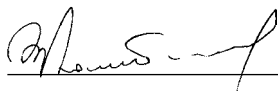


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра



В.В. Колбанов

31 декабря 2003 г.

Регистрационный № 104-0803

**СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ И ОЧИСТКИ
АНТИГЕННО-АКТИВНОГО
НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКОГО БЕЛКА ГРУППЫ
S100В С МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ 20,1 КД
ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЕГО В КАЧЕСТВЕ
ПОКРЫТИЯ ТВЕРДОЙ ФАЗЫ
В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ
ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИТЕЛ К НЕМУ**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Гомельский государственный медицинский университет

Авторы: Н.Л. Захарова, проф. С.В. Жаворонок

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Показанием к применению предлагаемого метода является качественное определение антител к нейроспецифическому белку группы S100B с молекулярной массой 20,1 кД (НСБ-S100B-20,1) в сыворотке или плазме крови человека методом непрямого иммуноферментного анализа для лабораторной диагностики, мониторинга лекарственной терапии аутоиммунных заболеваний центральной нервной системы (ЦНС), а также для дифференциальной диагностики между органическими и функциональными поражениями ЦНС.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Холодильник.
2. pH-метр.
3. Электрическая плитка.
4. Спектрофотометр.
5. Ультрацентрифуга.
6. Хроматографическая колонка.
7. Система для электрофореза.
8. Жидкостной хроматограф.
9. Аналитические весы.
10. Фосфатный буферный раствор pH 8,0 с добавлением 1 г/л тритона X-100, 1 г/л твина-80 и 10 ммоль ЭДТА; фосфатный буферный раствор pH 7,4, сульфат аммония; сефадекс G50; уксуснокислый барий; DEAE-Toyorearl 650 моль; 12,5% раствор полиакриамидного геля (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (ДСН); 0,1 моль раствор NaCl; калибровочные препараты НСБ S100A и НСБ S100B.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ

Предлагаемый способ получения и очистки антигенно-активного нейроспецифического белка группы S100B с молекулярной массой 20,1 кД апробирован и используется для применения НСБ-S100B-20,1 в качестве покрытия твердой фазы в иммуноферментном анализе для качественного определения антител к нему.

Замороженные образцы мозговой ткани гомогенизировали в 3 объемах 0,01 моль фосфатного буфера рН 8,0 с добавлением 1 г/л тритона X-100, 1 г/л твина-80 и 10 ммоль ЭДТА (исходный буферный раствор), прогревали при 80° С в течение 20 мин и центрифугировали при 10 000 г 60 мин. Осадок удаляли, а к надосадочной жидкости I добавляли сульфат аммония до 60% насыщения (390 г/л) и выдерживали 12 ч при 4° С, повторно центрифугировали при 20 000 г 60 мин, собирали надосадочную жидкость II, доводили концентрацию сульфата аммония до 100% (305 г/л) и снижали рН до 4,0 с помощью 0,1 моль HCl. Спустя 12 ч инкубации при 4° С выпавшие в осадок белки собирали центрифугированием при 10 000 г в течение 30 мин. Высоленные белки растворяли в минимальном объеме исходного буферного раствора. Обессоливание растворенных белков проводили на колонке с сефадексом G50 («Реанал», Венгрия) (1,5 × 100 см), уравновешенной фосфатным буферным раствором, рН 7,4. Имея относительно большой молекулярный вес, белки, в отличие от сульфата аммония, не проникают внутрь гранул сефадекса и выходят с колонки значительно быстрее соли. Наличие ионов сульфата фиксировали (качественно) с помощью ионов бария. Для этого к элюату добавляли 0,5–1,0 мл уксуснокислого бария. Появление при этом мути указывало на наличие ионов сульфата. Далее обессоленные белки наносили на колонку с DEAE-Toyopearl 650 моль («Тоуо Soda», Япония), уравновешенную фосфатным буферным раствором, рН 7,4, и проводили ионообменную хроматографию (колонка 1,0 × 100 см). После отмывки несвязавшихся белков проводили элюацию связавшегося материала, используя десятикратный к объему колонки линейный градиент концентраций 0,1⁻¹ моль раствора NaCl, и получили 4 фракции нейроспецифических белков группы S100.

Для сравнительной оценки антигенной активности отдельных фракций HCB группы S100 их сорбировали в концентрации 5 мкг/мл в лунки плоскодонных 96-луночных планшет производства фирмы «Dynatech» (Швейцария) в течение 16–18 ч при +4° С. Для блокирования свободных участков связывания во все лунки вносили по 10 мкл 1% бычьего сывороточного альбумина («Реанал», Венгрия). Планшеты инкубировали во влажной камере при 20° С в те-

чение 1 ч. Несвязавшиеся белки пятикратно отмывали 0,01 моль фосфатным буферным раствором (рН 7,4), содержащим 0,9% NaCl и 0,1% твина-80 (ФСРТ). В лунки вносили стандартные моноклональные антитела к НСБ группы S100B («Sigma», США) в разведении 1:1000 (положительный контроль) и сыворотки крови доноров в разведении 1:100 (негативный контроль) с последующей инкубацией планшетов в течение 24 ч при 20° С и промыванием в тех же условиях. Далее в лунки вносили по 100 мкл рабочего раствора анти-IgG («ИмБио», Нижний Новгород), конъюгированного с пероксидазой хрена, и инкубировали в течение 1 ч при 37° С. После отмывания несвязавшегося конъюгата реакцию проявляли раствором 0,1% ортофенилендиамина в 0,05 моль цитратном буферном растворе (рН 5,0), содержащем 0,01% перекиси водорода. Реакцию останавливали 1 моль раствором серной кислоты. Учет результатов проводили спектрофотометрически при длине волны 492 нм с использованием АИФ-М/340 (ПО «Витязь», Витебск). Результаты анализа считали положительными, если оптическая плотность исследуемого образца в 2,5 раза и более превышала среднее значение оптической плотности негативного контроля и была не ниже 0,4 оптических единиц. Исследования проводили в дубликатах. Наибольшей антигенной активностью обладала фракция, элюируемая с ионообменного носителя при 0,1 моль NaCl.

Промежуточный контроль чистоты полученной фракции и определение ее молекулярной массы (белки-стандарты фирмы «Sigma», США) проводили с использованием электрофореза в 12,5% ПААГ с ДСН. Идентификацию выделенной белковой фракции выполнили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Zorbax 300 SB-C18 (4,6 × 150 мм, скорость потока — 1000 мл/мин, температура — 30° С) хроматографа «Agilent-1100» (Германия) с использованием калибровочных препаратов НСБ S100A и НСБ S100B («Sigma», США).

Выделенный и идентифицированный НСБ-S100B-20,1 использован в дальнейшем для покрытия твердой фазы в иммуноферментном анализе. Иммуноферментный анализ использовался для качественного определения антител к данному белку при аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваниях ЦНС.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ И ОСЛОЖНЕНИЯ

При точном соблюдении техники приготовления растворов, строгом соблюдении инструкций работы на приборах и методик обессоливания и ионообменной хроматографии ошибки могут быть исключены.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Методика не может быть использована при неверной заготовке аутопсийного материала: если время от момента смерти до проведения судебно-медицинской экспертизы составляет более 2 ч, имеются макро- и микроскопические патологические изменения аутопсийного материала головного мозга.