

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201900248** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.01.31

(51) Int. Cl. *C12N 9/48* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.04.10

(54) **СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПО ГИДРОЛИЗУ СУБСТРАТА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ**

(31) **2018115367**

(32) **2018.04.24**

(33) **RU**

(96) **2019000031 (RU) 2019.04.10**

(71) Заявитель:

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ "БАШКИРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ" (RU)**

(72) Изобретатель:

**Цветков Вячеслав Олегович,
Шпирная Ирина Андреевна,
Максутова Вилена Олеговна (RU)**

(57) Изобретение относится к области биохимии и энзимологии и может быть использовано для количественного определения протеолитической активности в водных растворах. Сущность способа состоит в использовании полиакриламидного геля, содержащего 3,9% акриламида, 0,1% метиленбисакриламида, 1% желатина и 0,05 М трис-буферный раствор, pH 8, в качестве растворителя, и стандартного 96-луночного иммунологического планшета, в лунки которого вносят по 200 мкл образцов с протеолитической активностью, соединении планшета с гелем таким образом, чтобы обеспечить контакт образцов с гелем в течение 20 мин без смешивания образцов между собой, окрашивании геля раствором кумасси, фотографировании геля и определении среднего значения цвета в цветовой модели RGB участков изображения, соответствующих зонам контакта с гелем отдельных образцов, с последующим пересчетом полученных значений в единицы ферментативной активности с помощью предварительно полученной калибровочной формулы.

A2

201900248

201900248

A2

СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ПО ГИДРОЛИЗУ СУБСТРАТА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Предлагаемое изобретение относится к области биохимии и энзимологии и может быть использовано для количественного определения активности протеолитических ферментов различного биологического происхождения.

Исследование протеолитических ферментов и количественная оценка их активности представляет интерес, в частности, ввиду их важной роли во взаимодействии организмов-фитофагов и патогенов с сельскохозяйственными растениями как одного из ключевых факторов агрессивности патогенов и фитофагов. Раскрытие молекулярных механизмов взаимодействия растений с патогенами и фитофагами является необходимым условием создания экологически-безопасных методов защиты культурных растений.

В настоящее время в практике исследовательских лабораторий практически отсутствуют простые, быстрые и дешевые, но в то же время чувствительные методы количественного определения активности протеолитических ферментов. Поэтому разработка новых и модификация существующих методов определения активности протеаз остается актуальной задачей.

Наиболее близким к предлагаемому является способ определения активности протеолитических ферментов по гидролизу субстрата, иммобилизованного в геле агарозы. При этом используется 1%-ный агарозный гель, содержащий 1% субстрата и 0,05М трис-буферный раствор, pH 8, в качестве растворителя, и плашка – крышка от стандартного 96-луночного иммунологического планшета. В плашку заливают 20 мл геля, после остывания и затвердевания в геле вырезают лунки диаметром 4 мм с помощью пробкового сверла. В лунки помещают исследуемые образцы ферментов объемом 20 мкл, гель накрывают крышкой и помещают в термостат на 10 часов. После инкубации и окрашивания бромфеноловым синим активность протеолитических ферментов оценивают количественно по площади зон гидролизованного субстрата вокруг лунок с раствором фермента (Shpirnaya, I.A., Umarov, I.A., Shevchenko, N.D., Ibragimov, R.I. Evaluation of the activity of hydrolases and their inhibitors using substrates immobilized on agarose gel. Applied Biochemistry and Microbiology. 2009. № 45 (4), pp. 449-453).

Однако данный способ длителен, так как необходима инкубация в течение 10 часов для диффузии фермента в гель, и трудоемок, т.к. предполагает работу по вырезанию лунок в геле. Кроме того, данный способ предполагает относительно высокий расход геля, содержащего дорогостоящий препарат – агарозу.

Цель изобретения – ускорение, облегчение с точки зрения трудоемкости, удешевление способа определения протеолитических ферментов.

Поставленная цель достигается тем, что для иммобилизации субстрата используют полиакриламидный гель, содержащий 3,9% акриламида и 0,1% метиленбисакриламида, 1% желатина и 0,05М трис-буферный раствор, pH 8, в качестве растворителя. Образцы растворов, обладающих ферментативной активностью, помещают в лунки стандартного 96-луночного иммунологического планшета. За счет малой толщины геля время, необходимое для диффузии фермента в гель, не превышает 20 минут. Изображения гелей анализируют для определения среднего значения цвета участков изображения, соответствующих отдельным лункам.

Предлагаемый способ определения гидролитической активности осуществляется следующим образом.

Стандартный 96-луночный планшет для иммуноферментного анализа помещают в суховоздушный термостат. В термостате должна поддерживаться температура, при которой будет производиться определение активности исследуемого фермента.

Собирают стекла со слейсерами, обеспечивающими пространство между ними, аналогично тому, как это делается при заливке геля для вертикального электрофореза.

Готовят раствор 4%-ного полиакриламидного геля по следующей прописи: H_2O - 5 мл, буферный раствор (0,05М трис-буфер, рН 8) - 3 мл, 30%-ный ПААГ (29,2% акриламида, 0,8% метиленбисакриламида) - 2 мл, желатин - 100 мг, TEMED - 4 μ l, 10%-ный ПСА - 40 μ l.

Количество раствора должно быть достаточным для заливки в стекла имеющегося размера. При избытке или недостатке раствора количество компонентов следует пропорционально изменить.

Заливают гель в стекла аналогично тому, как это делается при заливке геля для вертикального электрофореза. Гель полимеризуется около 15 минут. На время полимеризации помещают стекла в суховоздушный термостат, поддерживающий температуру, при которой будет производиться определение активности исследуемого фермента.

Помещают исследуемые образцы в лунки стандартного 96-луночного планшета для иммуноферментного анализа. Объем образца в каждой лунке должен составлять 200 мкл. Если образцы получаются путем смешивания различных жидкостей, перемешивают жидкость в лунках планшета с использованием вортекса.

После полимеризации геля разделяют стекла, чтобы гель остался на одном из стекол. Смывают с поверхности геля незаполимеризовавшийся акриламид дистиллированной водой, стряхивают остатки воды, просушивают поверхность геля фильтровальной бумагой. Помещают стекло с гелем на планшет таким образом, чтобы гель закрыл сверху лунки с образцами. Закрепляют стекло с гелем на планшете с помощью резинок. После закрепления гель должен герметично закупоривать лунки с образцами и быть неподвижным относительно планшета при его переворачивании.

Переворачивают получившуюся конструкцию, чтобы стекло оказалось внизу, а планшет – сверху. Покачивают конструкцию в руке подобно маятнику, чтобы жидкость в лунках стекла на гель. Движения должны быть очень плавными, исключая смещение геля относительно планшета и просачивание образцов за пределы лунок. Помещают конструкцию в термостат на 20 минут. На рис. 1 представлено схематичное изображение конструкции для определения активности: 1 – иммунологический планшет, 2 – образец с ферментативной активностью в лунке планшета, 3 – полиакриламидный гель, 4 – стекло.

Для окрашивания геля используют раствор Кумасси. Объем раствора подбирается для геля конкретного размера.

По истечении 20 минут переворачивают конструкцию стеклом вверх, стряхивают растворы образцов на дно лунок, снимают резинки, отделяют стекло с гелем от планшета и немедленно промывают поверхность геля водой. Снимают гель со стекла и максимально быстро и равномерно погружают в окрашивающий раствор. Время окрашивания подбирается для геля конкретного размера.

После окрашивания получают цифровое изображение геля с помощью бытового сканера или гель-документирующей системы. Определяют среднее значение цвета участков изображения, соответствующих отдельным лункам. При этом для количественного определения ферментативной активности используется определение среднего значения цвета в цветовой модели RGB участков изображения, соответствующих зонам контакта с гелем отдельных образцов, с последующим пересчетом полученных значений в единицы ферментативной активности с помощью предварительно полученной калибровочной формулы.

Сущность изобретения. Благодаря использованию более прочного полиакриламидного геля (вместо агарозного) данный способ позволяет сделать гель более тонким. Данное обстоятельство, а также тот факт, что диффузия молекул фермента в анализируемом участке геля происходит перпендикулярно плоскости геля (в отличие от наиболее близкого аналога, где фермент диффундирует параллельно плоскости геля), позволили сократить время инкубации геля с образцами до 20 минут (вместо 10 часов у наиболее близкого аналога). Кроме того, реактивы, необходимые для формирования полиакриламидного геля, являются значительно более дешевыми (по сравнению с агарозой, используемой в наиболее близком аналоге), что также является важным преимуществом предлагаемого способа.

Пример. Для изучения возможности количественного определения активности протеаз брали растворы с различным содержанием коммерческого препарата трипсина. Гели окрашивали кумасси, изображения гелей анализировали в компьютерной программе для определения яркости отдельных участков изображения.

Как видно, на гелях (рис. 2-5), окрашенных кумасси, выявляются участки с различной яркостью, зависящей от концентрации фермента, что допускает возможность количественного анализа. На рис. 2 представлен гель с различным количеством фермента после окрашивания кумасси.; а рис. 3 - результат анализа геля с различным количеством фермента после окрашивания кумасси. По горизонтальной оси – количество микролитров раствора фермента; по вертикальной оси – среднее значение цвета участка геля. В качестве величины погрешности показан доверительный интервал выборочного среднего; на рис. 4. - результат анализа геля с различным количеством раствора трипсина после окрашивания кумасси. По горизонтальной оси – количество микролитров раствора фермента; по вертикальной оси – среднее значение цвета участка геля. В качестве величины погрешности показан доверительный интервал выборочного среднего; на рис. 5. - результат анализа геля с различным количеством протеаз *L. decemlineata* после окрашивания кумасси. По горизонтальной оси – количество микролитров раствора фермента; по вертикальной оси – среднее значение цвета участка геля. В качестве величины погрешности показан доверительный интервал выборочного среднего.

Сопоставительный анализ с прототипом показал, что предлагаемый способ отличается от известного тем, что в качестве поддерживающей среды используется не агарозный, а значительно более дешевый полиакриламидный гель. Предлагаемый способ не требует формирования лунок в геле, что значительно снижает трудоемкость процесса.

Таким образом, предлагаемое техническое решение соответствует критерию изобретения «новизна».

Проведенный анализ патентной и специальной литературы показал, что предлагаемый способ отличается не только от прототипа, но и от других технических решений в данной и смежных областях. Так, авторами не найден способ определения протеолитической активности, который предполагал бы использование полиакриламидного геля для

иммобилизации субстрата. Предлагаемый способ предполагает использование минимальных количеств реактивов, не требует оснащения специальной аппаратурой и дорогостоящими реактивами, осуществляется в течение короткого промежутка времени. Таким образом, способ экономичен, прост в постановке и учете результатов реакции, доступен для широкого применения.

Данный способ может быть использован в клинических и научно-исследовательских лабораториях для определения протеолитической активности в водных растворах.

Таким образом, предлагаемый способ определения гидролитической активности соответствует критериям «изобретательский уровень» и «промышленная применимость».

Формула изобретения

1. Способ определения протеолитической активности ферментов по гидролизу субстрата, иммобилизованного в полиакриламидном геле, включающий приготовление геля, инкубацию образцов в контакте с гелем, окрашивание геля кумасси и фотографирование геля, отличающийся тем, что поддерживающей средой является гель полиакриламида, содержащий 3,9% акриламида, 0,1% метиленбисакриламида, 1% желатина и 0,05М трис-буферный раствор в качестве растворителя, в котором отсутствуют лунки для нанесения образца, а образцы в объеме 200 мкл помещаются в лунки стандартного 96-луночного иммунологического планшета, планшет соединяется с гелем таким образом, чтобы обеспечить контакт образцов с гелем без смешивания образцов между собой, определение производится в течение 20 минут, при этом для количественного определения ферментативной активности используется определение среднего значения цвета в цветовой модели RGB участков изображения, соответствующих зонам контакта с гелем отдельных образцов, с последующим пересчетом полученных значений в единицы ферментативной активности с помощью предварительно полученной калибровочной формулы.

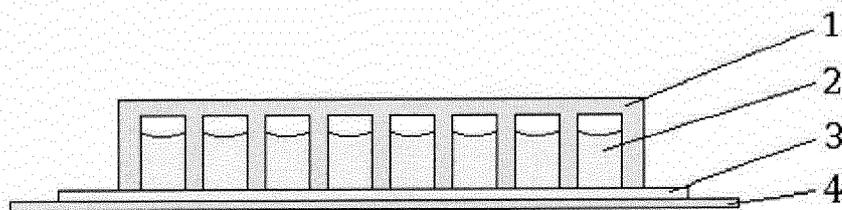


Рис. 1. Схематичное изображение конструкции для определения активности.

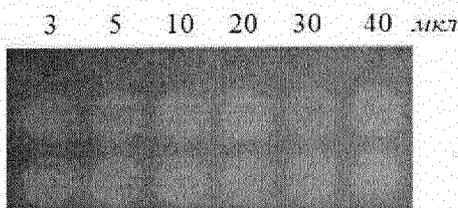


Рис. 2. Гель с различным количеством фермента после окрашивания кумасси.

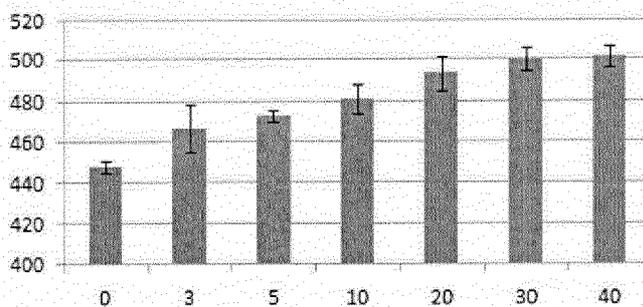


Рис. 3. Результат анализа геля с различным количеством фермента после окрашивания кумасси.



Рис. 4. Результат анализа геля с различным количеством раствора трипсина после окрашивания кумасси.

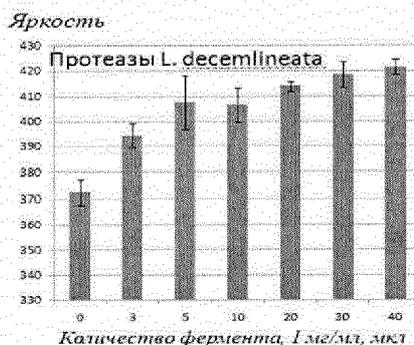


Рис. 5. Результат анализа геля с различным количеством протеаз *L. decemlineata* после окрашивания кумасси.