



УКРАЇНА

(19) UA (11) 45068 (13) A

(51) B G01N33/48, A61B19/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ

(54) НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ЕЛАСТАЗИ В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ

1

2

(21) 2001042735

(22) 23 04 2001

(24) 15 03 2002

(46) 15 03 2002, Бюл. № 3, 2002 р.

(72) Самохіна Любов Михайлівна, Максимова Наталія Анатоліївна

(73) ІНСТИТУТ ТЕРАПІЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

(57) Набір для визначення активності ендотеліальної еластази в біологічних рідинах, який містить полістироловий планшет з іммобілізованим маркерним ферментом, що комплексно пов'язаний із субстратом білкової природи, препарат протеїнази, фосфатний буфер для приготування робочого розчину протеїнази, контрольного матеріалу і дослідних проб для аналізу, детергент для приготування мийної рідини, інгібітор для пригнічення ак-

тивності окремих протеїназ, цитратний буфер, ортофенілєндіамін і піроперит для виявлення залишкової активності маркерного ферменту, усі компоненти подані в окремій упаковці при наступному складі: препарат протеїнази, фосфатний буфер - 12,5 мл, детергент - 0,75 мл, цитратний буфер - 6 мл, ортофенілєндіамін - 2 мг або 1 таблетка, піроперит - 1 таблетка, який **відрізняється** тим, що планшет іммобілізований маркерним ферментом, що комплексно пов'язаний із субстратом білкової природи, який містить послідовність Ala-Ala, як препарат протеїнази використовують еластазу у кількості 6 мкл, як інгібітори використовують фенілсульфонілфлюорид у концентрації 0,2 мг/мл кількістю 75 мкл та 6 % розчин етилендіамінтетраацетату у кількості 20 мкл

Винахід відноситься до біохімії і може бути використаний в біології та медицині для наукових досліджень для визначення активності ендотеліальної еластази в біологічних рідинах, а також може бути використаний в клінічній практиці.

Відомий "Набір реактивів для визначення первинних ароматичних амінів у розчинах і біологічних рідинах" (див. Пат. РФ N 2097762, G 01 N 33/48, A 61 B 19/02), який містить у відповідних упаковках наважку трихлороцтової кислоти, яка при розчиненні у 50 мл дистильованої води дає розчин, що приводить до осаду білків, смужки паперу із натрієм азотнокислим, які призначені для утворення діазотуючого розчину безпосередньо перед аналізом (ex tempore), наважку амонію сульфамінокислого, котра при розчиненні у 25 мл дистильованої води дає розчин для зв'язування залишку натрію азотнокислого, розчин M-(1)-нафтилєтилендіамінодигідрохлориду для утворення забарвленої азосполуки, смужки паперу, що містять 0,018 мкмоль стандартного аміну, який аналізують. Використання набору дозволяє спростити проведення аналізу і підвищити його точність.

Недоліком відомого рішення є призначення набору тільки для визначення ароматичних амінів.

Відомий також "Набір для визначення актив-

ності нетрипсиноподібних протеїназ (НП хімази, еластази) інгібіторної активності α -1-інгібітора протеїнази (α -1-ІП) та рівня α -2-макроглобуліну (α -2-МГ) в біологічних рідинах" (див. Рішення про видачу патенту України від 18.11.1999 р. по з №99063318, G01N33/48, A61B 19/02) - прототип, який містить полістироловий планшет з іммобілізованим маркерним ферментом, що комплексно пов'язаний із субстратом протеолітичної реакції, препарат протеїнази, фосфатний буфер для приготування робочого розчину протеїнази, контрольного матеріалу і дослідних проб для аналізу, детергент для приготування мийної рідини, цитратний буфер, ортофенілєндіамін і піроперит для виявлення залишкової активності маркерного ферменту. У наборі для визначення хімази планшет іммобілізований маркерним ферментом, який комплексно пов'язаний із субстратом білкової природи, що містить послідовність Pro-Phe, у наборі для визначення α -2-МГ планшет іммобілізований маркерним ферментом, який комплексно пов'язаний із протамінсульфатом, набір для визначення НП, хімази додатково містить 1 мг інгібітору трипсину із сої (CIT) для пригнічення активності трипсиноподібних протеїназ, набір для визначення α -2-МГ додатково містить 3 мг CIT для пригнічення

(19) UA (11) 45068 (13) A

залишкової активності трипсину, у наборі для визначення еластазиінгібіторної активності α -1-Ш препаратом протеінази є еластаза, усі компоненти надані у окремих упаковках при наступному складі компонентів препарат протеінази (трипсин - 1 мг, еластаза -2-6 мкл), детергент - 0,75 мл, фосфатний буфер - 12,5 мл, цитратний буфер - 6 мл, ортофенілєндіамін - 2 мг або 1 таблетка, гідроперит - 1 таблетка, CIT - 1 або 3 мг, відповідно

Недоліком відомого набору є неспецифічність щодо визначення ендотепіальної еластази

В основу винаходу поставлена задача розробки набору, за допомогою якого можна специфічно визначати активність ендотепіальної еластази у біологічних рідинах

Ця задача вирішується тим, що у наборі для визначення активності ендотепіальної еластази в біологічних рідинах, який містить полістироловий планшет з іммобілізованим маркерним ферментом, що комплексно пов'язаний із субстратом білкової природи, препарат протеінази фосфатний буфер для приготування робочого розчину протеінази, контрольного матеріалу і дослідних проб для аналізу, детергент для приготування мийної рідини, інгібітор для пригнічення активності окремих протеіназ, цитратний буфер, ортофенілєндіамін і гідроперит для виявлення залишкової активності маркерного ферменту, усі компоненти подані в окремій упаковці при наступному складі

препарат протеінази, фосфатний буфер	12,5 мл
детергент	0,75 мл
цитратний буфер	6 мл
ортофенілєндіамін	2 мг - або 1 таблетка
гідроперит	1 таблетка

згідно винаходу

планшет іммобілізований маркерним ферментом, що комплексно пов'язаний із субстратом білкової природи, який містить послідовність A1a-A1a

як препарат протеінази використовують еластазу у кількості

як інгібітори використовують фенілсульфонілфлюорид у концентрації

кількістю

та 6 % розчин етилендіамінтетраацетату у кількості

Використання у наборі для визначення активності ендотепіальної еластази в біологічних рідинах планшетів, іммобілізованих маркерним ферментом, що комплексно пов'язаний із субстратом білкової природи, який містить послідовність A1a-A1a, наприклад N-сукциніл-A1a-A1a-Уа1, та інгібіторів, таких як фенілсульфонілфлюорид, етилендіамінтетраацетат, забезпечує специфічність дослідження саме ендотепіальної (полової) еластази. Це обумовлено тим, що зв'язок A1a-A1a вважають специфічним до еластаз, фенілсульфонілфлюорид пригнічує активність серії нових протеіназ, у тому числі і гладко м'язової серії нової елас-

тази, а етилендіамінтетраацетат пригнічує активність металопротеіназ, у тому числі і метало-еластази

Вміст компонентів у наборі забезпечує оптимальні умови для здійснення ферментативного способу оцінки активності ендотепіальної еластази

Дослідження по запропонованому наборові були проведені в Інституті терапії АМН України. Розрахунки комплектування наборів перевірено лабораторними іспитами,

Набір складається із наступних компонентів

Полістироловий планшет з іммобілізованим маркерним ферментом (наприклад, пероксидаза), який комплексно пов'язаний із субстратом білкової природи, що містить послідовність A1a-A1a

Препарат протеінази (еластаза) 6 мкл

Фосфатний буфер для приготування вихідних розчинів еластази, інгібіторів, контрольного матеріалу і дослідних проб для аналізу 12,5 мл

Детергент для приготування мийної рідини, твін 20 - 0,75 мл

Інгібітор фенілсульфонілфлюорид 75 мкл

Інгібітор етилендіамінтетраацетат 20 мкл

Цитратний буфер 6 мл

Ортофенілєндіамін 2 мг або 1 таблетка

Гідроперит для виявлення залишкової активності маркерного ферменту пероксидази 1 таблетка

Аналіз здійснюють за інструкцією, яка надається до набору

Приготування реагентів і матеріалів здійснюють таким чином

1 Готують рідину для відмивання 0,5 мл детергенту додають до 1 л дистильованої води

2 Готують фосфатний буфер рідину доводять до 250 мл дистильованою водою і додають 0,25 мкл детергенту

3 Відмивають планшет 2-3 рази дистильованою водою, яка містить детергент

4 Готують контрольний матеріал шляхом послідовного розведення вихідного розчину еластази за схемою згідно таблиці

5 Готують розчин інгібіторів додаванням фенілсульфонілфлюориду - 75 мкл та 6 % етилендіамінтетраацетату - 20 мкл до 15 мл фосфатного буферу, приготовленого згідно п 2

7 Готують суміш для виявлення активності маркерного ферменту щитратний буфер розводять у 2 рази дистильованою водою, додають ортофенілєндіамін, гідроперит (готується суміш перед використанням)

Таблиця

Підготовка контрольного матеріалу

NN	Активність , Од /мл	Розведення	Буфер, мл	Стандарт, мл
1	0	-	0,4	-
2	0,0005	1 9N4	0,9	0,1 N4
3	0,001	1 9N5	0,9	0,1 N5
4	0,005	1 9N6	0,9	0,1 N6
5	0,01	1 9N7	0,9	0,1 N7
6	0,05	1 9 вихідного розчину	0,9	0,1 вихідного розчину
7	0,1	1 4 вихідного розчину	0,8	0,2 вихідного розчину
8	0,5	-	-	0,4 вихідного розчину

Можливість проведення аналізу з використанням запропонованого набору наводиться у прикладах

Приклад 1 Визначення активності ендотеліальної еластази у біологічних рідинах у щурів

1 Окремо на титрувальній дошці готують дослідні зразки (n=40) сироватки крові та екстрактів тканин щурів

2 Вносять у лунки титрувальної дошки контрольний матеріал, приготовлений згідно таблиці на стор 3

3 Проводять реакцію пригнічення активності серинових та метало-протеїназ додаванням до дослідних зразків 1 1 розчину інгібіторів, який приготовлено як вказано раніше, інкубують 5 хвилин при 37 °C

4 Вносять контрольний матеріал і дослідні зразки, які приготовлені згідно пп 1, 2, у лунки відмитого планшета та інкубують при 37°C 15 хв (реакція розщеплення іммобілізованого кон'югату маркерного ферменту пероксидази з пептидним субстратом для еластази, що містить послідовність A1a-A1a)

4 Відмивають пляшку як вказано раніше

5 Готують 50 % сірчану кислоту (у набір не входить)

6 Визначають активність маркерного ферменту додаванням суміші, що містить ортофенілєндіамін та підроперит у цитратному буфері. Інкубують до появи диференційного забарвлення

7 Зупиняють реакцію додаванням по 50 мкл у лунку 50 % сірчаної кислоти

8 Визначають оптичну густину розчинів при 490 нм за допомогою багатоканального мікроспектрофотометра

9 Будується калібровочний графік за результатами вимірювань контрольних зразків та розраховують активність ендотеліальної еластази за формулою

$$A = B \times 2 \text{ (Од /мл), де}$$

A - активність ендотеліальної еластази у Од /мл,

B - активність ендотеліальної еластази, що ви-

значена за калібровочним графіком в Од /мл,

2 - розведення зразків під час проведення реакції з інгібіторами

Приклад 2 Визначення активності ендотеліальної еластази у сироватці крові людини

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 960 мкл буферу додають 40 мкл сироватки, потім до 180 мкл буферу - 20 мкл 1-го розведення сироватки)

2 Вносять у лунки титрувальної дошки контрольний матеріал, приготовлений згідно таблиці на стор 3

3 Проводять реакцію пригнічення активності серинових та метало-протеїназ додаванням до дослідних зразків 1 1 розчину інгібіторів, який приготовлено як вказано раніше, інкубують 5 хвилин при 37 °C

4 Вносять контрольний матеріал і дослідні зразки, які приготовлені згідно пп 1, 2, у лунки відмитого планшета та інкубують при 37 °C 15 хв (реакція розщеплення іммобілізованого кон'югату маркерного ферменту пероксидази з пептидним субстратом для еластази)

5 Відмивають пляшку як вказано раніше

6 Готують 50 % сірчану кислоту (в набір не входить)

7 Визначають активність маркерного ферменту додаванням суміші, що приготовлена з цитратного буферу, ортофенілєндіаміну та підропериту. Інкубують до появи диференційного забарвлення

8 Зупиняють реакцію додаванням по 50 мкл у лунку 50 % сірчаної кислоти

9 Визначають оптичну щільність розчинів при 490 нм за допомогою багатоканального мікроспектрофотометра

10 Будується калібровочний графік за результатами вимірювань контрольних зразків та розраховують активність ендотеліальної еластази за формулою

$$A = B \times 2 \text{ (Од /мл), де}$$

A - активність ендотеліальної еластази у Од /мл,

B - активність ендотеліальної еластази, що ви-

значена за калібровочним графіком в Од /мл,

2 - розведення зразків під час проведення реакції з інгібіторами,

250 - розведення зразків сироватки крові людини,

Висновок Вказані приклади підтверджують можливість здійснення специфічного і високочутливого (10^{-10} Од /мл) способу визначення активності ендотеліальної еластази у біологічних рідинах у щурів і людей, спрощення постановки аналізу за рахунок використання наборів

Технічний результат

1 Можливість специфічного визначення активності ендотеліальної еластази ферментативним методом

2 Висока чутливість аналізу 10^{-10} Од /мл

3 Спрощення проведення аналізу

