

Винахід відноситься до біохімії і може бути використано у біології та медицині для наукових досліджень і клінічній практиці.

Відомий набір реактивів для визначення первинних ароматичних амінів у розчинах і біологічних рідинах (див. Пат. РФ N2097762, G01N33/48, A61B19/02), який містить у відповідних упаковках наважку трихлороцтової кислоти, яка при розчиненні у 50мл дистильованої води дає розчин, що приводить до осаду білків, смужки паперу із натрієм азотнокислим, які пристосовані до утворення розчину для діазотування безпосередньо перед аналізом (ex tempore), наважку амонію сульфамінокислого, котра при розчиненні у 25мл дистильованої води дає розчин для зв'язування залишку натрію азотнокислого, розчин N-(1)-нафтилетилендіаміногідрохлориду для утворення забарвленої азосполуки, смужки паперу, що містять 0,018мкмоль стандартного аміну, який аналізують.

Використання набору дозволяє спростити проведення аналізу і підвищити його точність, але він призначений тільки для визначення ароматичних амінів.

Відомий набір для визначення α -2-макроглобуліну (α -2-МГ) виробництва фірми Boehringer Mannheim (див. Productinformation α -2-Makroglobulin Farbstest. Test-Combination Nr.: 403768 / Witt I. u. W. Tritschler // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. - 1983. - 21. - P.429), який містить у флаконах наступні компоненти:

- буфер -1 флакон,
- трипсин -1 флакон,
- апротинін -1 флакон,
- субстрат - 2 флакони.

Вказаний набір розраховано на 30 аналізів, чутливість - 10^{-7} г.

Недоліком відомого набору є низька чутливість аналізу, що обумовлено використанням низькомолекулярного субстрату і проведенням протеолітичної реакції у розчині.

Відомий спосіб визначення активності протеїнази або їх інгібіторів в біологічних рідинах (див. Пат. РФ N1655991, C12Q1/37), прототип, який містить полістироловий планшет, що іммобілізований маркерним ферментом, який комплексно пов'язано із субстратом протеолітичної реакції, препарат протеїнази, фосфатний буфер для приготування робочого розчину протеїнази, контрольного матеріалу і дослідних проб для аналізу, детергент для приготування миючої рідини, цитратний буфер, ортофенілєндіамін і гідроперит для виявлення залишкової активності маркерного ферменту.

Чутливість способу становить - 10^{-9} - 10^{-10} г.

Недоліком відомого способу є складність здійснення етапу підготовки: приготування комплексу маркерного ферменту та субстратного білка і його іммобілізація на поверхні полістиролових плашок, що потребує використання спеціальних реагентів, обладнання, високої кваліфікації оператора. Крім того, відомий спосіб не передбачає визначення активності α -2-МГ, визначення якого може бути використано в якості критерію прогнозу розвитку, перебігу захворювань різного походження та контролю ефективності лікування.

В основу винаходу поставлена задача розробки набору, за допомогою якого можна було б специфічно та простим способом визначати активність хімази в біологічних рідинах.

Поставлена задача вирішується у наборі для визначення активності α -2-МГ в біологічних рідинах, який містить полістироловий планшет, що іммобілізований маркерним ферментом, комплексно пов'язаним із субстратом протеолітичної реакції, препарат протеїнази, фосфатний буфер для приготування робочого розчину протеїнази, контрольного матеріалу і дослідних проб для аналізу, детергент для приготування миючої рідини, цитратами буфер, ортофенілєндіамін і гідроперит для виявлення залишкової активності маркерного ферменту.

Згідно з винаходом відрізняючими ознаками є те, що:

- полістироловий планшет іммобілізований маркерним ферментом, який комплексно пов'язаний із протамінсульфатом,

- набір додатково містить інгібітор трипсину із сої для пригнічення залишкової активності трипсину,

- усі компоненти надані у окремих упаковках при наступному складі компонентів: препарат протеїнази (трипсин - 1мг), фосфатний буфер - 12,5мл, детергент - 0,75мл, цитратний буфер - 6мл, ортофенілєндіамін - 2мг або 1 таблетка, гідроперит - 1 таблетка, інгібітор трипсину із сої - 3мг.

Додатково наявність у наборі інгібітору трипсину із сої сприяє підвищенню специфічності визначення α -2-МГ. Це обумовлено тим, що активність α -2-МГ відповідає активності трипсину, який зв'язується з α -2-МГ в реакції утворення комплексу трипсин-інгібітор протеїнази. Інгібітор трипсину із сої пригнічує залишкову активність трипсину.

Вміст та певна кількість компонентів у наборі забезпечує оптимальні умови для здійснення способу визначення активності α -2-МГ у біологічних рідинах (40 зразків у дублікаті).

Виконання любого методу складається з 2-х основних етапів: приготування реагентів, які необхідні для проведення аналізу і серії послідовних операцій здійснення методики. Від якості виконання 1-го етапу роботи в значній мірі залежить кінцевий результат аналізу. Необхідна точність вимірювань, спеціальне обладнання, висока кваліфікація оператора. З метою підвищення точності і порівняльності результатів для багатьох методів, які передбачають масові дослідження, виготовляють відповідні реагенти в спеціалізованих лабораторіях і реалізують у вигляді наборів. Придбання повного комплексу реагентів у наборі звільняє від пошуку необхідних компонентів по каталогах різних фірм-виробників та постачальників. Крім того, придбання окремих компонентів у необхідній лімітованій кількості для проведення серії аналізів потребує надлишкових фінансових витрат.

Дослідження по запропонованому набору були проведені в Інституті терапії АМН України. Визначена концентрація кон'югату маркерного ферменту і протамінсульфату, яка необхідна для повного насичення поверхні лунок полістиролових плашок. Показано можливість зберігання іммобілізованих плашок до 2-х років. Підібрані умови пригнічення залишкової активності трипсину після проведення реакції утворення комплексу трипсин-інгібітори трипсину за допомогою інгібітору трипсину із сої. Розрахунки комплектування наборів перевірено лабораторними іспитами.

Використання запропонованого рішення забезпечує спрощення способу, зменшення витрат на придбання реагентів, розширення області застосування, високу відтвореність способу (не менш 95%).

Набір складається із наступних компонентів:

- Плашка, яка іммобілізована маркерним ферментом, що комплексно пов'язано із протамінсульфатом.
- Флакон N1 - детергент, твін-20 (0.75мл).

- Флакони N2 - фосфатний буфер (10-15мл).
- Флакони N3 - цитратний буфер (6мл).
- Флакони N4 - ортофенілєндіамін (2мг або 1 таблетка).
- Флакони N5 - препарат протейнази (1мг трипсину).
- Флакони N6 - 0.0025 н НСІ (1мл).
- Флакони N7 - інгібітор трипсину із сої (3мг).
- Гідроперит (1 таблетка).

Аналіз здійснюють за інструкцією, яка надається до набору.

Приготування реагентів із набору:

1. Готують миючу рідину: 0.5мл детергенту із флакону N1 додають до 1л дистильованої води.
2. Готують фосфатний буфер: рідину із флакону N2 доводять до 250мл дистильованою водою і додають 0.25 мкл детергенту із флакону N1.
3. Відмивають плашку 2-3 рази дистильованою водою, яка містить детергент.
4. Готують вихідний розчин протейнази та контрольний матеріал (на льоду):
Препарат протейнази із флакону N5 (трипсин), спочатку розчиняють у 1мл 0,0025н НСІ. Потім 160мкл розчину додають до 19,84мл фосфатного буферу, який містить детергент, - вихідний розчин. Надалі проводять серію послідовного розведення вихідного розчину за схемою наведеною в таблиці.
5. Готують інгібітор трипсину із сої безпосередньо перед використанням: у флакон N7 додають 3мл фосфатного буферу, який приготовлено раніше по п.2, - вихідний розчин. Потім розводять: додають до 2,25мл вихідного розчину 12,61мл фосфатного буферу.

Таблиця

№№ стандартів	Концентрація, мкг/мл	Розведення	Буфер, мл	Протейназа, мл
1	0		1 0	
2	0,005	1:9 N4	1,8	0,2 N4
3	0,01	1:9 N5	1,8	0,2 N5
6	0,05	1:3 N6	1,2	0,4 N6
5	0,1	1:9 N7	1,8	0,2 N7
6	0,2	1:19 N8	1,9	0,1 N8
7	1,0	1:7 вихідного розчину	1,4	0,2 вихідного розчину
8	4,0	1:1 вихідного розчину	0,75	0,75 вихідного розчину

6. Готують суміш для виявлення залишкової активності маркерного ферменту: цитратний буфер із флакону N3 розводять у 2 рази дистильованою водою, додають ортофенілєндіамін із флакону N4 або таблетку, потім - гідроперит (готується суміш перед використанням).

Проведення аналізу:

1. Окремо на титрувальній дошці готують дослідні зразки (n=40): зразки плазми/сироватки крові людини розводять у 250 разів (на льоду) фосфатним буфером, наприклад, шляхом послідовного розведення у 25 та 10 разів (до 960мкл буферу додають 40мкл сироватки, потім до 180мкл буферу - 20мкл 1-го розведення сироватки). Зразки слини людини, сироватки крові та цитозолі тканин шурів розведення не потребують.
2. Вносять у лунки титрувальної дошки контрольний матеріал.
3. Проводять реакцію утворення комплексу протейнази-інгібітор протейназ додачею до дослідних зразків 1:1 вихідного розчину протейнази (трипсину).
4. Пригнічують залишкову активність трипсину безпосередньо після утворення комплексу протейнази-інгібітор протейназ додачею 1:1 розчину інгібітор трипсину із сої, інкубують 5 хвилин при 37°C.
5. Проводять протеолітичну реакцію розщеплення іммобілізованого маркерного ферменту, який комплексно пов'язано із протамінсульфатом: вносять у лунки полістиролових плашок (по 100мкл) контрольний матеріал та дослідні зразки, що приготовлені по пп.3, 4 та інкубують 15 хвилин при 37°C.
7. Усувають реакційну суміш шляхом відмивання плашки як вказано раніше.
8. Готують 50% сірчану кислоту (у набір не входить).
9. Визначають залишкову активність мобілізованого маркерного ферменту додачею суміші, що приготовлена з цитратного буферу, ортофенілєндіаміну та гідропериту. Інкубують протягом 3-5 хвилин.
10. Зупиняють реакцію додачею по 50мкл у лунку 50% сірчаної кислоти.
11. Визначають оптичну щільність розчинів при 490нм за допомогою мікроспектрофотометра.
12. Будують калібровану криву за результатами вимірювань контрольних зразків та розраховують активність трипсину, пов'язаного із α -2-МГ за відповідною формулою (показано у прикладі).

Можливість здійснення аналізу з використанням запропонованого набору підтверджується прикладом.

Приклад. Визначення активності α -2-МГ у сироватці крові людини.

Приготування реагентів із набору:

1. Готують миючу рідину: 0.5мл детергенту із флакону N1 додають до 1л дистильованої води.
2. Готують фосфатний буфер: рідину із флакону N2 доводять до 250мл дистильованою водою і додають 0,25мкл детергенту із флакону N1.
3. Відмивають плашку 2-3 рази дистильованою водою, яка містить детергент.
4. Готують вихідний розчин протейнази та контрольний матеріал (на льоду): Препарат протейнази із флакону N5 (трипсин) спочатку розчиняють у 1мл 0,0025н НСІ. Потім 160мкл розчину додають до 19,84мл фосфатного буферу, який містить детергент, - вихідний розчин. Контрольний матеріал готують шляхом серії послідовного розведення вихідного розчину за схемою, що надана у таблиці.
5. Готують інгібітор трипсину із сої (безпосередньо перед використанням): у флакон N7 додають 3мл фосфатного буферу, який приготовлено раніше по п.2, - вихідний розчин. Потім додають 2,25мл вихідного розчину до 12,61мл фосфатного буферу.

6. Готують суміш для виявлення залишкової активності маркерного ферменту: цитратний буфер із флакону N3 розводять у 2 рази дистильованою водою, додають ортофенілєндіамін із флакону N4 або таблетку, потім - гідроперит (готується суміш перед використанням).

Проведення аналізу:

1. Окремо на титрувальній дошці готують дослідні зразки (n=40): зразки сироватки крові людини розводять у 250 разів фосфатним буфером, наприклад, шляхом послідовного розведення у 25 та 10 разів (до 960мкл буферу додають 40мкл сироватки, потім до 180мкл буферу - 20мкл 1-го розведення сироватки).

2. Вносять у лунки титрувальної дошки контрольний матеріал.

3. Проводять реакцію утворення комплексу протеїназа-інгібітор протеїназ додачею 1:1 вихідного розчину протеїнази, інкубують 15 хвилин при 20°C.

4. Пригнічують залишкову активність трипсину додачею 1:1 розчину інгібітору трипсину із сої, інкубують 5 хвилин при 37°C.

6. Проводять протеолітичну реакцію розщеплення іміобілізованого маркерного ферменту, який комплексно пов'язаний із білковим субстратом: вносять у лунки полістиролових плашок (по 100мкл) контрольний матеріал та дослідні зразки, що приготовлені по п.3, та інкубують 15 хвилин при 37°C.

7. Усувають реакційну суміш шляхом відмивання плашки як вказано раніше.

8. Готують 50% сірчану кислоту (у набір не входить).

9. Визначають залишкову активність іміобілізованого маркерного ферменту додачею суміші, що приготовлена з нитратного буферу, ортофенілєндіаміну та гідропериту. Інкубують протягом 3-5 хвилин.

10. Зупиняють реакцію додачею по 50мкл у лунку 50% сірчаної кислоти.

11. Визначають оптичну щільність розчинів при 490нм за допомогою мікроспектрофотометра.

12. Будують калібровану криву по результатам вимірювань контрольних зразків та розраховують активність

α -2-МГ за формулою:

$$\frac{C_{\text{зал.}} \cdot 4 \cdot 1000 \cdot 250}{1000000} \quad (\text{г/л год.}),$$

де: $C_{\text{зал.}}$ - активність трипсину, який зв'язується з α -2-МГ, мкг/мл,

4 - коефіцієнт перерахунку на 1 годину,

1000 - коефіцієнт перерахунку на 1л,

250 - розведення зразків сироватки крові людини,

1000000 - коефіцієнт перерахунку у г.

Висновок: Вказаний приклад підтверджує можливість спрощення постановки аналізу активності α -2-МГ у різних біологічних рідинах.

Технічний результат: Використання винаходу у порівнянні з прототипом забезпечує спрощення проведення біохімічного аналізу, зменшення витрат на придбання реагентів у 250 разів, розширення області застосування. Відтвореність способу не менш 95%.