



УКРАЇНА

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВО(19) UA (11) 23805 (13) A
(51) C 12 Q 1/02; G 01 N 33/48ОПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДбез проведення експертизи по суті
на підставі Постанови Верховної Ради України
№ 3769-XII від 23 XII 1993 рПублікується
в редакції заявника

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ ТА РОЗЧИНАХ

1

(21) 94127866
(22) 05.12.94
(24) 16.06.98
(46) 31.08.98. Бюл. № 4
(47) 16.06.98
(72) Самохіна Любов Михайлівна, Стародуб
Микола Федорович
(73) Інститут терапії Академії медичних наук
України
(57) Способ определения тяжелых металлов
в биологических жидкостях и растворах, за-
ключающийся в проведении реакции инги-

2

бирования маркерного фермента и опреде-
лении остаточной ферментативной актив-
ности по окрашиванию субстрата, нанесенного
на подложку, о т л и ч а ю щ и с я тем, что в
качестве подложки используют полистирол,
на который сенсibiliзируют маркерный
фермент, реакцию ингибирования проводят
непосредственно на полистироле, удаляют
реакционную жидкость отмыванием перед
определением остаточной ферментативной
активности на полистироле.

Предлагаемое изобретение относится к
биохимии и может быть использовано в ме-
дицине, токсикологии, ветеринарии, сель-
ском хозяйстве в лабораторных условиях
при исследовании биологических жидкостей
и других веществ.

Известен способ (прототип) быстрого и
простого определения в полевых условиях в
питьевой и сточных водах, почве и донных
отложениях, золе на уровне "мг/мл" кадмия,
свинца, ртути и др. тяжелых металлов [Пат.
ГДР № 4026147, кл. С 12 Q 1/02
(Academ.Wissen-Schaften DDR. - № 518686;
заявл. 03.05.90; НКИ 435/288)//Реф журн.
"Биотехнология". - 1993. - № 6 - Р1653П].

Способ основан на специфическом ин-
гибировании последними микробной бета-
галактозидазы и позволяет отличить
тяжелые металлы от химических веществ
неметаллов, которые бета-галактозидазу не
инактивируют. Анализируемую пробу инку-

бируют в течение 90 мин при температуре
35°C с содержащими бета-галактозидазу
клетками E coli, каплю инкубационной сме-
си наносят на подложку из фильтрующего
материала, пропитанную раствором хромо-
генного или флюорогенного субстрата, и по
ослаблению интенсивности окраски по
сравнению с таковой в контроле судят о на-
личии в пробе тяжелых металлов

Недостатком прототипа является низ-
кая чувствительность (10^{-3} г/мл) и длитель-
ность проведения реакции ингибирования
(90 мин).

Задача изобретения: повышение чувст-
вительности теста для расширения его фун-
кциональных возможностей

Для решения поставленной задачи про-
водят реакцию ингибирования маркерного
фермента и определяют остаточную фер-
ментативную активность по окрашиванию
субстрата, нанесенного на подложку При

(19) UA (11) 23805 (13) A

этом в качестве подложки используют полистирол, на который сенсibilизируют маркерный фермент. Реакцию ингибирования проводят непосредственно на полистироле. Определяют остаточную ферментативную

активность на полистироле после удаления реакционной жидкости отмыванием.

Отличительными признаками предлагаемого изобретения являются:

– В качестве подложки используют полистирол.

– Сенсibilизируют маркерный фермент на полистирол.

– Проводят реакцию ингибирования непосредственно на полистироле.

– Удаляют реакционную жидкость отмыванием.

– Определяют остаточную ферментативную активность на полистироле путем добавления субстратной смеси.

Использование сенсibilизированного маркерного фермента (бета-галактозидаза, пероксидаза и др.) позволяет разработать высокочувствительные методы определения веществ в биологических жидкостях. Чувствительность анализа увеличивается до 10^{-9} – 10^{-12} г по сравнению с реакциями в растворе (без процесса сенсibilизации).

Это показано ранее для протеиназ:

– Andrews A.T. A new approach to the general detection and measurement of the proteinase and proteinase inhibitor activities//*Biochem. et biophys. acta.* – 1982. – V.708. – P.194–202; Самохина Л.М., Дубинин А.А. Использование техники иммуноферментного анализа для определения протеиназ и их ингибиторов//Применение иммуноферментного анализа в медицине: Докл.респ.научн.конф. (Харьков, 28–29 ноября 1989 г.): Тез.докл. – Харьков, 1989. – С.62; Самохина Л.М. Стан системи протеїназа-альфа-1-інгібітор протеїназ при хворобі щурів/Автореф.дисерт. на здобуття вчен.ст. канд.біол.наук. – Харків, 1994. – 16 с.

Использование в качестве подложки полистирола дает возможность как сокращения времени проведения анализа непосредственно каждой пробы, так и одновременного микроанализа 40 исследуемых образцов в дубликate при использовании стандартных планшет.

Отличительные признаки заявляемого решения соответствуют критерию "новизна" и требованиям изобретательского уровня.

Проведенные исследования в отделе биохимии Института терапии АМН Украины и отделе молекулярных основ семиотики Института биохимии НАН Украины (г.Киев) пока-

зали, что использование данного способа позволяет определять тяжелые металлы (ртуть, кадмий, олово), а также повысить чувствительность анализа до 10^{-9} г/мл, уменьшить продолжительность реакции ингибирования до 10 мин и расширить функциональные возможности способа для его применения в научных и практических работах.

Предложенный способ осуществляют следующим образом:

1. Сенсibilизируют маркерный фермент, например пероксидазу, на полистироловые планшеты в концентрации 4 мкг/мл путем высушивания из раствора 0,13 М карбоната аммония при 37°C. Несвязавшийся фермент отмывают 2–3 раза водой с 0,05% Твин-20.

2. Проводят реакцию ингибирования. Для этого исследуемые пробы разводят в 2 и более раз (в зависимости от предполагаемого содержания тяжелых металлов) с помощью 1М трис-НСI буфера рН 8,6. Отдельно готовят калибровочный материал: исходный раствор соли тяжелого металла, например ртути или смеси известных солей, в концентрации 2 мг в 1 мл рабочего буфера и затем серию разведений от 0,5 до 0,001 мкг в 1 мл. Наносят калибровочный материал и исследуемые пробы на планшет, подготовленный по п.1, и затем инкубируют в термостате 10 мин при 37°C.

3. Удаляют реакционную жидкость путем стряхивания и отмывания, как описано в п.1. Просушивают планшет на фильтровальной бумаге.

4. Определяют остаточную ферментативную активность на полистироле путем добавления субстратной смеси, содержащей цитратный буфер, ортофенилендиамин и пергидроль. Инкубируют при комнатной температуре до 5 мин. Останавливают реакцию добавлением 50% серной кислоты.

5. Измеряют оптическую плотность на многоканальном микроспектрофотометре при 490 нм. По результатам измерений калибровочного материала строят калибровочный график, который используют для определения содержания тяжелых металлов в пробах.

Основные характеристики способа:

– Чувствительность – 10^{-9} г;
– Интервал линейности калибровочного графика – 10^{-7} – 10^{-9} г;
– Воспроизводимость – коэффициент вариации не превышает 10%.

Пример 1. Способ определения ртути.

1. Сенсibilизируют пероксидазу на полистироловые планшеты в concentra-

ции 4 мкг/мл путем высушивания из раствора 0,13 М карбоната аммония при 37°C. Несвязавшийся фермент отмывают 2–3 раза водой с 0,05% Твин-20.

2. Проводят реакцию ингибирования. Для этого исследуемые пробы разводят в 2 и более раз (в зависимости от предполагаемого содержания ртути) с помощью 1 М трис-НСІ буфера рН 8,6. Отдельно готовят калибровочный материал: исходный раствор соли ртути в концентрации 2 мг/мл рабочего буфера и затем серию разведений от 0,5 до 0,001 мкг и 1 мл. Наносят калибровочный материал в исследуемые пробы на планшет, подготовленный по п.1, и затем инкубируют в термостате 10 мин при 37°C.

3. Удаляют реакционную жидкость путем стряхивания и отмывания, как описано в п.1. Просушивают планшет на фильтровальной бумаге.

4. Определяют остаточную ферментативную активность на полистироле путем добавления по 200 мкл в лунку субстратной смеси, приготовленной перед использованием и содержащей 25 мл 0,1 М цитратного буфера рН 4,5–4,6, 4 мг ортофенилендиамина и 20 мкл пергидроля (на 1 планшет). Инкубируют при комнатной температуре до 5 мин. Останавливают реакцию добавлением 50% серной кислоты по 50 мкл в лунку.

5. Измеряют оптическую плотность на многоканальном микроспектрофотометре типа Flow (Великобритания) при 490 нм. По результатам измерений калибровочного материала строят в полулогарифмической системе координат калибровочный график, который используют для определения содержания ртути в пробах.

П р и м е р 2. Способ определения тяжелых металлов.

1. Сенсибилизируют пероксидазу на полистироловые планшеты в концентрации 4 мкг/мл путем высушивания из раствора 0,13

М карбоната аммония при 37°C. Несвязавшийся фермент отмывают 2–3 раза водой с 0,05% Твин-20.

2. Проводят реакцию ингибирования. Для этого исследуемые пробы разводят в 2 и более раз (в зависимости от предполагаемого содержания тяжелых металлов) с помощью 1 М трис-НСІ буфера рН 8,6. Отдельно готовят калибровочный материал: смесь солей ртути, олова, кадмия, содержащей по 2 мг каждой соли растворяют в 3 мл рабочего буфера и затем готовят серию разведений от 0,5 до 0,001 мкг/мл (можно делать дополнительные калибровочные кривые для отдельных тяжелых металлов или другие варианты). Наносят калибровочный материал и исследуемые пробы на планшет, подготовленный по п.1, и затем инкубируют в термостате 10 мин при 37°C.

3. Удаляют реакционную жидкость путем стряхивания и отмывания, как описано в п.1. Просушивают планшет на фильтровальной бумаге.

4. Определяют остаточную ферментативную активность на полистироле путем добавления по 200 мкл в лунку субстратной смеси, приготовленной перед использованием и содержащей 25 мл 0,1 М цитратного буфера рН 4,5–4,6, 4 мг ортофенилендиамина и 20 мкл пергидроля (на 1 планшет). Инкубируют при комнатной температуре до 5 мин. Останавливают реакцию добавлением 50% серной кислоты по 50 мкл в лунку.

5. Измеряют оптическую плотность на многоканальном микроспектрофотометре типа Flow (Великобритания) при 490 нм. По результатам измерений калибровочного материала строят в полулогарифмической системе координат калибровочный график, который используют для определения содержания тяжелых металлов (ртути, олова, кадмия) в пробах.

Упорядник

Техред М.Келемеш

Коректор О.Кравцова

Замовлення 4559

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101

