



УКРАЇНА

(19) UA (11) 34208 (13) A

(51) 6 G01N33/48, A61B19/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ НЕТРИПСИНОПОДІБНИХ ПРОТЕЇНАЗ, ХІМАЗИ, ЕЛАСАЗОІНГІБІТОРНОЇ АКТИВНОСТІ -1-ІНГІБІТОРА ПРОТЕЇНАЗ ТА РІВНЯ -2-МАКРОГЛОБУЛІНА В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ

(21) 99063318

(22) 15.06.1999

(24) 15.02.2001

(33) UA

(46) 15.02.2001, Бюл. № 1, 2001 р.

(72) Самохіна Любов Михайлівна

(73) Самохіна Любов Михайлівна

(57) Набір для визначення активності нетрипсиноподібних протеїназ (НП), хімази, еластазоінгібіторної активності α -1-інгібітора протеїназ (α -1-ІП) та рівня α -2-макроглобуліна (α -2-МГ) в біологічних рідинах, який містить полістироловий планшет, що іміобілізовано маркерним ферментом, який 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 відмиваючої рідини, цитратний буфер, ортофенілєндіамін і гідроперіт для виявлення залишкової активності маркерного фермента, який **відрізняється** тим, що у наборі для визначення хімази планшет іміобілізовано маркерним фермен-

том, який комплексно пов'язаний із субстратом білкової природи, що містить послідовність Pgo-Phe, у наборі для визначення α -2-МГ планшет іміобілізовано маркерним ферментом, який комплексно пов'язаний із протамінсульфатом, набір для визначення НП, хімази додатково містить і мг інгібітора трипсину із сої (CIT) для пригнічення активності трипсиноподібних протеїназ, набір для визначення α -2-МГ додатково містить 8 мг CIT для пригнічення залишкової активності трипсину, у наборі для визначення еластазоінгібіторної активності α -1-ІП препаратом протеїнази є еластаза, усі компоненти надані у окремих упаковках при наступному складі компонентів:

- препарат протеїнази (трипсин - 1 мг, еластаза - 2-6 мкл),
- фосфатний буфер - 12.5 мл,
- детергент - 0.75 мл,
- цитратний буфер - 6 мл,
- ортофенілєндіамін - 2 мг або 1 таблетка,
- гідроперіт - 1 таблетка,
- CIT - 1 або 3 мг, відповідно.

Винахід відноситься до біохімії і може бути використаний 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 N 2097762, G 01 N 33/48, A 61 B 19/02), який містить у відповідних упаковках наважку трихлоруксусну кислоту, яка при розчиненні у 50 мл 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 сульфаміноокислого, котра при розчиненні у 25 мл дистильованої води дає розчин для зв'язування залишку натрію азотнокислого, розчин N-(1)-нафтилєтилєндіашнодігидрохлориду 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, але він призначений тільки для визначення ароматичних амінів.

Відомий набір для визначення (α -2-макроглобуліна (α -2-МГ) виробництва фірми Boehringer Mannheim (див. Product information a-2-Makroglobulin Farbtest. Test-Combination Nr.: 403768 / Witt I. u. W. Tritschler // J.C1 in. Chem. Cl in. Bir. chem.- 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

(13) A

(11) 34208

(19) UA

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

Відомий спосіб визначення активності протеїнази або їх інгібіторів у біологічних рідинах (див. Пат. РФ N1655991, С 12 Q 1/37), -прототип, що містить полістироловий планшет, який імібілізовано маркерним ферментом і 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 відмиваючої рідини, цитратний буфер, ортофенілєндіамін і гідроперіт для виявлення залишкової активності маркерного фермента.

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

Недоліком відомого способу є складність здійснення етапу підготовки: приготування комплексу маркерного фермента та субстратного білка і його імібілізація на поверхні полістиролових плашок, що потребує використання спеціальних реагентів, обладнання, високої кваліфікації оператора. Крім того, відомий спосіб не передбачає визначення нетрипсиноподібних протеїназ (НП), хімази, еластазоінгібіторної активності α -1-ІП, рівня α -2-МГ, визначення яких може бути використано як критерії прогнозу розвитку, перебігу захворювань різного генезу та контролю ефективності лікування.

Задача винаходу: спрощення способу та розширення його функціональних можливостей.

Поставлена задача вирішена автором шляхом використання запропонованого набору для визначення активності НП, хімази, еластазоінгібіторної активності α -1-ІП та α -2-МГ у біологічних рідинах. У наборі для визначення хімази планшет імібілізовано маркерним ферментом, який комплексно пов'язаний із субстратом білкової природи, що містить послідовність Pro-Phe. У наборі для визначення α -2-МГ планшет імібілізовано маркерним ферментом, який комплексно пов'язаний із протамінсульфатом. Набір для визначення НП, хімази додатково містить 1 мг інгібітора трипсину із сої (СІТ) для пригнічення активності трипсиноподібних протеїназ. Набір для визначення α -2-МГ додатково містить 3 мг СІТ для пригнічення залишкової активності трипсину. У наборі для визначення еластазоінгібіторної активності α -1-ІП препаратом протеїнази є еластаза. Усі компоненти надані у окремих упаковках при наступному складі компонентів: препарат протеїнази (трипсин - 1 мг, еластаза - 2-6 мкг), фосфатний буфер - 12.5 мл, детергент - 0.75 мл, цитратний буфер - 6 мл, ортофенілєндіамін - 2 мг або 1 таблетка, гідроперіт - 1 таблетка, СІТ - 1 або 3 мг, відповідно.

Відрізняючими ознаками є:

- У наборі для визначення хімази планшет імібілізовано маркерним ферментом, який комплексно пов'язаний із субстратом білкової природи, що містить послідовність Pro-Phe.

- У наборі для визначення α -2-МГ планшет імібілізовано маркерним ферментом, який комплексно пов'язаний із протамінсульфатом.

- Набір для визначення НП, хімази додатково містить 1 мг СІТ для пригнічення активності трипсиноподібних протеїназ.

- Набір для визначення α -2-МГ додатково містить 3 мг СІТ для пригнічення залишкової активності трипсину, і

- У наборі для визначення еластазоінгібіторної активності α -1-ІП препаратом протеїнази є еластаза.

- Усі компоненти надані у окремих упаковках при наступному складі компонентів: препарат протеїнази (трипсин - 1 мг, еластаза - 2-6 мкг), фосфатний буфер - 12.5 мл, детергент - 0.75 мл, цитратний буфер - 6 мл, ортофенілєндіамін - 2 мг або 1 таблетка, гідроперіт - 1 таблетка, СІТ - 1 або 3 мг, відповідно.

Виконання будь-якого методу складається з 2-х основних етапів: приготування реагентів, які необхідні для проведення аналізу і серії послідовних операцій здійснення методики (1). 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 порівняння 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.

Відрізняючі ознаки відповідають критерію "новизна" та вимогам винахідницького рівня.

Дослідження по запропонованому набору були проведені в Інституті терапії АМН України. В результаті проведення експериментальних досліджень підібрані оптимальні умови проведення реакції пригнічення активності трипсиноподібних протеїназ за допомогою СІТ. Визначені концентрації кон'югатів маркерного фермента і субстрату хімази, а також маркерного фермента і протамінсульфата, які необхідно для повного насичення поверхні лунок полістиролових плашок. Показано можливість зберігання імібілізованих плашок до 2-х років. Підібрані умови пригнічення залишкової активності трипсину після проведення реакції утворення комплексу трипсин-інгібітори трипсину за допомогою СІТ та умови здійснення повного зв'язування α -1-ІП еластазою. 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 імібілізована маркерним ферментом, що комплексно пов'язано із відповідним субстратом білкової природи.

- Флакон N 1 - детергент, твін-20 (0.75 мл).

- Флакон N 2 - фосфатний буфер (10-15 мл).

- Флакон N 3 - цитратний буфер (6 мл).

- Флакон N 4 - ортофенілєндіамін (2 мг або 1 таблетка).

- Флакон N 5 - препарат протеїнази (1 мг трипсину або 2-6 мкл еластази), відсутній у наборі для визначення хімази, тому що немає промислових стандартних препаратів.

- Флакон N 6 - 0.0025 н HCl (1 мл), присутній у наборі для визначення НП, -2-МГ.

- Флакон N 7 - CIT (1 або 3 мг): 1 мг у наборі для визначення НП, 3 мг - -2-МГ.

- Гідроперит (1 таблетка).

Аналіз здійснюють за Інструкцією, яка надається до набору.

Приготування реагентів із набору:

1. Готують відмиваючу рідину: 0.5 мл детергенту із флакона N 1 додають до 1 л дистильованої води.

2. Готують фосфатний буфер: рідину із флакона N 2 доводять до 250 мл дистильованою водою 1 додають 0.25 мкл детергенту із флакона N 1.

3. Відмивають плашку 2-3 рази дистильованою водою, яка містить детергент.

4. Готують вихідний розчин протеїнази та контрольний матеріал (на льоду) :

Препарат протеїнази із флакону N 5, що у наборі для визначення НП, α -2-МГ (трипсин), спочатку розчиняють у 1 мл 0.0025 н HCl. Потім 160 МЕЛ розчину додають до 19.84 мл фосфатного буферу, який містить детергент, - вихідний розчин. Надалі проводять серію послідовного розведення вихідного розчину за таблицею 1

Препарат протеїнази (еластаза), що у наборі для визначення еластазоінгібіторної активності α -1-ІП готують за табл. 2

Примітка: Вихідний розчин еластази готують додаючи 10.8 мл фосфатного буферу, який приготовлено раніше із флакона N 2.

5. Готують CIT безпосередньо перед використанням, на льоду (у наборі для визначення НП або α -2-МГ): у флакон N 7 додають відповідно 1 або 3 мл фосфатного буферу, який приготовлено раніше по п. 2, -вихідний розчин. Потім розводять: з набору для визначення НП у 100000 разів, наприклад, спочатку у 100 (50:4950 мкл), потім у 1000 разів (50:49950 мкл); з набору для визначення α -2-МГ додають 2.25 мл вихідного розчину до 12.61 мл фосфатного буферу.

6. Готують суміш для виявлення залишкової активності маркерного фермента: цитратний буфер із флакона N 3 розводять 1 до 2 дистильованою водою, додають ортофенілєндіамін із флакона N 4 або таблетку, потім - гідроперит (готується суміш перед використанням).

Проведення аналізу:

1. Окремо на титровальній дошці готують дослідні зразки (n=40, для визначення хімази n=47): зразки плазми/сироватки крові людини розводять у 250 разів (на льоду) 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). Зразки слини людини, сироватки крові та цитозолу тканин шурів розведення не потребують.

2. Вносять у лунки титровальної дошки контрольний матеріал.

3. Для визначення НП, хімази проводять реакцію пригнічення активності трипсиноподібних

протеїназ додаючи до дослідних зразків 1:1 розчину CIT, інкубують 5 хвилин при 37°C.

4. Для визначення еластазоінгібіторної активності -1-ІП або -2-МГ проводять реакцію утворення комплексу протеїназа-інгібітор протеїназ, додаючи до дослідних зразків 1:1 вихідного розчину протеїнази (еластази або трипсину, відповідно).

5. При визначенні α -2-МГ після утворення комплексу протеїназа-інгібітор протеїназ пригнічують залишкову активність трипсину додаючи 1:1 розчину CIT, інкубують 5 хвилин при 37°C.

6. Проводять протеолітичну реакцію розщеплення імобілізованого маркерного фермента, який комплексно пов'язано із білковим субстратом: вносять у лунки полістиролових плашок (по 100 мкл) контрольний матеріал та дослідні зразки, що приготовлені по пп. 3, 4 або 5, 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 імобілізованого маркерного фермента додаючи суміш, що приготовлена з цитратного буферу, ортофенілєнд і аміну та гідропериту. Інкубують протягом 3-5 хвилин.

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

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

12. Будують калібровочний графік за результатами вимірювань контрольних зразків (крім визначення хімази) та розраховують активність протеїназ або інгібіторів за відповідними формулами (показано у прикладах).

Можливість здійснення аналізу з використанням запропонованого набору підтверджується прикладами.

Приклад 1. Визначення НП у сироватці крові людини.

Приготування реагентів із набору:

1. Готують відмиваючу рідину: 0.5 мл детергенту із флакона N 1 додають до 1 л дистильованої води.

2. Готують фосфатний буфер: рідину із флакона N 2 доводять до 250 мл дистильованою водою і додають 0.25 мкл детергенту із флакона N 1.

3. Відмивають плашку 2-3 рази дистильованою водою, яка містить детергент.

4. Готують вихідний розчин протеїнази та контрольний матеріал (на льоду):

Препарат протеїнази із флакона N 5 (трипсин) спочатку розчиняють у 1 мл 0.0025 н HCl. Потім 160 мкл розчину додають до 19.84 мл фосфатного буферу, який містить детергент, - вихідний розчин. Контрольний матеріал готують шляхом серії послідовного розведення вихідного розчину за схемою, яка представлена у Табл.1.

5. Готують CIT безпосередньо перед використанням (на льоду): у флакон N 7 додають відповідно 1 мл фосфатного буферу, що приготовлено раніше по п. 2, - вихідний розчин. Потім розводять у 100000 разів, наприклад, спочатку у 100 (50:4950 мкл), потім у 1000 разів (50:49950 мкл).

6. Готують суміш для виявлення залишкової активності маркерного фермента: цитратний буфер із флакона N 3 розводять у 2 рази дистильованою водою, додають ортофенілендіамін із флакона N 4 або таблетку, потім - гідроперит (готується суміш перед використанням).

Проведення аналізу:

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

2. Вносять у лунки титровальної дошки контрольний матеріал.

3. Проводять реакцію пригнічення активності трипсиноподібних протеїназ додаючи до дослідних зразків 1:1 розчин CIT, інкубують 5 хвилин при 37°C.

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

7. Усувають реакційну суміш, відмиваючи плашки як вказано раніше.

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

9. Визначають залишкову активність імобілізованого маркерного фермента додаючи суміш, що приготовлена з цитратного буферу, ортофенілендіаміну та гідропериту. Інкубують протягом 3-5 хвилин.

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

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

12. Будують калібровочний графік за результатами вимірювань контрольних зразків та розраховують активність НР за формулою:

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

де: Сзал. - концентрація НР, яка визначена по калібровочній кривій, мкг/мл, 250 - розведення зразків сироватки крові людини,

4 - коефіцієнт перерахунку на 1 годину, 1000 - коефіцієнт перерахунку на 1 л, 1000000 - коефіцієнт перерахунку у грами.

Приклад 2. Визначення хімази у сироватці крові людини.

Приготування реагентів із набору:

1. Готують відмиваючу рідину: 0.5 мл детергенту із флакона N 1 додають до 1 л дистильованої води.

2. Готують фосфатний буфер: рідину із флакона N 2 доводять до 250 мл дистильованою водою і додають 0.25 мкл детергенту із флакона N 1.

3. Відмивають плашку 2-3 рази дистильованою водою, яка містить детергент.

4. Готують CIT безпосередньо перед використанням (на льоду): у флакон N 7 додають відповідно 1 мл фосфатного буферу, який приго-

товлено раніше по п. 2, - вихідний розчин. Потім розводять у 100000 разів, наприклад, спочатку у 100 (50:4950 мкл), потім у 1000 разів (50:49950 мкл).

5. Готують суміш для виявлення залишкової активності маркерного фермента: цитратний буфер із флакона N 3 розводять у 2 рази дистильованою водою, додають ортофенілендіамін із флакона N 4 або таблетку, потім - гідроперит (готується суміш перед використанням).

Проведення аналізу:

1. Окремо на титровальній дошці готують дослідні зразки (n=40): зразки плазми/сироватки крові людини розводять у 250 разів (на льоду) фосфатним буфером, який приготовлено раніше по п. 2, 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 титровальної дошки контрольний матеріал (фосфатний буфер).

3. Проводять реакцію пригнічення активності трипсиноподібних протеїназ додаючи до дослідних зразків 1:1 розчину CIT, інкубують 5 хвилин при 37°C.

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

7. Усувають реакційну суміш відмиванням як вказано раніше.

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

9. Визначають залишкову активність імобілізованого маркерного фермента, додаючи суміш, що приготовлена з цитратного буферу, ортофенілендіаміну та гідропериту. Інкубують протягом 3-5 хвилин.

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

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

12. Будують калібровочний графік за результатами вимірювань контрольних зразків та розраховують активність хімази по розщепленню субстрату у процентах зменшення оптичної щільності у дослідних зразках порівняно з контролем, де активність імобілізованої пероксидази є максимальною (100%).

$$\frac{B \cdot 100}{A} \%$$

де А - оптична щільність контрольного зразка у одиницях екстинції,

В - оптична щільність дослідного зразка в одиницях екстинції,

100 - коефіцієнт перерахунку у проценти.

Приклад 3. Визначення еластазоінгібіторної активності α -1-ІП у сироватці крові та цитозолі тканин шурів.

Приготування реагентів із набору:

1. Готують відмиваючу рідину: 0.5 мл детергенту із флакона N 1 додають до 1 л дистильованої води.

2. Готують фосфатний буфер: рідину із флакона N 2 доводять до 250 мл дистильованою водою і додають 0.25 мкл детергенту із флакона N 1.

3. Відмивають плашку 2-3 рази дистильованою водою, яка містить детергент.

4. Готують вихідний розчин протеїнази та контрольний матеріал (на льоду):

Вихідний розчин еластази готують доданням 10.8 мл фосфатного буферу, що приготовлено раніше із флакона N 2.

Калібровочний матеріал готують за схемою, яка надана у Табл.2.

5. Готують суміш для виявлення залишкової активності маркерного фермента: цитратний буфер із флакона N 3 розводять у 2 рази дистильованою водою, додають ортофенілєндіамін із флакона N 4 або таблетку, потім - гідроперит (готується суміш перед використанням).

Проведення аналізу:

1. Окремо на титровальній дошці готують дослідні зразки.

2. Вносять у лунки титровальної дошки контрольний матеріал.

3. Проводять реакцію утворення комплексу еластаза-інгібітор протеїназ додаючи до дослідних зразків 1:1 вихідного розчину, інкубують 15 хвилин при 20°C.

4. Проводять протеолітичну реакцію розщеплення імобілізованого маркерного ферменту, який комплексно пов'язаний із білковим субстратом: вносять у лунки полістиролових плашок (по 100 мкл) 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 імобілізованого маркерного фермента додаючи суміш, що приготовлена з нітратного буферу, ортофенілєндіаміну та гідропериту. Інкубують протягом 3-5 хвилин.

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

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

12. Будують калібровочний графік за результатами вимірювань контрольних зразків та розраховують еластазоінгібіторну активність α -1-ІП за формулою:

$$A = (0.5 - A_{\text{азал}}) \cdot 2 (O_{\text{д}} / \text{мл}),$$

де: 0.5 - активність еластази, яку добавлено до зразків для зв'язування з інгібіторами протеїназ, Азал. - залишкова активність еластази, що визначена по калібровочній кривій, $O_{\text{д}}$ /мл,

2 - розведення зразків під час проведення реакції зв'язування еластази з інгібіторами протеїназ дослідних зразків (1:1).

Приклад 4. Визначення рівня α -2-МГ у сироватці крові та цитозолі тканин щурів.

Приготування реагентів із набору:

1. Готують відмиваючу рідину: 0.5 мл детергенту із флакона N 1 додають до 1 л дистильованої води.

2. Готують фосфатний буфер: рідину із флакона N 2 доводять до 250 мл дистильованою водою і додають 0.25 мкл детергенту із флакона N 1.

3. Відмивають плашку 2-3 рази дистильованою водою, яка містить детергент.

4. Готують вихідний розчин протеїнази та контрольний матеріал (на льоду):

Препарат протеїнази із флакона N 5 (трипсин) спочатку розчиняють у 1 мл 0.0025 н НС1. Потім 160 мкл розчину додають до 19.84 мл фосфатного буферу, який містить детергент, - вихідний розчин. Контрольний матеріал готують шляхом серії послідовного розведення вихідного розчину за схемою, що надана у Табл.1.

5. Готують СІТ (безпосередньо перед використанням, на льоду): у флакон N 7 додають 3 мл фосфатного буферу, який приготовлено раніше по п. 2, - вихідний розчин. Потім додають 2.25 мл вихідного розчину до 12.61 мл фосфатного буферу.

6. Готують суміш для виявлення залишкової активності маркерного фермента: цитратний буфер із флакона N 3 розводять у 2 рази дистильованою водою, додають ортофенілєндіамін із флакона N 4 або таблетку, потім - гідроперит (готується суміш перед використанням).

Проведення аналізу:

1. Окремо на титровальній дошці готують дослідні зразки (n=40) по 100 мкл.

2. Вносять у лунки титровальної дошки контрольний матеріал.

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

4. Пригнічують залишкову активність трипсину додаючи 1:1 розчин СІТ, інкубують 5 хвилин при 37°C.

6. Проводять протеолітичну реакцію розщеплення імобілізованого маркерного фермента, який комплексно пов'язаний із білковим субстратом: вносять у лунки полістиролових плашок (по 100 мкл) 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 імобілізованого маркерного фермента, додаючи суміш, що приготовлена з цитратного буферу, ортофенілєндіаміну та гідропериту. Інкубують протягом 3-5 хвилин.

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

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

12. Будують калібровочний графік за результатами вимірювань контрольних зразків та розраховують рівень α -2-МГ за формулою:

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

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 1 л,
1000 - коефіцієнт перерахунку у мг.

хімази, еластазоінгібіторної активності α -1-ІП, α -2-МГ у різних біологічних рідинах.

Висновок: Вказані приклади підтверджують можливість спрощення постановки аналізу НП,

Таблиця 1

NN стан-дартів	Концентрація, мкг/мл	Розведення	Буфер, мл	Таблиця 1. Протеїназа, мл
1	0	-	1.0	-
2	0.005	1:9 N 4	1.8	0.2 N 4
3	0.01	1:9 N 5	1.8	0.2 N 5
4	0.05	1:3 N 6	1.2	0.4 N 6
5	0.1	1:9 N 7	1.8	0.2 N 7
6	0.2	1:19 N 8	1.9	0.1 N 8
7	1.0	1:7 вихідного розчину	1.4	0.2 вихідного розчину
8	4.0	1:1 вихідно-го розчину	0.75	0.75 вихідно-го розчину

Таблиця 2

NN стандартів	Актив-ність еластази, U/мл	Розведення	Буфер, мл	Еластаза, мл
1	0	-	0.9	-
2	0.0005	1:9 N 4	0.9	0.1 N 4
3	0.001	1:9 N 5	0.9	0.1 N 5
4	0.005	1:9 N 6	0.9	0.1 N 6
5	0.01	1:9 N 7	0.9	0.1 N 7
6	0.05	1:9 N 8	0.9	0.1 N 8
7	0.1	1:4 N 8	0.8	0.2 N 8
8	0.5	1:1 вихідно-го розчину	1.1	0.1 вихід-ного розчину

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60x84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22
