

ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВЫХ КОНЬЮГАТОВ НА ОСНОВЕ ИНВЕРТАЗЫ ДЛЯ ЗАДАЧ ИММУНОХИМИИ

А. В. Азарова, Е. И. Михневич, Е. В. Дорожко

Научный руководитель – к.х.н., доцент отделения химической инженерии ИШПР Е. В. Дорожко

Национальный исследовательский Томский политехнический университет

634050, г. Томск, пр. Ленина, 30, ava78@tpu.ru

В настоящее время возрос исследовательский интерес к альтернативным меткам конъюгатов вторичных антител для задач иммунохимического метода анализа. Основная идея и новизна работы заключается в осуществлении замены традиционно используемой ферментной метки (пероксидазы хрена) в конъюгатах для иммуноферментного метода анализа на более дешёвый и доступный фермент-инвертазу. Инвертаза – это фермент, катализирующий гидролиз (расщепление) сахарозы (столового сахара) на фруктозу и глюкозу. Образование продукта реакции – глюкозы открывает возможности измерения антител или антигенов персональным глюкометром, что расширяет возможности домашней персонализированной медицины с снижением нагрузки на стационары и клинические лаборатории в период пандемии. Первоначальной задачей работы было определить активность инвертазы до и после сшивания с антителами через измерения содержания глюкозы персональным глюкометром. Перйодатный метод использовался для ковалентной «пришивки» фермента к антивидовым моноклональным антителам собаки (модельные антитела).

Методика исследования каталитической активности заключалась в построении графика Лайнуивера–Берка.

В растворы сахарозы, концентрациями 10, 20, 40 ммоль/л, добавляли инвертазу (1 мг) при

постоянном перемешивании при 45 °С в течение 3, 5 и 10 минут. Фермент инвертаза катализирует гидролиз сахарозы в кислой среде, следовательно, необходимо перевести полученные растворы в трис-буфер, так как глюкометр измеряет содержание глюкозы в среде с рН = 7–9. На рисунке 1 представлен график Лайнуивера–Берка, по которому определяли каталитическую активность фермента: константа Михаэлиса 0,083 моль/л.

Методика синтеза конъюгатов заключалась в следующих этапах:

К инвертазе (1 мг) добавили периодат натрия (0,1 М), смесь Раствор поместили в термостат в пробирке эппендорф, обернутой фольгой, на 20 минут при 25 °С. Далее к смеси добавили раствор иммуноглобулина (2 мг/мл) и оставили в термостате на 1 час при 37 °С. Далее к смеси добавили боргидрид натрия (0,1 М) и оставили в термостате на 20 минут.

Полученный конъюгат добавляли в растворы сахарозы и определяли каталитическую активность фермента с помощью персонального глюкометра по аналогичной методике, описанной выше. Значение каталитической активности конъюгата на основе инвертазы не изменилось после конъюгирования с антителами.

Глюкометр позволяет определять концентрацию глюкозы на разных стадиях реакции, при увеличении времени протекания реакции, концентрация увеличивается.

График Лайнуивера-Берка

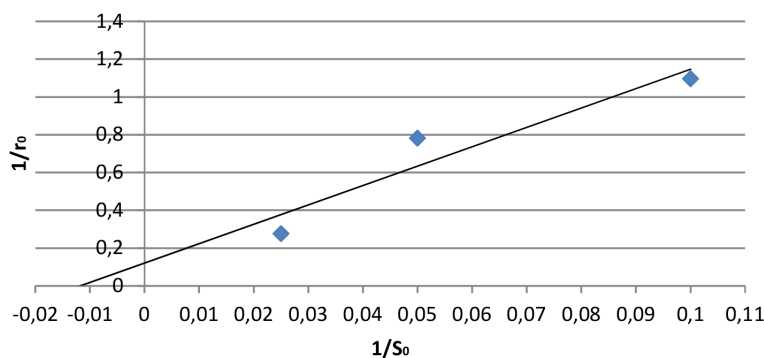


Рис. 1. График зависимости обратных величин скорости реакции от начальной концентрации субстрата

Список литературы

1. Lisi F., Peterson J. R., Gooding J. J. *The application of personal glucose meters as universal point-of-care diagnostic tools. // Biosensors and Bioelectronics, 2020. – Vol. 148. – 111835.*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕЛМИСАРТАНА IN VITRO

М. М. Алексеева

Научный руководитель – д.х.н., профессор Е. И. Короткова

Национальный исследовательский Томский политехнический университет
634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина 30, tma20@tpu.ru

Телмисартан является производным бифенил-2-карбоновой кислоты, содержит две бензимидазольные группы. Применяется для начального этапа лечения высокого кровяного давления и легкой / умеренной гипертензии, хорошо переносится, с меньшей частотой кашля, чем ингибиторы АПФ [1, 2].

Целью исследования является определение Телмисартана в биологических жидкостях методом флуоресцентного анализа. Разработка методики позволит контролировать концентрацию вещества и регулировать дозировку у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Ранее были исследованы флуоресцентные свойства субстанции Телмисартан и лекарственного препарата «Телмиста», эмпирическим путем определены условия регистрации аналитического сигнала: растворитель 0,01 М NaOH, длина волны возбуждения 290 нм, длина волны люминесценции 365 нм, параметры строба – задержка сигнала 0,70 мкс, длительность сигнала

4,70 мкс. На основе полученных спектров построена градуировочная зависимость интенсивности сигнала от концентрации вещества, а также рассчитан относительный квантовый выход.

Для определения Телмисартана *in vitro*, была использована плазма крови человека, так как известно, что данное вещество связывается с белками плазмы крови, в основном с альбумином и альфа-1 гликопротеином на 99,5 % [3].

С помощью двумерного сканирования определена максимальная интенсивность сигнала образца в плазме при длине волны 490 нм. Для количественного определения использовали метод добавок с построением градуировочной зависимости интенсивности сигнала от содержания Телмисартана в модельном растворе. Уравнение зависимости аналитического сигнала от концентрации Телмисартана имеет вид $y = 79,996x$, а коэффициент корреляции равен 0,9745 (Рис. 1).

Дальнейшая валидация метода и апробация клинических образцов позволит сделать вывод о

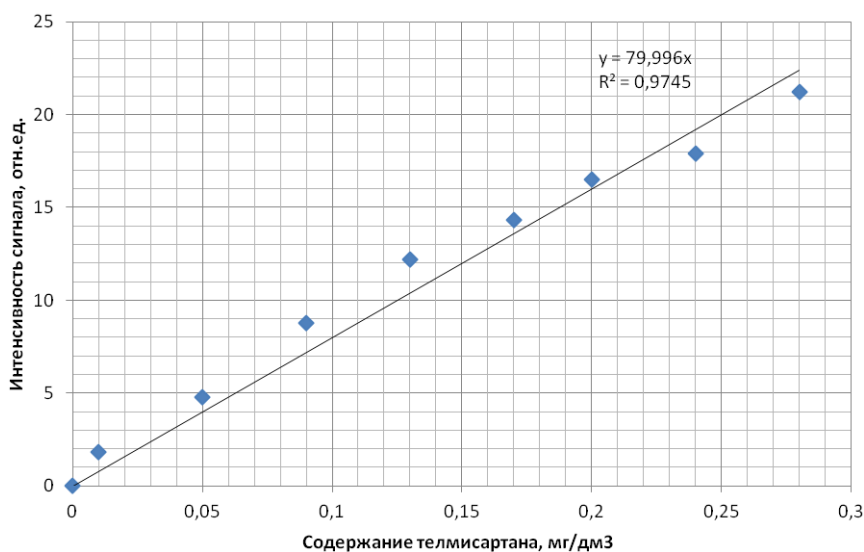


Рис. 1. Градуировочный график зависимости интенсивности сигнала от содержания Телмисартана в растворе