



УКРАЇНА

(19) UA (11) 27929 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 33/531МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЛЕКТИНІВ

1

2

(21) u200704874

(22) 03.05.2007

(24) 26.11.2007

(72) ПОСПЕЛОВ СЕРГІЙ ВІКТОРОВИЧ, UA

(73) ПОЛТАВСЬКА ДЕРЖАВНА АГРАРНА АКА-
ДЕМІЯ, UA

(57) Спосіб визначення біологічної активності лектинів, що включає реакцію гальмування гемаглютинації речовинами-інгібіторами з подальшою бальною оцінкою, який відрізняється тим, що як речовини-інгібітори використовують фенольні сполуки.

Корисна модель відноситься до області біохімії, молекулярної біології та біотехнології і може знайти застосування при вивченні фізіологічних і хімічних процесів в біологічних системах.

Відомий спосіб визначення біологічної активності лектинів шляхом додавання речовини - інгібітору, інкубацією системи та послідуною оцінкою в реакції гальмування гемаглютинації [див. Луцик М.Д. и др.. Лектины. Вища школа. Издательство при Львовском университете. - 1981. - 156с.]. Для цього використовують прості та складні вуглеводи (моно-, ді-, полісахариди, а також інші складні молекули). Для визначення біологічної активності до розчинів лектинів із титром 1:4 додають рівну кількість вуглеводів, починаючи з 0,3М концентрації, і проводять серію двократних розведень. Після інкубації з еритроцитами оцінюють реакцію аглютинації. При цьому чим менша концентрація вуглеводу повністю пригнічує аглютинацію, тим вища біологічна активність лектинів до вуглеводу.

Найбільш близьким до корисної моделі, що заявляється, є спосіб визначення біологічної активності лектинів в реакції гальмування гемаглютинації речовиною-інгібітором за бальною оцінкою. При цьому чим вище бал, тим вища специфічність лектинів [див. Спосіб оцінки физиологической активности лектина к сахарам. А.с. №1732276, МКИ G01N33/53]. Згідно цього способу, фіксований об'єм препарату лектину з постійним титром (1:4) поміщають в імунологічні планшети і змішують з рівними об'ємами речовини - інгібітору (в 0,4М концентрації) у серії двократних розведень. Систему інкубують одну годину при кімнатній температурі, після чого в кожну лунку додають рівний об'єм 2%-ної суспензії еритроцитів. Одночасно з цим аналогічно проводять реакцію аглютинації із лектинами без речовини - інгібітору. Після інкубації (одна - дві години) в лунках планшету оцінюють

активність аглютинації розчину лектинів без речовини - інгібітору (в балах) та у суміші лектинів із речовиною-інгібітором. Після цього обчислюють різницю сум балів між пробами, таким чином визначаючи біологічну активність лектинів до речовини - інгібітору. При цьому чим більша різниця, тим вища специфічність лектинів до конкретної речовини.

За допомогою відомого способу оцінюють лише біологічну активність лектинів до вуглеводів або їх компонентів. Це суттєво обмежує використання цього методу і не дає можливості досліднику одержати додаткові показники біологічної активності лектинів.

Задача, на рішення якої спрямована корисна модель, полягає у розширенні функціональних можливостей існуючого способу, за рахунок чого збільшується інформативність щодо біохімічних властивостей та фізіологічної активності лектинів.

Вона досягається за рахунок того, що біологічна активність лектинів визначається по відношенню до фенольних сполук.

Необхідно зазначити, що властивість лектинів реагувати з вуглеводними рецепторами клітин та мембран є найважливіша характеристика цих сполук і головний чинник, що відрізняє їх від інших білків [Ігнатов В.В. Углеводузнающие белки - лектины // Соросовский образовательный журнал. - 1997, №2. - С.14-20.]. Тому той факт, що лектини здатні специфічно реагувати з фенольними сполуками, значно розширює наше уявлення про природу лектинів.

Нами експериментально було доведено, що окрема фенольна сполука здатна по різному інгібувати гемаглютинуючу активність різних лектинів, тобто має місце нова властивість лектинів - специфічна взаємодія по відношенню до фенольних сполук.

U
(13)27929
(11)UA
(19)

Спосіб здійснюється наступним чином.

Фіксовані об'єми препарату лектину з постійним титром (1:4) поміщають в імунологічні планшети і змішують з рівними об'ємами фенольної сполуки, що досліджується, у серії послідовного двократного розведення. Систему інкубують одну годину при кімнатній температурі, після чого в кожну лунку додають тотожний об'єм 2%-ної суспензії тричі відмитих еритроцитів і залишають на 1-2 години при температурі +25°C.

Аналогічно проводять постановку реакції гемаглютинації з лектином, що досліджується, без додавання фенольної сполуки.

Оцінку гемаглютинуючої здатності лектинів, як при взаємодії з фенольними сполуками, так і без них, проводять візуально за п'ятибальною шкалою:

3 бали - різко виражена аглютинація. Еритроцити у вигляді тонкої плівки рівномірно розподіляються по всьому дну лунки;

2 бали - помірна аглютинація. Еритроцити розходяться по дну лунки на відстані, яка перевищує в діаметрі 2мм, утворюючи кільце із різко виявленою зернистістю по краях;

1 бал - слабка аглютинація. Еритроцити розходяться по донцю лунки на відстані менш 2-х мм, утворюючи кільце або диск;

0,5 бала - мінімальна аглютинація. В центрі скупчення еритроцитів, що осідають на дно лунки, утворюється невеличкий отвір;

0 балів - відсутність аглютинації. Еритроцити скупчуються у центрі лунки.

Перш за все визначають інтенсивність аглютинації розчину лектину без додавання фенольної

сполуки - інгібітору. При цьому додають значення в балах кожної лунки імунологічного планшета. У випадку, коли проба аналізується у восьми лунках, ця величина в залежності від активності препарату, може досягати 24 балів.

Далі обчислюють суму балів реакції гемаглютинації суміші лектин-фенольна сполука (дійсна активність). Вона встановлюється при додаванні до лектину фенольної сполуки у восьми послідовних розведеннях.

Після цього обчислюють різницю сум балів між пробами, що є показником специфічності лектину. Чим більше різниця, тим вища біологічна активність лектину до фенольної сполуки.

Приклад 1. Необхідно визначити біологічну активність лектинів картоплі, гороху, вики, сочевиці та квасолі по відношенню до фенольної сполуки пірокатехину.

Для цього використовували хімічно чисті сполуки вказаних речовин. Розчини лектинів з титром аглютинації 1:4 на протязі однієї години інкубували з розчином пірокатехину, після чого в систему додавали 2%-ну суспензію тричі відмитих еритроцитів людини і через дві години проводили реєстрацію даних. Паралельно оцінювали гемаглютинуючу активність чистих лектинів.

Підрахунок активності реакції гемаглютинації проводили за бальною оцінкою, описаною вище.

Результати аналізу свідчать (Таблиця 1), що серед лектинів, що оцінювались, високою біологічною активністю по відношенню до пірокатехину характеризується лектин картоплі (12,5 балів). Інші лектини проявляли не високу активність до пірокатехину - від 1,0 до 4,0 балів.

Таблиця 1

Оцінка біологічної активності фітолектинів по відношенню до пірокатехину

Фітолектини	Активність реакції гемаглютинації (в балах)		Біологічна активність (в балах)
	без речовини - інгібітору	при взаємодії з пірокатехином (дійсна активність)	
1. Картопля	23,0	10,5	12,5
2. Горох	20,0	18,5	1,5
3. Вика	24,0	21,0	3,0
4. Сочевиця	23,0	19,0	4,0
5. Квасоля (ФГА)	24,0	23,0	1,0

Приклад 2. Необхідно визначити біологічну активність лектинів картоплі, гороху, вики, сочевиці та квасолі по відношенню до фенольної сполуки пірогалолу.

Для цього використовували хімічно чисті сполуки вказаних речовин. Розчини лектинів з титром аглютинації 1:4 на протязі однієї години інкубували з розчином пірогалолу, після чого в систему додавали 2%-ну суспензію тричі відмитих еритроцитів

людини і через дві години проводили реєстрацію даних. Паралельно оцінювали гемаглютинуючу активність чистих лектинів.

Підрахунок активності реакції гемаглютинації проводили за бальною оцінкою, описаною вище.

Результати аналізу свідчать (Таблиця 2), що по відношенню до пірогалолу всі лектини, що оцінювались, мали не високу біологічну активність - від 0,0 до 6,0 балів.

Таблиця 2

Оцінка біологічної активності фітолектинів по відношенню до пірогалолу.

Фітолектини	Активність реакції гемаглютинації (в балах)		Біологічна активність (в балах)
	без речовини - інгібітору	при взаємодії з пірокатехіном (дійсна активність)	
6. Картопля	23,0	17,0	6,0
7. Горох	20,0	20,0	0,0
8. Вика	24,0	21,0	3,0
9. Сочевиця	23,0	21,0	2,0
10. Квасоля (ФГА)	24,0	23,0	1,0

Приклад 3. Необхідно визначити біологічну активність лектинів картоплі, гороху, вики, сочевиці та квасолі по відношенню до фенольної сполуки саліцилової кислоти.

Для цього використовували хімічно чисті сполуки вказаних речовин. Розчини лектинів з титром аглютинації 1:4 на протязі однієї години інкубували з розчином саліцилової кислоти, після чого в систему додавали 2%-ну суспензію тричі відмитих еритроцитів людини і через дві години проводили

реєстрацію даних. Паралельно оцінювали гемаглютинуючу активність чистих лектинів.

Підрахунок активності реакції гемаглютинації проводили за бальною оцінкою, описаною вище.

Результати аналізу свідчать (Таблиця 3), що по відношенню до саліцилової кислоти всі лектини, що оцінювались, мали досить високу біологічну активність - від 8,0 до 14,0 балів. Але найбільш високою специфічністю характеризувались лектини вики та сочевиці (14,0 балів).

Таблиця 3

Оцінка біологічної активності фітолектинів по відношенню до саліцилової кислоти

Фітолектини	Активність реакції гемаглютинації (в балах)		Біологічна активність (в балах)
	без речовини - інгібітору	при взаємодії з пірокатехіном (дійсна активність)	
11. Картопля	21,5	10,0	11,5
12. Горох	12,5	4,5	8,0
13. Вика	23,0	9,0	14,0
14. Сочевиця	20,5	6,5	14,0
15. Квасоля (ФГА)	21,5	11,0	10,5