

(19)



(10) **LT 3876 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patent numeris: **3876**

(51) Int. Cl.⁵: **C12Q 1/61**

(21) Paraiškos numeris: **IP1743**

G01N 33/92

G01N 27/327

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 30**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 07 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1996 04 25**

(72) Išradėjas:

Valdas-Stanislovas Laurinavičius, LT

Regina Cicėnienė, LT

Bogumila Kurtinaitienė, LT

Rolandas Meškys, LT

Liucija Marcinkevičienė, LT

Irina Bachmatova, LT

(73) Patent savininkas:

Biochemijos institutas, Mokslininkų g. 12, 2600 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

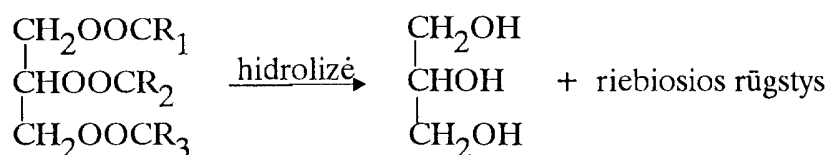
Trigliceridų nustatymo būdas

(57) Referatas:

Trigliceridų nustatymo būdas remiasi trigliceridų (neutalių riebalų) koncentracijos nustatymu, matuojant elektrocheminius parametrus ir gali būti naudojamas medicinoje. Metodus paremtas trigliceridų hidrolizės, katalizuojamos lipazės, reakcija, kurios produktas glicerolis, veikiamas imobilizuotiems į lavsaninę membraną fermentams glicerokinazei ir glicerofosfatoksidazei buferiniame tirpale, turinčiame magnio chlorido ir adenzintrifosfato, fosforilnamas ir vėliau oksiduojamas, išsiskiriant vandenilio peroksidui.

Išradimas priskiriamas medžiagų analizei fermentų pagalba, kurios metu nustatomi elektrocheminiai parametrai. Konkrečiai išradimas susietas su trigliceridų - neutralių riebalų koncentracijos analizės būdo patobulinimui. Šis išradimas gali būti naudojamas medicinoje diagnostikos tikslams (pvz., esant nefrotiniam sindromui arba kitiems susirgimams, kai stebimas trigliceridų kiekio padidėjimas) / Справочник. Лабораторные методы исследования в клинике. п.р. В.В. Меньшикова. 1987, с. 246 - 247 / .

Trigliceridai - tai grupė giminingų glicerolių esterių, kurie sudaryti iš glicerolio ir trijų riebiųjų rūgščių liekanų. Tiksliai riebiųjų rūgščių liekanų sudėtis gamtiniuose riebaluose gali svyruoti tam tikrose ribose. Todėl, esantys trigliceridų analizės būdai pagrįsti glicerolio nustatymu, t. y. gautas trigliceridų kiekis išreiškiamas ne cheminės medžiagos svorio vienetais, bet trigliceridų molekulių skaičius randamas pagal šarminės ar fermentinės hidrolizės būdu atskelto glicerolio kiekį.

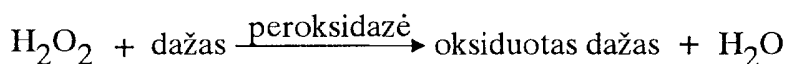
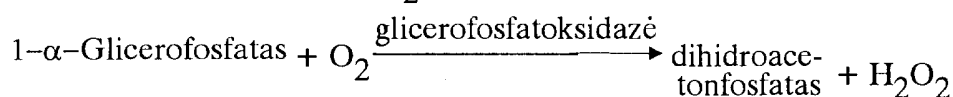
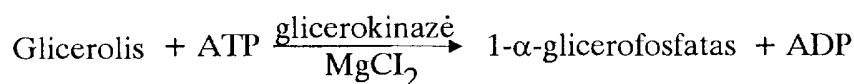
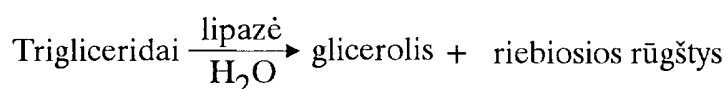


Šie būdai skiriasi vienas nuo kito hidrolizės ir glicerolio nustatymo metodikomis.

Žinomas trigliceridų nustatymo fermentinis būdas, kuris remiasi glicerolio fosforiliniu fosfoenolpirovynuogių rūgštimi, dalyvaujant ADP (adenozindifosfatui) ir fermentams glicerokinazei bei piruvatkinazei. Reakcijos metu išsiskiria pirovynuogių rūgštis, kurios kiekis nustatomas spektrofotometriškai pagal oksiduoto NADH (nikotinamidadenindinukleotido) kiekį, dalyvaujant laktatdehidrogenazei / Спр. Лабораторные методы исследования в клинике, п. р. В.В. Меньшикова. 1987. С. 246 - 247 / .

Šio metodo trūkumas yra trijų fermentų ir trijų kofaktorių panaudojimas juos suvartojant. proceso metu.

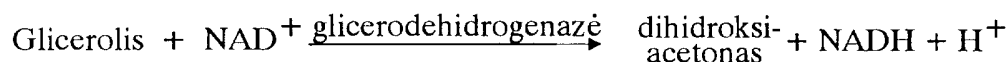
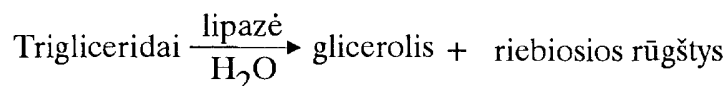
Žinomas fermentinis metodas, kuriame trigliceridams hidrolizuoti naudojamas labai specifinis fermentas - lipazė, o atskelto glicerolio kiekis nustatomas spektrofotometriškai pagal oksiduotų dažų kiekį, susidariusį kitos fermentinės reakcijos metu / Clin. Chem. 1982, v. 28, Nr. 10, p. 2077 - 2080 /.



Į matavimo gardelę įnešami fermentai, substratai ir analizuojamas pavyzdys, todėl kiekvienam pamatavimui sunaudojamas tam tikras fermentų kiekis.

Metodo trūkumas tas, kad analizę būtina atlikti skaidrioje terpėje, o taip pat sunaudojamas didelis brangiai kainuojančių fermentų kiekis.

Technologiniu požiūriu artimiausias yra fermentinis būdas, kuriame fermentu lipaze atskeltas glicerolis nustatomas pagal susidariusio NADH kiekį, naudojant platinos anodą, poliarografiškai / Anal. Letters, 1987, v. 20, Nr. 5, p. 783 - 790 /.

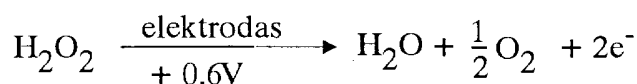
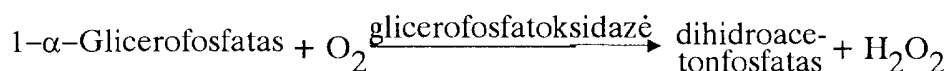
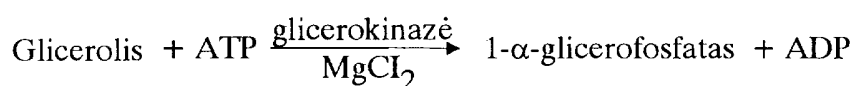
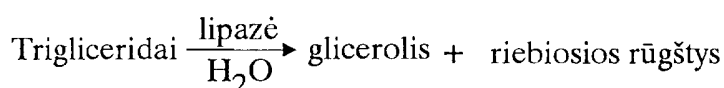


Į matavimo gardelę įnešama lipazė ir buferiniame tirpale ištirpintas analizuojamasis pavyzdys, o glicerodehidrogenazė imobilizuojama į pusiau pralaidžią halogeninę membraną, įdedamas NAD^+ (nikotinamidadenindinukleotidas) ir pagal anodinės srovės padidėjimą nustatoma redukuoto NADH koncentracija, kuri proporcinga glicerolio ir, tuo pačiu, trigliceridų kiekiui.

Šis metodas yra pakankamai sudėtingas ir nepasižymi dideliu tikslumu nustatant trigliceridus biologiniuose skysčiuose, taip pat analizės metu pastoviai įnešamas NAD^+ , labai brangus daugelio fermentų kofermentas, o trigliceridai nustatomi iš redukuoto kofermento NAD-H kiekio.

Išradimo tikslas - supaprastinti procesą ir padidinti jo jautrumą.

Būdo esmė atskleidžiama šia schema. Trigliceridus hidrolizuoja fermentas lipazė iki glicerolio, kuris paveikus imobilizuotais į pusiau pralaidžią membraną glicerokinazės ir glicerofosfatoksidazės fermentais, dalyvaujant ATP (adenozintrifosfatu) buferiniame tirpale, fosforilinamas ir toliau oksiduojamas. Dėl to susidaro H_2O_2 , kurio koncentracija proporcinga trigliceridų kiekiui analizuojamame pavyzdyje, ir gali būti nustatyta iš anodinės srovės padidėjimo oksiduojantis H_2O_2 , esant anodo potencialui + 0,6 V:



Analizė atliekama naudojant elektrocheminį vandenilio peroksido daviklį, sudarytą iš platininio anodo, padengto fermentine mikroporine lavsano membrana su imobilizuotais glicerokinazės ir glicerofosfatoksidazės fermentais, ir iš palyginamojo Ag/AgCl elektrodo. Į matavimo gardelę įnešama lipazė ir tiriamasis pavyzdys, ištirpintas buferiniame tirpale, kurio sudėtyje yra ATP ir MgCl_2 . Toliau vykdomi anodinės srovės matavimai iš kurių išskaičiuojama trigliceridų koncentracija.

Būdas iliustruojamas pavyzdžiais.

I Pavyzdys. Trigliceridų nustatymas alyvų aliejuje.

Fermentinė membrana gaminama šiuo būdu: 0,5 ml 0,01 M fosfatinio buferio (pH 7,2) ištirpinama 2,5 vnt. glicerokinazės, 3 vnt. glicerofosfatoksidazės ir 1,5 mg jaučio kraujo serumo albumino. Į gautą tirpalą dedama 10 ml 5% glutaro aldehydo ir tirpalas pilamas ant 4 cm² mikroporinės lavsaninės membranos, kuri uždengiama acetilinta celiuliozės membrana.

Poliarografinis daviklis su fermentine membrana, kurioje imobilizuoti fermentai, įstatomas į 1 ml tūrio gardelę su 3 mM ATP ir 3 mM MgCl_2 buferiniame tirpale ir nustatoma foninė elektrodo srovė. Į gardelę įnešama 0,1 ml alyvų aliejaus suspensijos fosfatiname buferiniame tirpale (0,01 M, pH 7,2), ir 5 vnt. lipazės. Po 30 min. inkubacijos nustatoma stacionari elektrodo srovė. Tyrimų rezultatai parodyti 1 lentelėje ir, atitinkamai, 1 kalibraciniame grafike. Trigliceridų koncentracija alyvų aliejuje išskaičiuojama atsižvelgiant į enciklopedijos /Химический энциклопедический словарь. 1983, с. 407 / duomenis, kad 80 % alyvų aliejaus sudaro trigliceridai (daugiausia trioleatgliceridai, $M=885$).

1lentelė

Alyvų aliejaus koncentracija kiuvetėje, g/l	0	0.18	0.34	0.7	1.10	1.38	1.66	2.8
Trigliceridų koncentracija, mM	0	0.16	0.31	0.63	1.0	1.25	1.5	2.5
Stacionari srovė, nA	0	0.44	1.54	4.4	7.26	9.9	11.22	12.54

Kaip matyti iš 1 lentelės (1 kalibracinis grafikas), tiesinė elektrodo srovės priklausomybė tiesiog proporcinga trigliceridų koncentracijai iki 1,5 mM

Membraną su imobilizuotais fermentais galima naudoti ilgiau kaip dvi savaites, o saugant ją šaldytuve - iki 6 mėnesių.

Tiesinė elektrodo srovės priklausomybė taip pat proporcinga kitų medžiagų koncentracijai, t. y. glicerolio ir ATP, susidarančioms reakcijų metu. Tai patvirtina 2 ir 3 pavyzdžiai.

II Pavyzdys. Glicerolio nustatymas buferiniame tirpale.

Fermentinis elektrodas ir gardelė ruošiami pagal I pavyzdį. Į gardelę pilamas buferis su ištirpintais jame 3 mM ATP bei 3 mM $MgCl_2$ ir nustatoma foninė elektrodo srovė. Į kiuvetę įnešamas buferinis glicerolio tirpalas ir nustatoma stacionari elektrodo srovė. Rezultatai parodyti 2 lentelėje ir, atitinkamai, II kalibraciniame grafike.

2 lentelė

Glicerino koncentracija kiuvetėje, mM	0	0.05	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5	0.55	0.7
Elektrodo srovė, nA	0	2.64	6.6	10.56	13.42	16.06	16.5	18.26	18.92	19.58	20.24	21.12

Kaip matyti iš 2 lentelės, tiesinė elektrodo srovės priklausomybė proporcinga glicerolio koncentracijai iki 0,3 mM.

III Pavyzdys. ATP nustatymas buferiniame tirpale.

Fermentinis elektrodas ir gardelė ruošiami pagal I pavyzdį. Į gardelę pilamas buferis, kuriame yra 3 mM MgCl_2 bei 2 mM glicerolio ir nustatoma foninė elektrodo srovė. Tada į gardelę įnešamas ATP tirpalas ir nustatoma stacionari elektrodo srovė. Rezultatai parodyti 3 lentelėje ir, atitinkamai, III kalibraciniame grafike.

3 lentelė.

ATP koncentracija, mM	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4
Elektrodo srovė, nA	0	5.5	8.58	10.78	12.98	13.42	14.52	14.96	13.86

Kaip matyti iš duomenų, tiesinė stacionarinės elektrodo srovės priklausomybė nuo ATP koncentracijos, tiesiog proporcinga ATP koncentracijai iki 1,5 mM.

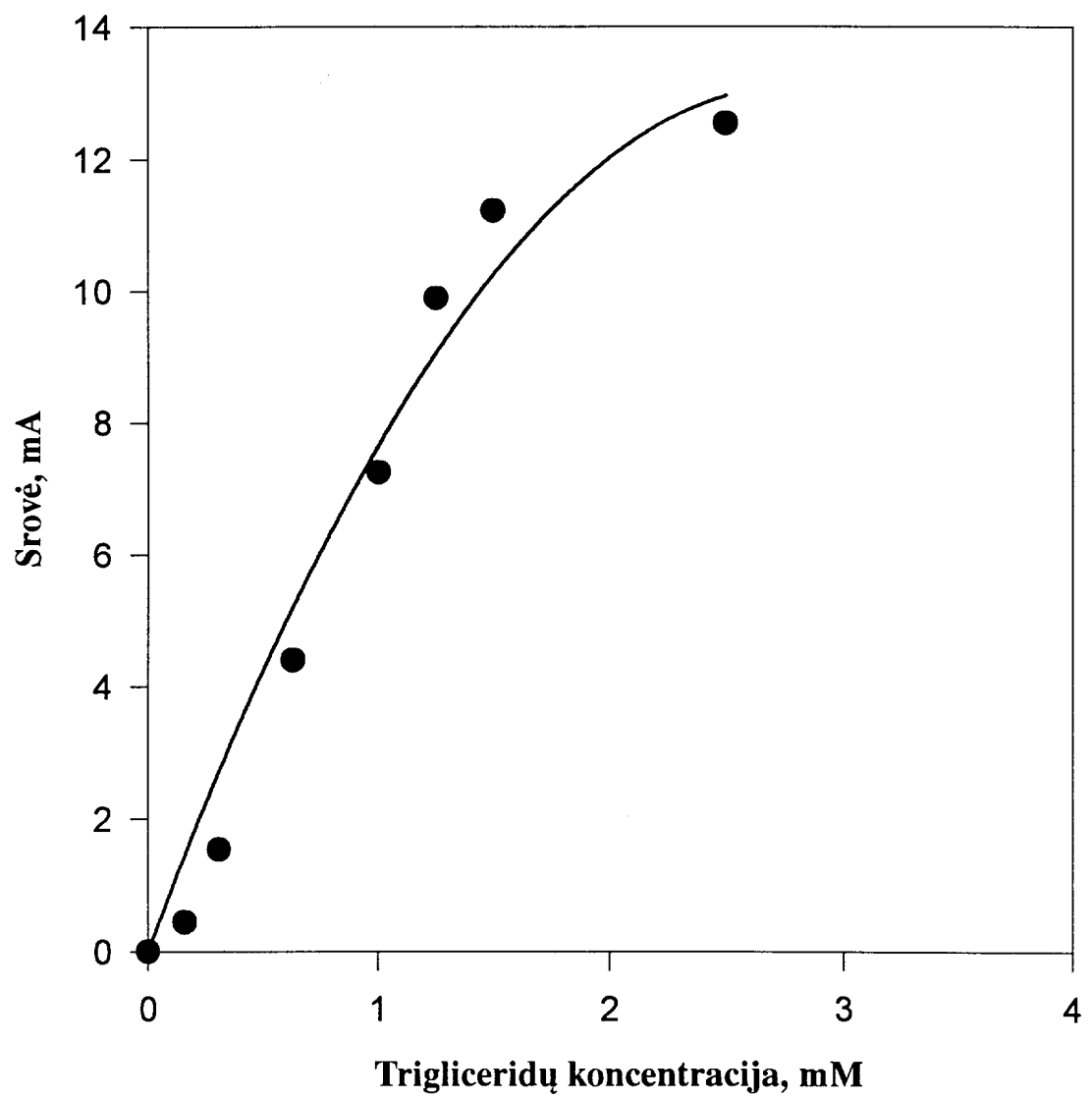
Šio elektrocheminio trigliceridų nustatymo būdo privalumas tas, kad nereikia nuolat į tirpalus įnešinėti brangiai kainuojančio NAD^+ ir nustatinėti trigliceridų pagal

NADH oksidacijos - redukcijos reakciją. Visos NAD - priklausomos dehidrogenazinės sistemos, esančios tiriamose biologinėse terpėse, analizės eigai nemaišys. Metodas yra žymiai tikslesnis ir greitesnis.

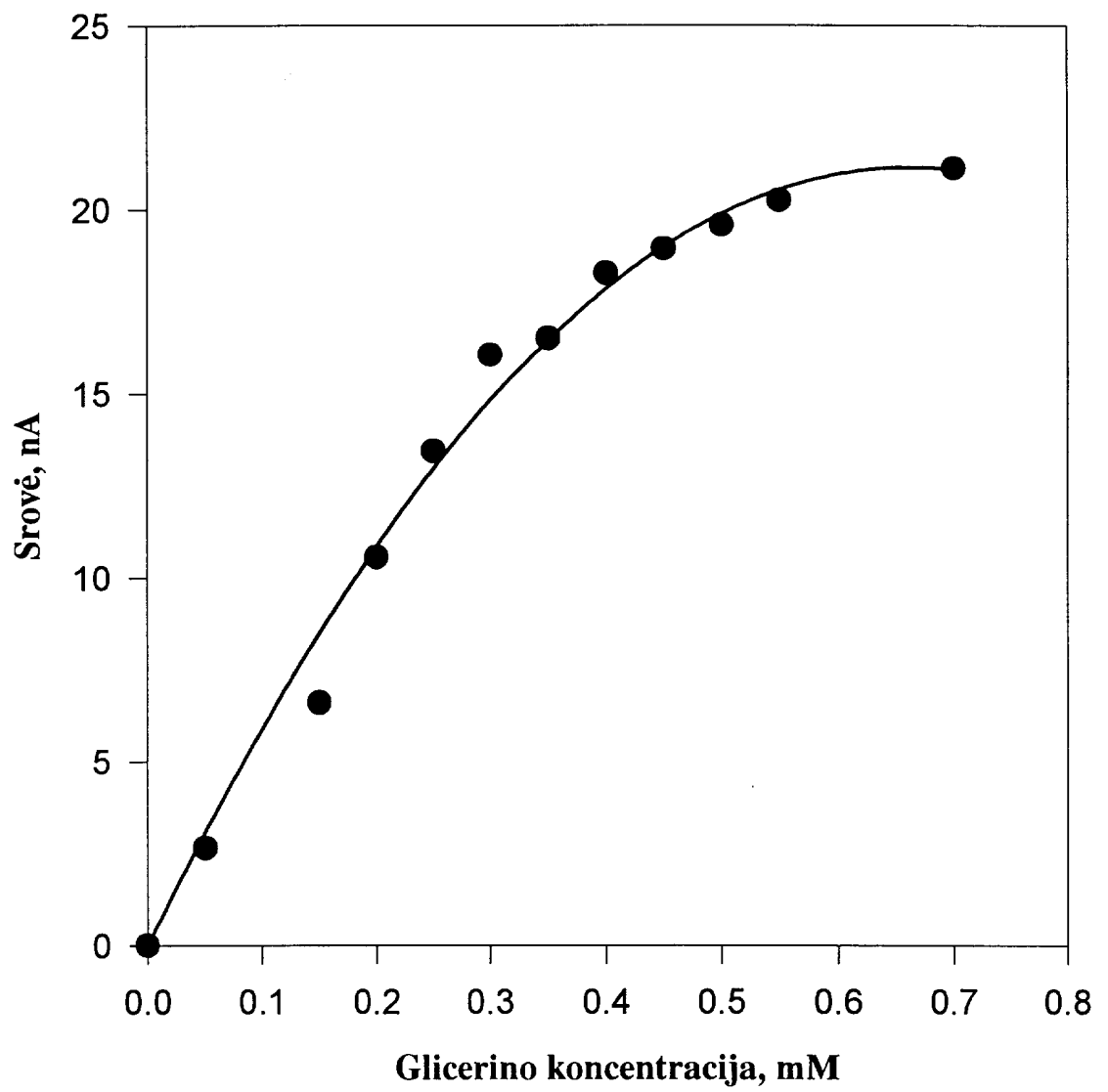
IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

Trigliceridų nustatymo būdas, pagrįstas tuo, kad analizuojamąjį pavyzdį su fermentu lipaze įneša į elektrocheminę gardelę, užpildytą buferiniu tirpalu ir turinčią daviklį, kuris sudarytas iš platininio anodo su pusiau pralaidžia fermentine membrana, po to matuoja anodinę srovę, pagal kurios padidėjimą nustato trigliceridų koncentraciją, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad į buferinį tirpalą papildomai įneša adenzintrifosfatą (ATP) ir $MgCl_2$, o platininį anodą padengia lavsanine membrana su imobilizuotais glicerokinazės ir glicerofosfatoksidazės fermentais.

Pirmas kalibracinis grafikas



Antras kalibracinis grafikas



Trečias kalibracinis grafikas

