СОЮЗ СОВЕТСКИХ СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1732276 A1

(51)5 G 01 N 33/53

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ ПРИ ГКНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

1

(21) 4698420/14
(22) 05.06.89
(46) 07.05.92. Бюл. № 17
(71) Полтавский сельскохозяйственный институт и Киевский государственный университет им. Т.Г.Шевченко
(72) Е.Л.Гольнская, С.В.Поспелов и В.И.Самородов
(53) 615.475 (088.8)
(56) Луцик М.Д. и др. Лектины. - Вища школа. Изд-во при Львовском университете, 1981, 156.

(57) СПОСОБ ОЦЕНКИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКТИНА К САХАРАМ

(57) Использование: изобретение относится к области биохимии и может быть

2

использовано при изучении физиологических и химических процессов в биологических системах, а также иммунодиагностике растений. Целью является повышение точности оценки. Сущность: поставленная цель достигается тем, что к лектину добавляют различные сахара-ингибиторы с последующей оценкой активности в реакции торможения гемагглютинации по бальной системе. При этом дополнительно устанавливают активность лектина в пробах без добавления сахаров-ингибиторов, далее подсчитывают разность сумм баллов между пробами. Чем больше величина разности, тем выше физиологическая активность лектина к сахару. 1 табл.

Изобретение относится к области биохимии и может быть использовано при изучении физиологических и химических процессов в биологических системах, а также иммунодиагностике растений.

Известен способ определения физиологической активности лектина путем добавления к нему различных сахаров-ингибиторов с последующей оценкой активности в реакции торможения гемагглютинации.

По известному способу реакцию торможения гемагглютинации лектина проводят следующим образом. Фиксированные объемы лектина (0,05 мл) с постоянным титром (1:4) помещают в лунки иммунологического планшета с полукруглым дном и смешивают с равными объемами углеводов в серии их последовательных разведений, начиная с 0,6 М концентрации каждого сахара. После 15-минутной инкубации при комнатной температуре к смеси добавляют 0,05 мл 2%-ной суспензии трижды отмытых эритроцитов и выдерживают 60-120 мин при t° 25°С. Оценку реакции гемагглютинации производят по наибольшему разведению сахара, полностью подавляющему агглютинацию эритроцитов с участием данного лектина, исходя из расчета, что в первой лунке конечное содержание углевода в смеси составляет 0,2М. При этом чем меньшая концентрация сахара полностью подавляет гемагглютинацию, тем выше физиологическая активность лектина по отношению к нему.

Однако определение физиологической активности лектина по известному спо-

SU (11) 1732276 A1

собу в единицах концентрации углевода варьирует в широких пределах и не может служить надежным критерием оценки. Кроме того, в ряде случаев добавление сахаров-ингибиторов не приводит к полному подавлению гемагглютинирующей способности лектинов даже при высоких концентрациях углевода, что также снижает разрешающую способность применяемой оценки.

Цель изобретения - повышение точности определения.

Поставленная цель достигается тем, что дополнительно определяют активность лектина в пробах без добавления сахаров-ингибиторов по балльной системе. От полученного значения вычитают сумму баллов реакции агглютинации с добавлением сахара-ингибитора. При этом чем больше величина разности, тем выше физиологическая активность лектина к сахару.

Способ осуществляется следующим образом.

Фиксированные объемы препарата лектина с постоянным титром (1:4) помещают в иммунологические планшеты с полукруглым дном и смешивают с равными объемами углеводов в серии их последовательности двухкратных разведений. Систему инкубируют 1 ч при комнатной температуре, после чего в каждую лунку вводят равный исходному объему лектина объем 2%-ной суспензии трижды отмытых эритроцитов и оставляют от 60-120 мин при t° +25°С.

Аналогично проводят постановку реакции гемагглютинации с исследуемым лектином без добавления сахара-ингибитора.

Оценку гемагглютинирующей способности лектинов, как взаимодействующих с сахаром, так и без них, ведут визуально по пятибалльной системе:

3 балла - резко выраженная агглютинация. Эритроциты в виде тонкой пленки более или менее равномерно распределяются по всему дну лунки;

2 балла - умеренная агглютинация. Эритроциты расходятся по дну лунки на расстояние, превышающее в диаметре 2 мм, образуя кольцо с резко выраженной зернистостью по краям;

1 балл - слабая агглютинация. Эритроциты расходятся по дну лунки на расстояние менее 2-х мм, образуя колечко или диск.

0,5 балла - минимальная агглютинация. В центре совокупности эритроцитов, осевших на дно лунки, возникает небольшой просвет.

0 баллов - отсутствие агглютинации. Эритроциты скапливаются в центре лунки.

Затем определяют интенсивность агглютинации исходного раствора лектина без добавления сахара ингибитора,, суммируя значения в баллах каждой лунки иммунологического планшета. В случае, когда проба анализируется в восьми лунках, эта величина в зависимости от активности препарата лектина может достигать 24 баллов.

Далее вычисляют сумму баллов реакции гемагглютинации смеси лектин-сахар (действительная активность). Она устанавливается при добавлении к лектину индивидуального сахара в восьми последовательных разведениях.

После этого вычисляют разность сумм баллов между пробами, определяя таким образом физиологическую активность лектина. При этом чем больше величина разности, тем выше она к сахару.

П р и м е р. Путем дробного этанольного фракционирования из неопыленных пестиков длинно- и коротко-столбчатой форм примулы выделены лектины (фракция, выпадающая в садок при 76%-ном насыщении этанолом по объему) неизвестной углеводной специфичности. При помощи реакций ингибирования гемагглютинирующей способности необходимо определить их физиологическую активность к шести сахарам: арабинозе, глюкозе, галактиту, галактозе, фруктозе.

Реакцию гемагглютинации проводили в иммунологических планшетах, оценивая по ранее указанной балльной системе. По известному способу оценка осуществлялась по минимальному количеству сахара (в мМ), при котором полностью подавляется реакция гемагглютинации.

Изучая физиологическую активность лектина, выделенного из длинностолбчатой формы примулы, по известному способу, нельзя сделать однозначного вывода об его активности к какому-либо одному сахару. Из шести сахаров одинаковое количество пяти подавляло гемагглютинирующую способность препа-

рата. При оценке предлагаемым способом удалось установить, что из шести углеводов наибольшая разность сумм баллов между пробами, а значит, и физиологическая активность, выявлена лишь к арабинозе. За ним в порядке убывания следуют галактоза, глюкоза, галактит, ксилоза и фруктоза.

У короткостолбчатой формы примулы при оценке по известному способу в наименьшей концентрации (12,5 мМ) подавляли активность лектина лишь два сахара - ксилоза и галактоза. Не удалось установить физиологической активности лектина к глюкозе и галактиту.

Проведение оценки по предлагаемому способу показало, что данный лектин проявляет наибольшую физиологическую активность к ксилозе (19,5 балла). У галактозы этот показатель 17 единиц. Удалось также установить очень низкую активность препарата к галактиту, что нельзя было сделать при оценке по прототипу.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет выявить разницу в физиологической активности в тех случаях, когда по прототипу такового не наблюдается, т.е. предлагаемый способ является более точным.

Результаты способа представлены в таблице.

Формула изобретения

Способ оценки физиологической активности лектина к сахарам путем добавления к исследуемой пробе лектина различных сахаров - ингибиторов с последующей оценкой активности в реакции торможения гемагглютинации по сумме баллов, отличающийся тем, что, с целью повышения точности способа, дополнительно устанавливают активность лектина в пробах без сахаров - ингибиторов, определяют физиологическую активность по разности между суммами баллов и по уровню разности оценивают активность лектина.

Углеводы	По прототипу, (в мМ сахара)	По предлагаемому способу (в условных баллах)		
		Активность без сахара-ингибитора	Активность действительная с сахаром-ингибитором	Физиологическая активность
Длинностолбчатая форма				
Арабиноза	25	16	4,5	11,5
Глюкоза	25	16	8	8
Галактит	25	16	8	8
Ксилоза	25	16	8	8
Галактоза	25	16	7	9
Фруктоза	100	16	8,5	7,5
Короткостолбчатая форма				
Арабиноза	200	24	20	4
Глюкоза	-	24	24	0
Галактит	-	24	23	1
Ксилоза	12,5	24	4,5	19,5
Галактоза	12,5	24	7	17
Фруктоза	50	24	9,5	14,5