



УКРАЇНА

(19) UA (11) 13551 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 33/48
A01C 1/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ЗАСТОСУВАННЯ БІОТЕСТУВАННЯ ДЛЯ ОЦІНКИ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЛЕКТИНІВ ТА ЛЕКТИНОВІСНИХ ЕКСТРАКТІВ

1

2

(21) u200507653

(22) 01.08.2005

(24) 17.04.2006

(46) 17.04.2006, Бюл. № 4, 2006 р.

(72) Поспелова Ганна Дмитрівна, Поспелов Сергій Вікторович

(73) ПОЛТАВСЬКА ДЕРЖАВНА АГРАРНА АКАДЕМІЯ

(57) Застосування біотестування на паростках крес-салату для оцінки біологічної активності лектинів та лектиновмісних екстрактів.

Корисна модель відноситься до галузі біології, медицини і сільського господарства, а саме способам оцінки біологічної активності рослинних екстрактів шляхом біотестування, і може бути використано підчас вивчення фізіологічних процесів, скринінгу рослин, а також імунології.

Відомо, що оцінку біологічної активності лектинів проводять шляхом проведення реакції гемаглютинації у різних варіантах та модифікаціях. При цьому, як тест-об'єкт, використовуються еритроцити людини або тварини [Див. Луцки М.Д., Панасюк Е.Н., Антонюк В.А. и др. Методы поиска пектинов (фитогемагглютининов) и определение их иммунохимической специфичности. Методические рекомендации. - Львов, 1980. - 20с.].

Біотест на паростках крес-салату є відомим способом оцінки алелопатичної активності біологічних та хімічних сполук [Див. Аллелопатическое почвоутомление/ А.М.Гродзинский, Г.П.Богдан, Э.А.Головко и др. - Киев: Наук. думка, 1979. - 248с.]. Для його здійснення відсортоване насіння крес-салату висівають на фільтрувальний папір, змочений дистильованою водою і ставлять в термостат при температурі 22-27°C. Через добу, коли насіння проросте, відбирають те, у якого корінці досягли довжини 1-3мм, по 20-25 штук розміщують в чашці Петрі з досліджуваними розчинами або екстрактами. Кількість їх десятикратного розведення визначається схемою досліду. Паралельно закладають контрольну чашку Петрі з дистильованою водою. На наступну добу вимірюють довжину корінців в досліді і контролі, вираховують середнє, і результати досліду виражають у відсотках до приросту коренів контрольних проростків. Про алелопатичну активність сполук судять за стиму-

люванням або інгібуванням тест-системи.

Авторам невідомо, що подібним чином проводиться оцінка біологічної активності лектинів та лектинвмісних екстрактів. Традиційно, про біологічну активність лектинів судять по титру реакції аглютинації з еритроцитами крові. При цьому, лектини та лектинвмісні екстракти деяких рослин проявляють свою активність тільки з еритроцитами крові окремих видів тварин. Досить часто дослідник повинен застосовувати додаткові способи очистки, щоб провести оцінку біологічної активності лектинів. Крім того, при визначенні даним способом біологічна активність не завжди корелює з фізіологічною дією лектинів на організм.

Задача, на вирішення якої спрямована корисна модель, полягає у підвищенні достовірності визначення біологічної активності лектинів та лектинвмісних екстрактів за рахунок того, що оцінка біологічної активності проводиться в системі тест-об'єкту. Про біологічну активність лектинів або екстрактів судять за стимулюванням або інгібуванням тест-системи.

Вона досягається тим, що оцінку біологічної активності лектинів та лектинвмісних екстрактів проводять шляхом біотестування на паростках крес-салату.

Спосіб здійснюється у відповідності з проведенням біотесту на паростках крес-салату для оцінки алелопатичної активності біологічних та хімічних сполук.

Для цього відсортоване насіння крес-салату висівають на фільтрувальний папір, змочений дистильованою водою і ставлять в термостат при температурі 22-27°C. Через добу, коли насіння проросте, відбирають те, у якого корінці достигли

(19) UA (11) 13551 (13) U

довжини 1-3мм, по 20-25 штук розміщують в чашці Петрі з досліджуваними розчинами або екстрактами. Кількість їх десятикратного розведення визначається схемою досліду. Паралельно закладають контрольну чашку Петрі з дистильованою водою. На наступну добу вимірюють довжину корінців в досліді і контролі, вираховують середнє, і результати досліду виражають у відсотках до приросту коренів контрольних проростків. Про біологічну активність лектинів або екстрактів судять за стимулюванням або інгібуванням тест-системи.

Приклад 1.

Хімічно чисті лектини квасолі (виробництво фірми «Reanal»), сочевиці та гороху (виробництва НВК «Лектинотест», м.Львів) розчиняють в фізіологічному розчині і проводять серію їх розведень. Потім в чашки Петрі з пророслим насінням крес-салату додають по 5мл кожної концентрації лектинів і через добу вимірюють довжину корінців. Контроль - фізіологічний розчин. За традиційним способом розчини оцінюють за інтенсивністю реакції гемаглютинації з еритроцитами людини 1 (0) групи крові. Результати наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Оцінка біологічної активності хімічно чистих лектинів

Лектини	Концентрація лектинів (в %)						
	1%	0,1%	0,01%	0,001%	0,0001%	0,00001%	0,000001%
Квасолі							
За традиційним способом (титр)	1:256	1:256	1:256	1:128	1:128	1:64	0,0
За пропонуваним способом	-56,6	+1,0	+23,0	-4,7	-4,7	-15,0	-19,0
Сочевиця							
За традиційним способом (титр)	1:256	1:256	1:128	1:64	1:64	0,0	0,0
За пропонуваним способом	-9,0	-11,0	-19,0	+4,0	+11,0	+16,0	+20,2
Горох							
За традиційним способом (титр)	1:256	1:256	1:128	1:64	1:32	0,0	0,0
За пропонуваним способом	-18,4	+0,4	+12,8	+2,6	+7,9	+21,0	+27,2

Дані таблиці 1 свідчать про те, що при оцінці за рекомендованим способом можна не тільки судити про високу ступінь біологічної активності лектинів, але й виявити, в яких концентраціях спостерігається ефект пригнічення (лектин квасолі - 1%, 0,01-0,000001%; лектин сочевиця - 1-0,01%; лектин гороху - 1%), а в яких спостерігається стимулюючий вплив (лектин квасолі -0,1-0,01%; лектин сочевиці - 0,001-0,000001%; лектин гороху - 0,1-0,000001%). Це надзвичайно важливо під час вивчення фізіологічного впливу лектинів на процеси росту і розвитку рослин. Під час оцінки традиційним способом біологічна активність при більших розведеннях не фіксується, також неможливо зробити висновок про характер направленості активності. Все це свідчить про більш високу достовірність пропонованого способу.

Приклад 2.

Сушу подрібнену сировину звіробію звичай-

ного (*Hypericum perforatum*) екстрагують фізіологічним розчином в співвідношенні 1:10. Через 2 години нативний екстракт фільтрують і визначають його біологічну активність в серії розведень. За традиційним способом розчини лектинів оцінюють за інтенсивністю реакції гемаглютинації з еритроцитами людини 1(0) групи крові. Результати наведені в таблиці 2.

Під час оцінки традиційним способом активність лектинів в нативному екстракті не реєструвалася, починаючи з 0,1%-ної концентрації. В цей же час при оцінці за рекомендованим способом можна зробити висновок, що нативний екстракт має істотну інгібуючу активність (-100÷-32,6%) в усьому досліджуваному діапазоні. Отже, використання пропонованого способу дозволяє характеризувати направленість фізіологічної дії речовин, які містяться в екстракті на тест-систему.

Таблиця 2

Оцінка біологічної активності лектинвмісних екстрактів

Об'єкти експерименту						
	10%	1%	0,1%	0,01%	0,001%	0,0001%
Звіробій звичайний						
За традиційним способом (титр)	1:256	1:64	0,0	0,0	0,0	0,0
За пропонуваним способом	-100	-91,0	-68,4	-60,0	-72,6	-32,6
Цмин пісковий						
За традиційним способом (титр)	1:64	1:8	1:2	0,0	0,0	0,0
За пропонуваним способом	-100	-73,2	+22,3	+24,8	+29,2	+56,1

Приклад 3.

Суша подрібнена речовина цмину пісового (Helichrysum arenarium) екстрагується фізіологічним розчином в співвідношенні 1:10. Через 2 години нативний екстракт фільтрують і визначають його біологічну активність в серії розведень. Паралельно з цим проводять оцінку біологічної активності за допомогою реакції гемаглютинації. Результати наведені в таблиці 2.

З отриманих даних можна зробити висновок,

що біологічна активність нативного екстракту цмину пісового висока, і в концентраціях 10%÷1% проявляє інгібуючу дію, а при розведенні 0,1%÷0,0001% - стимулює тест-систему. Під час оцінки традиційним способом активність лектинів реєструється тільки до 0,1%-ної концентрації, що підтверджує більш високу достовірність пропонуваного способу.