

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201900249 (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 АМИЛОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПО ГИДРОЛИЗУ СУБСТРАТА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

(31) 2018115389

(32) 2018.04.24

(33) RU

(96) 2019000034 (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 амилаолитической активности в водных растворах. Сущность способа состоит в использовании полиакриламидного геля, содержащего 3,9% акриламида, 0,1% метиленбисакриламида, 1% крахмала и 0,2 М фосфатный буферный раствор, pH 6, в качестве растворителя, и стандартного 96-луночного иммунологического планшета, в лунки которого вносят по 200 мкл образцов с амилаолитической 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 Люголя, 50 мкл на 50 мл воды, 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

201900249

201900249

A2

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

Изобретение относится к области биохимии и энзимологии и может быть использовано для количественного определения активности амилаолитических ферментов различного биологического происхождения.

Исследование амилаолитических 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 амилаолитических ферментов. Поэтому разработка новых и модификация существующих методов определения активности амилаз остается актуальной задачей.

Наиболее близким к предлагаемому является способ определения активности амилаолитических ферментов по гидролизу субстрата, иммобилизованного в геле агарозы. При этом используется 1%-ный агарозный гель, содержащий 1% субстрата и ацетатный буферный раствор, pH 5,6, 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 раствором Люголя активность амилаолитических 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 является ускорение, облегчение с точки зрения трудоемкости, удешевление способа определения амилаолитических ферментов.

Поставленная цель достигается тем, что для иммобилизации субстрата используют полиакриламидный гель, содержащий 3,9% акриламида и 0,1% метиленбисакриламида, 1% крахмала и 0,2М фосфатный буферный раствор, pH 6, 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 спейсерами, 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 (0,2М фосфатный буфер, pH 6) - 3 мл, 30%-ный ПААГ (29,2% акриламида, 0,8% метиленбисакриламида) - 2 мл, крахмал - 100 мг, TEMED - 4 μl , 10%-ный ПСА - 40 μl .

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. Схематичное изображение конструкции представлено на рис. 1: 1 – иммунологический планшет, 2 – образец с ферментативной активностью в лунке планшета, 3 – полиакриламидный гель, 4 – стекло.

Переворачивают получившуюся конструкцию, чтобы стекло оказалось внизу, а планшет – вверху. Покачивают конструкцию в руке подобно маятнику, чтобы жидкость в лунках стекла на гель. Движения должны быть очень плавными, исключаящими смещение геля относительно планшета и просачивание образцов за пределы лунок. Помещают конструкцию в термостат на 20 минут.

Готовят окрашивающий раствор. Для окрашивания геля используют раствор Люголя, 50 мкл на 50 мл воды. 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 амилаз готовили растворы с различным содержанием коммерческого препарата амилазы *Bacillus subtilis*, препаратов амилаз насекомых и человека. Изображения гелей анализировали с использованием компьютерной программы для определения среднего значения цвета точек на выделенном участке изображения. На рисунках 2-4 показаны результаты обработки полученных данных. На рис. 2 представлены результаты анализа изображений гелей после воздействия амилазы *Bacillus subtilis*. По горизонтальной оси – количество микролитров фермента, по вертикальной – среднее значение цвета участка изображения; на рис. 3 – результаты анализа изображений гелей после воздействия амилазы *Leptinotarsa decemlineata*. По горизонтальной оси – количество микролитров фермента, по вертикальной – среднее значение цвета участка изображения; на рис. 4 – результаты анализа изображений гелей после воздействия амилазы слюны человека. По горизонтальной оси – количество микролитров фермента, по вертикальной – среднее значение цвета участка изображения.

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 амилазной 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 амилалитической активности в водных растворах.

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

Формула изобретения

1. Способ определения амилалитической активности ферментов по гидролизу субстрата, иммобилизованного в полиакриламидном геле, включающий приготовление геля, инкубацию образцов в контакте с гелем, окрашивание геля разбавленным раствором Люголя в концентрации 50 мкл на 50 мл воды, и фотографирование геля, отличающийся тем, что поддерживающей средой является гель полиакриламида, содержащий 3,9% акриламида, 0,1% метиленбисакриламида, 1% крахмала и 0,2М фосфатный буферный раствор в качестве растворителя, в котором отсутствуют лунки для нанесения образца, при этом 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, а 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.

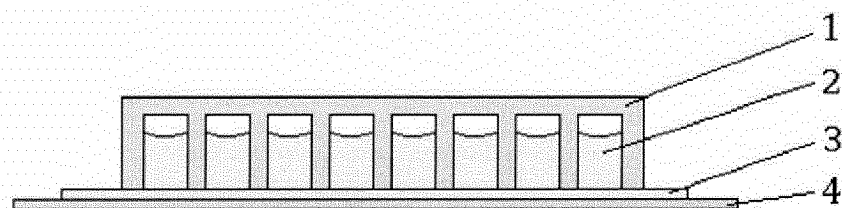


Рис. 1. Схематичное изображение конструкции для определения активности

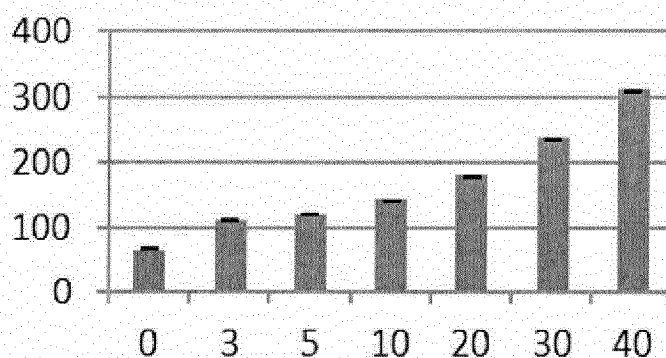


Рис. 2. Результаты анализа изображений гелей после воздействия амилаз *Bacillus subtilis*.

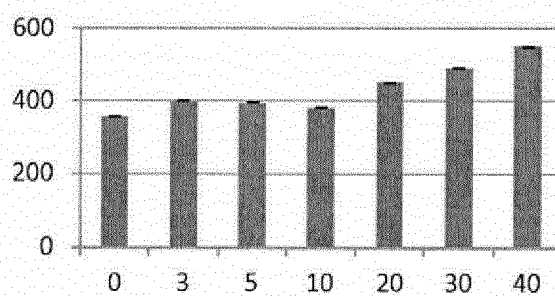


Рис. 3. Результаты анализа изображений гелей после воздействия амилаз *Leptinotarsa decemlineata*.

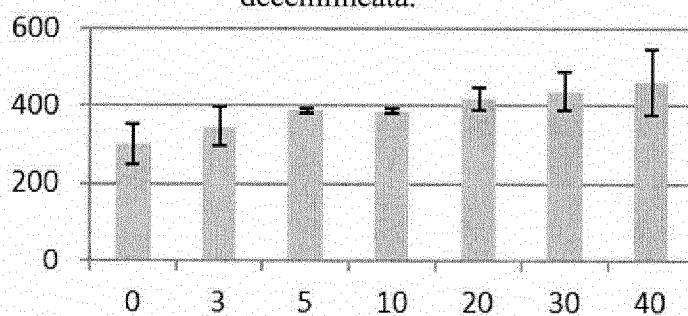


Рис. 4. Результаты анализа изображений гелей после воздействия амилазы слюны человека.