелю використовують дистильовану воду, в якій розчиняють агар.

Введення нового компонента, на якому готують агаровий гель :дистильованої води, дозволяє економити кошти: дистильована вода коштує набагато дешевше, ніж медінал і веронал; зменшити затрати часу на приготування буферу - 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.

Згідно з корисною моделлю, підбір основи, на якій готують агаровий гель здійснюється за допомогою тільки однієї речовини: дистильованої води і при проведенні тесту ми отримуємо основу, на якій 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.

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

Приклад виконання на медінал - вероналовому буфері (найближчий аналог). 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. Беруть дистильовану воду.

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

1. Готують медінал - вероналовий буфер (основу для агарового гелю).
2. Зважують 2г 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 2г агару і розмішують.
8. Ставлять колбу на водяну баню до повного розчинення агару.

9. Розливають агаровий гель в пробірки Васермана.

11. Беруть дистильовану воду (основу для агарового гелю).

12. Розчиняють в ній агар.

(Спосіб приготування медінал - вероналового буферу - основи 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 виливають 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 виливають.

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 дистильованій воді.

22. Беруть три пробірки з агаровим гелем, приготованому на медінал-вероналовому буфері.

23. Розігрівають на водяній бані до повного розчинення.

24. Охолоджують до +56С.

25. В першу пробірку з агаром додають 0.3мл антисироватки проти Ig G.

26. В чашку Петрі (G1) виливають 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) виливають 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) виливають 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 дистильованій воді.

33. Розігрівають на водяній бані до повного розчинення.

34. Охолоджують розігрітий агар на медіналовому буфері до +56С

35. В першу пробірку з агаром додають 0.3мл антисироватки проти Ig G.

36. В чашку Петрі (G2) виливають 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) виливають вміст другої пробірки і ставлять на рівну поверхню.

39. В третю - 0.3мл антисироватки проти Ig M.

40. В чашку Петрі (M2) виливають 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 розкапують 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 розкапують кожную досліджувальну сироватку хворого по 0.2мкл.

47. Всі шість чашок ставлять в вологі камери.

48. Проводять імунодифузію одночасно на агарах, розчинених на різних 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. Фіг.1, 2).

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.

55. В кінцевому підсумку отримують на двох агарах, приготованих на різних основах, однаковий вміст сироваткових імуноглобулінів G, A, M.

Суть корисної моделі пояснюється в таблиці і на Фіг., де зображені :

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

- на Фіг.1 - чашка Петрі зліва : кільця преципітації Ig G, які утворились в агарі, розчиненому на медінал - вероналовому буфері; - чашка Петрі справа : кільця преципітації Ig G в агаровому гелі, приготованому на дистилаті;

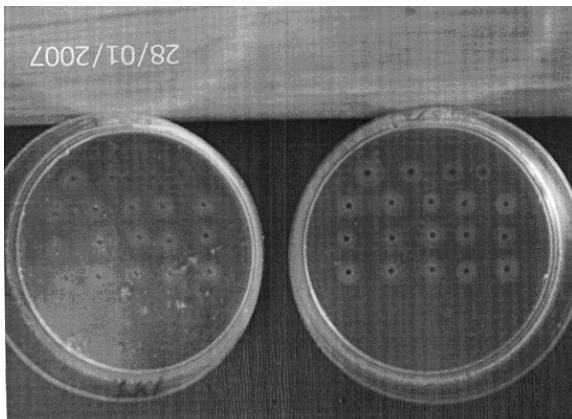
- на Фіг.2 - кільця преципітації Ig A, утворені в агарових гелях, приготованих на двох основах : крайня, зліва чашка Петрі - з медінал - вероналовим буфером ; крайня, справа чашка Петрі - з дистильованою водою.

Спосіб здійснюється таким чином : заміною медінал - вероналового буферу, на основі якого готують агаровий гель на дистильовану воду, яка дозволяє зробити дослідження екологічно чистішим і безпечнішим.

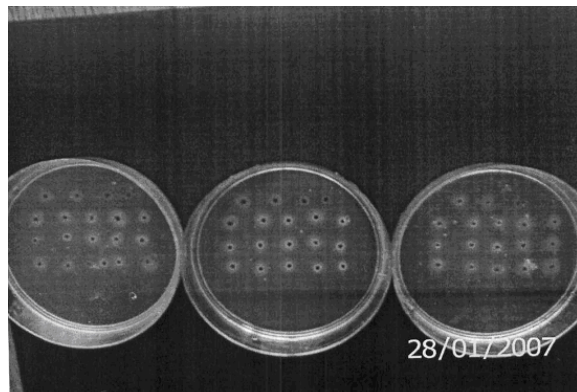
Таблиця

Результати експерименту: кільця преципітації IgG I IgA, отримані на двох різних основах.

Порядкові номери стандартних сироваток і сироваток хворих	Діаметри кілець преципітації IgG1 отриманих в агаровому гелі, розчиненому в медінал – вероналовому буфері (мм)		Діаметри кілець преципітації IgG2, IgA1, отриманих в агаровому гелі, розчиненому в дистильованій воді (мм)		Діаметри кілець преципітації IgA2, Отриманих в агаровому гелі, розчиненому в дистильованій воді (мм)	
	Діаметри кілець преципітації IgG1 отриманих в агаровому гелі, розчиненому в медінал – вероналовому буфері (мм)	Діаметри кілець преципітації IgG2, IgA1, отриманих в агаровому гелі, розчиненому в дистильованій воді (мм)	Діаметри кілець преципітації IgA1, отриманих в агаровому гелі, розчиненому в медінал – вероналовому буфері (мм)	Діаметри кілець преципітації IgA2, Отриманих в агаровому гелі, розчиненому в дистильованій воді (мм)	Діаметри кілець преципітації IgA2, Отриманих в агаровому гелі, розчиненому в дистильованій воді (мм)	Діаметри кілець преципітації IgA2, Отриманих в агаровому гелі, розчиненому в дистильованій воді (мм)
1 (St)	10.80	10.80	8.00	8.00	8.00	8.00
12 (St)	9.50	9.50	7.50	7.50	7.50	7.50
14 (St)	8.80	8.80	6.50	6.50	6.50	6.50
18 (St)	7.90	7.90	5.60	5.60	5.60	5.60
1.	10.80	10.80	8.00	8.00	8.00	8.00
2.	9.60	9.60	7.50	7.50	7.50	7.50
3.	8.50	8.50	6.60	6.60	6.60	6.60
4.	9.50	9.50	8.00	8.00	8.00	8.00
5.	9.00	9.00	5.20	5.20	5.20	5.20
6.	9.00	9.00	8.00	8.00	8.00	8.00
7.	9.20	9.20	5.20	5.20	5.20	5.20
8.	9.70	9.70	7.50	7.50	7.50	7.50
9.	9.50	9.50	7.50	7.50	7.50	7.50
10.	9.50	9.50	8.00	8.00	8.00	8.00
11.	9.50	9.50	8.00	8.00	8.00	8.00
12.	9.50	9.50	8.00	8.00	8.00	8.00
13.	8.80	8.80	5.60	5.60	5.60	5.60
14.	8.50	8.50	7.50	7.50	7.50	7.50
15.	10.60	10.60	6.50	6.50	6.50	6.50



Фіг. 1



Фіг. 2