

# МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Разрешено Минздравом Республики  
Беларусь для практического использования

Первый заместитель министра здраво-  
охранения, председатель комиссии по способам  
профилактики, диагностики, лечения и  
организационным формам работы МЗ РБ

 В.М. Ореховский  
12 июня 2000 г.  
Регистрационный номер № 121–9911

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДНКАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ СЫВОРОТОЧНЫХ IgG ДЛЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

(инструкция по применению)

*Учреждение-разработчик:* Витебский государственный медицинский университет  
*Авторы:* Е.В. Кундер (Сидорская), И.И. Генералов, проф. А.Н. Огороков

# Оглавление

<b>ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ .....</b>	<b>3</b>
<b>ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО МЕДИЦИНСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ, МЕДИЦИНСКИХ ПРЕПАРАТОВ, ИНСТРУМЕНТАРИЯ .....</b>	<b>4</b>
<b>ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА .....</b>	<b>6</b>
<b>ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И ОШИБКИ .....</b>	<b>13</b>

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Определение каталитической активности препаратов иммуноглобулинов класса G сыворотки крови используется для иммунологической диагностики заболеваний щитовидной железы (диффузного токсического зоба, аутоиммунного тиреоидита и подострого тиреоидита).

В качестве диагностического критерия предлагается оценка уровней эндонуклеазной (ДНКазной) активности препаратов сывороточных IgG. Этот тест дополняет лабораторную диагностику вышеперечисленных патологических состояний. Его можно использовать как уточняющий критерий в случае невозможности выполнения биопсии ткани щитовидной железы, а также при разноречивости других результатов лабораторных и инструментальных исследований.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО МЕДИЦИНСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ, МЕДИЦИНСКИХ ПРЕПАРАТОВ, ИНСТРУМЕНТАРИЯ**

Весы равноплечие ручные ВР-100 по ГОСТ 395-54.

Весы лабораторные по ГОСТ 19491-74.

Воронки стеклянные лабораторные по ГОСТ 86-13-64.

Колбы стеклянные лабораторные по ГОСТ 10394-72.

Магнитный смеситель с магнитом цилиндрическим ММЗ-94-5245.

Ножницы медицинские по ГОСТ 21239-77.

Пробки конусные по ГОСТ 7852-76.

Пробирки центрифужные стеклянные.

Стаканы стеклянные лабораторные по ГОСТ 10973-75.

Термостат электрический с автоматическим терморегулятором до температуры 50°C с ценой деления 0,2°C.

Холодильник бытовой электрический с температурой в камере 4–6°C.

Центрифуга с угловым ротором ЦЛК-2.

Центрифуга с бакетным ротором ОПН-ЗУ4.2

Спектрофотометр СФ-26 или СФ-46 (производства ЛОМО, Россия).

pH-метр «pH-121».

Устройство для диализа.

Вода дистиллированная по ГОСТ 7609-72.

Гидрофосфат натрия двухводный по ГОСТ 245-76.

Дигидрофосфат натрия двенадцативодный по ГОСТ 4172-76.

Тритон X-305 (Merck) или Тритон X-100 (Ferak).

Глицин (Reanal) или кислота аминокусусная (натриевая соль) производства «Реахим».

**Реабилитационные индивидуальные программы для больных и инвалидов вследствие хронического обструктивного бронхита**

Трис-(гидроксиметил)-аминометан (производства Reanal или «Олайнбиофарм»).

Этакридина лактат (риванол).

Активированный уголь.

Аммония сульфат (Реахим) по ГОСТ3769-78.

Хлорид натрия (Реахим).

Агароза, конъюгированная с белком А золотистого стафилококка (производства института им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия).

Дезоксирибонуклеиновая кислота (Sigma).

Соляная кислота 0,1н и 1н (фиксанал).

Матрицы для DEAE-хроматографии Toyoparl 650M («Toyosoda», Japan) или Молселект DEAE A50 (Reanal).

Набор пипеток автоматических от 0,02 до 1,0 мл.

Универсальная индикаторная бумага рН 0–12 (производства «Lachema» или «Реахим»).

Бумажные фильтры (производства «Filtrak»).

## ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

### 1. Выделение IgG из сыворотки крови больных заболеваниями щитовидной железы, а также здоровых лиц (доноров крови)

#### А. Приготовление исходных растворов и оборудования для выделения сывороточных иммуноглобулинов

*Приготовление 0,4 моль фосфатного буфера (ФБР) pH 7,4.*

57,2 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  довести до 450 мл дистиллированной водой (раствор №1). Отдельно 6 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  довести до 100 мл дистиллированной водой (раствор №2). 400 мл раствора №1 смешать с 100 мл раствора №2. Контроль pH осуществляется на pH-метре.

*Приготовление 0,1 моль фосфатного буферного раствора pH 7,4.*

100 мл 0,4 моль фосфатного буфера pH 7,4 довести до 400 мл дистиллированной водой. Тщательно перемешать.

*Приготовление 0,1 моль фосфатного буфера pH 7,4 с 1% раствором тритона X-305.*

4 г тритона X-305 растворить в 400 мл 0,1 моль фосфатного буфера pH 7,4.

*Приготовление глицин-HCl буфера pH 2,8.*

2,28 грамма глицина растворить в 280 мл дистиллированной воды. Затем к 280 мл полученного раствора добавить 120 мл 0,1N HCl. Общий объем должен составить 400 мл. Контроль pH осуществляется на pH-метре.

Набивка колонки, содержащей активированный уголь.

Мелкодисперсный уголь объемом 5 мл аккуратно вводят в колонку, периодически потряхивая ее для лучшего заполнения. Уравновешивают 0,01 моль фосфатным буфером pH 7,4, который пропускают через колонку.

*Набивка колонки, содержащей ДЭАЭ-сорбент.*

## **Реабилитационные индивидуальные программы для больных и инвалидов вследствие хронического обструктивного бронхита**

ДЭАЭ-матрицу, хранящуюся в 0,01 моль фосфатном буфере рН 7,4, аккуратно вводят в колонку в объеме 5–6 мл.

Набивка колонки для аффинной хроматографии, содержащей агарозу, конъюгированную с протеином А золотистого стафилококка

Агарозу, конъюгированную с протеином А золотистого стафилококка, аккуратно наслаивают на бумажный фильтр и заполняют колонку до 3–4 мл объема гранул агарозы. Промывают колонку 0,01 моль буфером рН 7,4 и уравнивают 0,1 моль буфером рН 7,4. Для хранения колонок для аффинной хроматографии добавляют 0,5 мл 1% раствора азида Na 5 мл объема колонки (для приготовления 1% раствора 1 г азида Na доводят до 100 мл дистиллированной водой) и хранят в холодильнике при температуре 4°C.

### **В. Выделение сывороточных иммуноглобулинов G**

## **Реабилитационные индивидуальные программы для больных и инвалидов вследствие хронического обструктивного бронхита**

Негепаринизированную человеческую кровь ( не менее 10–20 мл) инкубируют в течение 2 часов при температуре 4°С до образования сгустка. Затем центрифугируют 10–15 мин в центрифужных пробирках в центрифуге с бакетным ротором (1500 об./мин). Аккуратно забирают чистую сыворотку. К ней прибавляют охлажденный до 4°С 0,75% раствор риванола в соотношении 1 объем риванола к 2 объемам сыворотки. Смесь инкубируют при температуре 4°С не менее 2 ч. Осадок отбрасывают, надосадочную жидкость пропускают через колонку, заполненную активированным углем. Полученный после этого препарат подвергают ДЕАЕ-хроматографии на матрице Молселект ДЕАЕ А50, уравновешенной 0,01 моль фосфатным буфером рН 7,4 со скоростью 0,3 мл/мин. Собирают проходящий через колонку объем. Дополнительно колонку промывают этим же буфером в объеме, равном объему колонки. Элюаты объединяют. Далее проводят аффинную хроматографию, пропуская препарат через колонку с агарозой, конъюгированной с протеином А золотистого стафилококка, уравновешенную 0,1 моль фосфатным буфером со скоростью 6–7 капель в мин. После этого колонку последовательно промывают 0,1 моль фосфатным буфером рН 7,4 без детергента, а затем с 1% раствором тритона Х-305 в количестве 5–6 объемов колонки до исчезновения белка в элюенте. Элюцию связавшихся иммуноглобулинов класса G (G1, G2, G4) ведут 0,1 моль глицин-НСl буфером рН 2,8 до исчезновения белка в пробе (отбирают отдельно фракции по 1,5–2 мл). Фракции, содержащие наиболее высокие концентрации белка, объединяют. Колонку после элюции промывают 0,1 фосфатным буфером с 1% раствором тритона Х-305 рН 7,4 в количестве, равном 10–15 объемам колонки, а затем 0,01 моль фосфатным буфером без детергента с рН 7,4 в количестве, равном 20–30 объемам колонки, до исчезновения белка в элюенте (определяют по методу Бредфорд). Далее иммуноглобулины выделяют переосаждением в 40% растворе сульфата аммония. Преципитировавшие иммуноглобулины осаждают в центрифуге с угловым ротором при 6000 об./мин в течение 15 мин. Надосадочную

### **Реабилитационные индивидуальные программы для больных и инвалидов вследствие хронического обструктивного бронхита**

жидкость сливают. Осадок растворяют в минимальном объеме дистиллированной воды и четырехкратно диализуют против изотонического раствора хлорида натрия. Полученный препарат после диализа осветляют, центрифугируя в центрифуге с бакетным ротором при 1500 об./мин в течение 10 мин. Концентрацию белка в препарате определяют спектрофотометрически на длине волны 280 нм. Хранят препараты иммуноглобулинов в пластиковых пробирках в морозильнике при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **С. Контроль чистоты полученных препаратов**

Полученный препарат IgG следует тестировать на чистоту с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в диссоциирующих условиях с окраской нитратом серебра.

Электрофорез проводят в приборе для вертикального электрофореза в пластинах в градиентном 4–20% полиакриламидном геле на 0,025 моль трис-HCl-буфере, pH 8,3, содержащем 0,1% додецилсульфат натрия (ДДС-Na) и 0,1% меркаптоэтанол при напряжении 200 В. Пробы ИГ предварительно диссоциируют кипячением в течение 3 мин в присутствии 1% ДДС-Na и 2% меркаптоэтанола. На каждый трек наносят 5 мкл препарата в концентрации 2 мг/мл.

### **Реабилитационные индивидуальные программы для больных и инвалидов вследствие хронического обструктивного бронхита**

По окончании электрофореза их фиксируют и одновременно вымывают ДДС-На сначала раствором, содержащим 12%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и 50% этанола (10 мин), потом дважды по 5 мин — 5%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  с 10% этанола. Далее для улучшения равномерности окраски гель вымачивают 5 мин в 0,5% растворе железосинеродистого калия (красной кровяной соли). После трехкратного ополаскивания в воде гель заливают раствором, содержащим 0,2 г нитрата серебра, 0,2 г нитрата аммония 0,5 мл 37% формальдегида и 0,06 мг бензотриазола (антиуалирующего средства для фотографии) в 100 мл воды. Гель в растворе освещают лампой накаливания мощностью 500 Вт в течение 30 мин. Затем раствор сливают и гель, не споласкивая, заливают 200 мл 3% раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , содержащего 0,1 мл формальдегида и 0,12 мг бензотриазола. Не прекращая освещения, раствор сменяют 2–3 раза до достижения желаемой интенсивности окраски белков. Процесс окрашивания прерывают погружением геля на 5 мин в 1% раствор  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , а затем промывают его водой.

В результате в препарате должны быть обнаружены 2 полосы, соответствующие легкой и тяжелой цепям IgG.

При последующей оценке абзимной активности полученных препаратов IgG рекомендуется провести гель-фильтрацию каталитически активных иммуноглобулинов в диссоциирующих условиях (в присутствии 0,1 моль глицин-HCl-буфера с pH 2,5–2,8) на матрице Toyopearl HW 55 (Toyosoda, Япония).

В случае принадлежности каталитической активности выделенному иммуноглобулиновому препарату максимум ферментативной активности будет совпадать с вершиной хроматографического пика, соответствующего IgG.

## 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭНДОНУКЛЕАЗНОЙ (ДНКАЗНОЙ) АКТИВНОСТИ IGG

### А. Приготовление исходных растворов

Приготовление 0,02 моль трис-НСl буфера рН 7,4 с 0,0004 моль  $MgCl_2$ .

Трис в количестве 0,6 г растворяют в 25 мл дистиллированной воды. Полученные 25 мл раствора трис смешивают с 37 мл 0,1н НСl и доводят общий объем дистиллированной водой до 200 мл. На 100 мл приготовленного буфера берут 203 мкл 1М раствора  $MgCl_2$ . Контроль рН осуществляется на рН-метре.

*Приготовление раствора ДНК.*

1мг ДНК осторожным пипетированием растворяют в 1мл дистиллированной воды. 1 мл полученного раствора смешивают с 2 мл дистиллированной воды.

*Приготовление раствора риванола*

750 мг этакридина лактата растворяют при нагревании в 100 мл дистиллированной воды. Хранят в холодильнике при температуре 4°C.

### Б. Постановка и оценка реакции

Реакция ставится в дублях. К 0,2 мл раствора ДНК (300–350 мкг/мл) добавляют 0,1 мл препарата IgG (1 мг/мл) и 0,1 мл 0,02 моль трис-НСl буфера рН 7,4 с 0,0004 моль  $MgCl_2$ .

### **Реабилитационные индивидуальные программы для больных и инвалидов вследствие хронического обструктивного бронхита**

В контроле вместо 0,1мл иммуноглобулинов используют 0,1 мл 0,9% NaCl. Постановка реакции осуществляется в центрифужных пробирках. После инкубации в течение 20 часов при 37°C на поверхность проб наслаивается 20 мкл 0,75% раствора риванола, все встряхивают до получения сгустка. Затем сгусток двукратно отмывают дистиллированной водой и растворяют при нагревании в 0,5 мл 1н HCl, после чего объем доводят до 2 мл дистиллированной водой. Проводят спектрофотометрию при 410 нм. Из среднего значения оптической плотности контрольных проб вычитают среднее значение опытных проб и делят этот показатель на среднее значение контролей. Полученное значение (в процентах) переводят в единицы активности фермента. Для этого его сравнивают с калибровочной кривой, построенной по стандартному препарату ДНКазы либо данное значение (DNASE) подставляют в уравнение регрессии вида  $E_d = 0,0181(DNASE)^{0,2644}$  и определяют единицы активности с помощью компьютера.

Обнаружение ДНКазной активности IgG свыше 0,045 ед. подтверждает наличие в тиреоидной патологии аутоиммунного компонента, а уровень активности свыше 0,049–0,05 ед. позволяет дифференцировать аутоиммунный тиреоидит от других заболеваний щитовидной железы.

## **ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И ОШИБКИ**

При очистке сывороточных иммуноглобулинов возможны следующие ошибки и затруднения.

Нельзя использовать хилезную сыворотку или сыворотку после гемолиза.

Возможна некачественная фильтрация через активированный уголь (примесь частичек угля в препарате). Рекомендуется аккуратно уложить фильтр на дно колонки и проверить качество фильтрации, предварительно пропустив через колонку дистиллированную воду. Частишки угля после некачественной фильтрации можно задержать при ДЭАЭ хроматографии в верхнем слое анионообменника, который затем следует удалить.

При определении ДНКазной активности возможны следующие осложнения.

В контрольных пробах через 24 ч не образуется сгусток ДНК. Рекомендуется проверять сгусткообразование в контрольных пробах перед постановкой реакции. Значение оптической плотности контрольных сгустков должно находиться в пределах 0,3–0,45 ед. оптической плотности при длине волны 410 нм.