



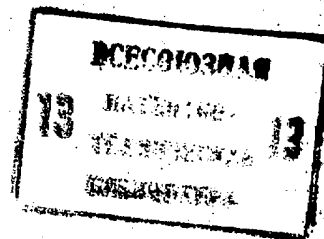
СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1160311** **A**

4(51) / G 01 N 33/48

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ И АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ



- (21) 3667345/28-13
(22) 21.10.83
(46) 07.06.85. Бюл. № 21
(72) Г. А. Кратасюк, В. Н. Петушков,
С. А. Рыков и И. И. Гительзон
(71) Институт биофизики Сибирского отде-
ления АН СССР и Красноярский государствен-
ный медицинский институт
(53) 543.866(088.8)
(56) Веремеенко К. Н. Кининовая система.—
Киев, "Наукова думка", 1977, с. 161-162.

(54) (57) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВ-
НОСТИ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕАЗ путем оп-
ределения разности активности протеазы при
инкубации в присутствии и отсутствии ингиби-
тора, отличающийся тем, что,
с целью сокращения времени определения, ин-
кубацию проводят в течение 1-2 мин при
27-33°С, а об активности ингибитора про-
теазы судят по разности скорости падения
свечения при добавлении инкубационной сме-
си в раствор, содержащий люциферазу,
НАДН:ФМН-оксидоредуктазу и субстраты
этих ферментов.

(19) **SU** (11) **1160311** **A**

Изобретение относится к биохимии и может быть использовано в технической микробиологии и медицинской диагностике.

Целью изобретения является сокращение времени определения.

П р и м е р. Использовали в качестве ингибитора протеазы контрикал (производство ГДР) и гордок (производство Венгрии). В качестве протеазы использовали трипсин ("Serva", ФРГ) с удельной активностью 40 ед на 1 мг препарата и в качестве люциферазы — частично очищенный препарат из *Photobacterium leiognathi*.

К 100 мкл раствора трипсина (100 мгк/мл) добавляют 20 мкл раствора контрикала (100 АЕ/мл) или 20 мкл раствора гордокса (100 КИЕ/мл) и инкубируют в течение 2 мин при 30°C, а затем берут аликвоту объемом 120 мкл и добавляют в реакционную смесь, содержащую 20 мкл ферментного препарата (0,3 мг/мл люциферазы и НАДН:ФМН-оксидоредуктазы), 50 мкл 0,005%-ного раствора миристинового альдегида, 50 мкл $6,6 \cdot 10^{-5}$ М ФМН, 360 мкл 0,1 фосфатного буфера pH 7,0 и 300 мкл $2,68 \cdot 10^{-4}$ М НАДН.

Благодаря избытку протеазы в инкубационной смеси наблюдается падение свечения, обусловленное инактивацией люциферазы под действием остаточной активности протеазы. Сигнал из кюветы прибора для измерения свечения подают на ФЭУ, а с последнего — на самопишущий потенциометр с известной скоростью протяжки масштабной ленты.

Остаточную протеазную активность определяют по константе инактивации люциферазы, которая вычисляется по формуле

$$K_{ин} = \frac{\ln \int_1 - \ln \int_2}{t_2 - t_1},$$

где $\int_1$ и $\int_2$ — билюминесценции в моменты времени t_1 и t_2 соответственно.

Измерение падения билюминесценции проводят в течение 1 мин. Активность ингибитора протеазы определяется разностью между константами инактивации люциферазы в присутствии и отсутствии ингибитора протеазы. Константа инактивации люциферазы обратно пропорциональна количеству добавленного ингибитора протеазы (таблица).

Измерение билюминесценции проводят в термостатируемой кювете при 30°C в течение 1 мин. В контроле к 100 мкл раствора трипсина добавляют 20 мкл 0,1 М фосфатного буфера. Константа инактивации в контроле равна $2,4 \text{ мин}^{-1}$, в опыте с контрикалом $1,60 \text{ мин}^{-1}$ и в опыте с гордоксом $1,66 \text{ мин}^{-1}$.

Расчет: в инкубационной смеси находилось 10 мкг трипсина. На определение взято 20 мкл (0,02 мл) раствора гордокса 100 КИЕ/мл (1:50). Разность $K_{ин}$ в контроле и опыте равна 0,74 ($2,4 - 1,66$), что соответствует инактивации около 3 мкг трипсина. Следовательно, 1 мл гордокса связывает

$$\frac{3,0 \cdot 50}{0,02} = 7500 \text{ (мкг) трипсина.}$$

Таким образом, в предлагаемом способе активность ингибитора протеазы выражается в мг протеазы, связываемых (инактивируемых) 1 мл исследуемого препарата: антипротеазы.

Предлагаемый способ сокращает время определения до 3 мин, т. е. более, чем в 20 раз в сравнении с известным способом.

Ингибитор протеазы	Концентрация ингибитора протеазы					
Раствор гордокса (100 КИЕ/мл), мкл на пробу	0	10	20	40	50	65
$K_{ин}$ люциферазы, мин^{-1}	2,4	1,96	1,66	0,95	0,52	0
Раствор контрикала (100 АЕ/мл) мкл на пробу	0	10	20	40	50	65
$K_{ин}$ люциферазы, мин^{-1}	2,4	1,92	1,60	0,82	0,40	0

Редактор В. Иванова

Составитель Н. Гуляева

Техред Л. Кошобняк

Корректор Е. Сирохман

Заказ 3766/41

Тираж 897

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4