

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНГИБИТОРА α -1-ПРОТЕИНАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

В настоящей статье приведена методика количественного определения ингибитора α -1-протеиназы человека, известного также как α -1-антитрипсин или α -1-антипротеиназа.

Методика основана на сравнении испытуемого образца со стандартным образцом ингибитора α -1-протеиназы человека, калиброванного в миллиграммах активного (функционального) ингибитора α -1-протеиназы, по способности инактивировать сериновую протеазу – эластазу (свиную панкреатическую эластазу или человеческую эластазу нейтрофилов). Различные количества испытуемого образца, смешивают с заданным количеством эластазы, остаточную активность эластазы измеряют с использованием подходящего хромогенного субстрата.

РЕАКТИВЫ

Трис-альбуминовый буферный раствор. 24,23 г *трис(гидроксиметил)аминометана P* растворяют в *воде P*, доводят *хлороводородной кислотой P1* до значения pH ($8,0 \pm 0,3$) и доводят *водой P* до объема 1000 мл. К 100 мл полученного раствора прибавляют 0,5 мл 20 % раствора *альбумина человека P* или *альбумина бычьего P*.

Буферный раствор, содержащий человеческий или бычий альбумин, должен быть приготовлен в день его использования; в противном случае, раствор стерилизуют фильтрацией (0,2 мкм) и хранят при температуре от 2 °C до 8 °C в течение двух недель.

МЕТОДИКА

Готовят в двух повторностях четыре или пять разведений испытуемого образца и стандартного образца в подходящем диапазоне концентраций ингибитора α -1-протеиназы человека, используя трис-альбуминовый буферный раствор.

По 50 мкл разведений стандартного образца помещают в лунки микропланшета и в каждую лунку прибавляют по 150 мкл раствора свиной панкреатической эластазы, разведенного до необходимой концентрации трис-альбуминовым буферным раствором. Инкубируют в течение определенного промежутка времени (3–10 мин) при температуре от 15 °C до 25 °C. Поскольку активность растворов различных свиных панкреатических эластаз может варьировать, для получения подходящих изменений оптической плотности при длине волны 405 нм в данных конкретных условиях проведения испытания, концентрация эластазы может быть уточнена путем оценки активности в контрольных лунках,

содержащих эластазу без ингибитора α -1-протеиназы человека.

В каждую лунку прибавляют по 100 мкл рабочего раствора хромогенного субстрата *N*-сукцинил-три-L-аланил-4-*n*-нитроанилида (Suc-Ala-Ala-Ala-pNA), растворенного в *диметилсульфоксиде* *P* (концентрация 4,5 мг/мл), затем разведенного трис-альбуминовым буферным раствором до рабочей концентрации 0,45 мг/мл. Измерение оптической плотности (2.1.2.24) начинают сразу же и проводят в течение 5 мин и более при длине волны 405 нм, используя спектрофотометр микропланшетный. Рассчитывают скорость изменения оптической плотности ($\Delta A/\text{мин}$).

В качестве альтернативы можно использовать метод определения в конечной точке, останавливая реакцию уксусной кислотой и измеряя оптическую плотность при длине волны 405 нм. Если испытание выполняют в пробирках и для измерения оптической плотности используют спектрофотометр, пропорционально изменяют объемы растворов реактивов.

Скорость изменения оптической плотности ($\Delta A/\text{мин}$) обратно пропорциональна активности человеческого ингибитора α -1-протеиназы.

Проверяют достоверность результатов количественного определения и рассчитывают активность испытуемого образца общепринятыми статистическими методами (2.3.12.0).