



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК  
C12Q 1/42 (2006.01)  
C12Q 1/48 (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2008152857/13, 30.12.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
30.12.2008

(45) Опубликовано: 10.08.2010 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: МЕНЗОРОВА Н.И. др. Фосфатаза и фосфодиэстераза из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschatica*. Прикладная биохимия и микробиология, 2008, т.44, №1, с.106-110. ЖУРАВЕЛЬ Е.В., МАРКИНА Ж.В., ХРИСТОФОРОВА Н.К., АЙЗДАЙЧЕР Н.А. Использование микроводоросли *Dunaliella salina*, эмбрионов и личинок плоского морского ежа *Scaphechinus* (см. прод.)

Адрес для переписки:

690022, г.Владивосток, пр-кт 100-летия  
Владивостоку, 159, Тихоокеанский институт  
биоорганической химии ДВО РАН, зав. пат.  
отделом Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Мензорова Наталья Ильинична (RU),  
Сейткалиева Александра Валерьевна (RU),  
Рассказов Валерий Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

ТИХООКЕАНСКИЙ ИНСТИТУТ  
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(ТИБОХ ДВО РАН) (RU)

## (54) СПОСОБ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ МОРСКОЙ И ПРЕСНОЙ ВОДЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. В тестируемую пробу вводят щелочную фосфатазу, выделенную из яйцеклеток морского ежа, и предварительно инкубируют в течение 10-15 мин при комнатной температуре. Добавляют п-нитрофенилфосфат натрия и инкубируют в течение 30 мин при температуре 25°C или 37°C. Получают окрашенное соединение в качестве продукта реакции. Оценивают степень ингибирования

фермента по величине оптической плотности продукта гидролиза субстрата при длине волны 400 нм с помощью ультрафиолетового ридера, используя 96-луночные планшеты. Способ позволяет визуально определить степень ингибирования фермента, интегрально оценить присутствие в воде тяжелых металлов, пестицидов и других токсикантов и увеличить количество одновременно исследуемых проб. 3 табл.

(56) (продолжение):

*mirabilis* как тест-организмов для оценки качества воды в заливе Петра Великого Японского моря. Биология моря, 2006, т.32, вып.3, с.188-196. RU 2057337 C1, 27.03.1996. RU 2131925 C1, 20.06.1999. RU 2266537 C2, 20.12.2005. RU 2308719 C1, 20.10.2007. Ферментативный метод определения степени загрязнения морской воды. Инновации бизнесу 19.02.2004. Найдено в Интернет: <http://www.ideasandmoney.ru/Ntrr/Details/142473>, 29.07.2009.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.  
*C12Q 1/42* (2006.01)  
*C12Q 1/48* (2006.01)

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2008152857/13, 30.12.2008**

(24) Effective date for property rights:  
**30.12.2008**

(45) Date of publication: **10.08.2010 Bull. 22**

Mail address:

**690022, g.Vladivostok, pr-kt 100-letija  
Vladivostoku, 159, Tikhookeanskij institut  
bioorganicheskoj khimii DVO RAN, zav. pat.  
otdelom N.I. Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Menzorova Natal'ja Il'ichna (RU),  
Sejtkalieva Aleksandra Valer'evna (RU),  
Rasskazov Valerij Aleksandrovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**TIKHOKEANSKIJ INSTITUT  
BIOORGANICHESKOJ KHIMII  
DAL'NEVOSTOCHNOGO OTDELENIJa  
ROSSIJSKOJ AKADEMII NAUK (TIBOKh  
DVO RAN) (RU)**

**(54) METHOD FOR INTEGRAL ASSESSMENT OF STATE OF CONTAMINATION OF SEA AND FRESH WATER**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry; biochemistry.

SUBSTANCE: invention pertains to biotechnology. Alkaline phosphatase extracted from sea urchin egg cells is added to the test sample and pre-incubated for 10-15 minutes at room temperature. Sodium n-nitrophenylphosphate is added and incubated for 30 minutes at 25°C or 37°C. A coloured compound is obtained as the reaction product. The enzyme degree of inhibition is evaluated from the

value of optical density of the substrate hydrolysis product at wavelength 400 nm using an ultraviolet reader using 96 well plates.

EFFECT: method enables visual determination of the enzyme degree of inhibition, integral assessment of presence of heavy metals, pesticides and other toxicants in water and increasing the number of simultaneously analysed samples.

3 tbl, 8 ex

Изобретение относится к биохимии, в частности к водной токсикологии, и может быть использовано для интегральной экспресс-оценки различных токсикантов в морской и пресной воде.

5 В связи с возрастанием уровня загрязнения окружающей среды и усиливающейся антропогенной нагрузкой на водные экосистемы все большую актуальность приобретает проблема поиска и разработки простых и высокочувствительных методов, характеризующих общую токсичность природных вод. В настоящее время для решения различных задач экологического мониторинга используется более 100  
10 методов биологического тестирования. Биотестирование основано на изучении изменений биологических показателей в организме, что дает возможность получить интегральную информацию о качестве среды и предсказать экологические последствия.

15 Наряду с общепринятыми организмами, такими как бактерии, простейшие, водоросли, беспозвоночные и др., в качестве тест-объектов используют различные ферменты и ферментные системы, отвечающие за важнейшие функции живых организмов. Основными преимуществами ферментативных методов анализа являются их чувствительность, простота и меньшая продолжительность эксперимента. При  
20 биомониторинге природной морской воды способность ферментативных тест-систем к интегральной оценке токсичности множества веществ (отходов промышленных и сельскохозяйственных объектов, сточных вод и т.д.) является обычно более важной, чем их чувствительность к отдельным токсикантам.

25 Известен способ для детектирования остаточных количеств фосфорорганических пестицидов в объектах окружающей среды и продуктах питания, осуществляемый с помощью датчика, созданного на основе холинэстераз (ХЭ) с калориметрической индикацией [Du Tingfa et al. (1989) Environ. Pollut. V.57. №3. P.217-222]. В литературе описаны также тесты с использованием моноферментной и биферментной систем  
30 светящихся бактерий [Esimbekova E.N. et al. (2007) Enzyme and Microbial Technology. №40. P.343-346] и тест-системы (трипсин-азоказеин, амилаза-крахмал), с помощью которых авторы проводили оценку состояния природных вод при антропогенных нагрузках [Корнеева Г.А. (2002) Изв. РАН. Сер. биол. №1. С.51-54].

35 Однако существенное ограничение для применения большинства ферментативных тестов при анализе морских и сточных вод, а также экстрактов из иловых осадков связано с минерализацией исследуемых проб. Так, тест-устройство на основе ХЭ может быть использовано, если минерализация воды в пробе не превышает 0.1 моль/л [Ristori C. et al. (1996) Anal. Chim. Acta. V.325. P.151-156]. При тестировании  
40 морской воды (0.44 моль/л по NaCl) тест-системой трипсин-азоказеин высокая концентрация различных солей в морской воде снижала активность фермента в 2 раза по сравнению с буферным раствором даже в отсутствие токсикантов [Корнеева Г.А. и др. (1990) Изв. РАН. Сер. биол. №6. С.821-826].

45 Известно, что в силу особенностей условий обитания морских животных выделяемые из них ферменты, как правило, отличаются от аналогичных ферментов наземных животных. Среди свойств, определяющих перспективность применения ферментов морского происхождения в различных областях биотехнологии и  
50 медицины, могут быть выделены такие, как устойчивость к денатурации под воздействием высоких температур и концентраций солей, а также относительно высокая удельная активность. Необычным свойством Ca,Mg-зависимой ДНКазы, выделенной из яйцеклеток или эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*, является способность сохранять ферментативную активность в водных средах с

высокой концентрацией солей, в том числе в морской воде с соленостью от 6,5 до 32,5‰ [Мензорова Н.И. и др. (1999) Биол. моря. Т.25. №1. С.60-65].

На основе этого уникального свойства фермента заявителем была разработана ДНКазная тест-система [RU 2131925 C1, 20.06.1999], с помощью которой была  
5 проведена оценка состояния вод Японского моря в естественных условиях и при антропогенных нагрузках [Мензорова Н.И. и др. (2007) Биол. моря. Т.33. №2. С.144-149]. При проведении экспериментов реакционную смесь, содержащую исследуемую пробу морской воды (или пресной воды с добавлением стандартного буфера), ДНКазу  
10 яйцеклеток или эмбрионов морского ежа и субстрат (ДНК), выдерживали 30 мин при 37°C, затем добавляли 0,6 М хлорную кислоту и центрифугировали 20 мин при 5000g. Активность фермента измеряли по величине оптической плотности супернатанта при длине волны 260 нм. Значение ДНКазной активности, определяемое в стандартной буферной смеси, принимали за 100%. В модельных экспериментах для  
15 оценки токсичности известного реагента определяли ту его концентрацию, при которой достигается 50%-ное ингибирование ДНКазной активности (ИК<sub>50</sub>).

Однако, при всех достоинствах данной тест-системы, в используемой методике необходим процесс центрифугирования с последующим спектрофотометрическим  
20 определением оптической плотности в каждой пробе (20-30 проб), что значительно увеличивает общее время тестирования (более 2 ч).

Задача изобретения - расширение арсенала ферментативных способов общей оценки состояния загрязнения и качества природных вод, включая морскую.

Поставленная задача решена способом интегральной оценки состояния загрязнения  
25 морской и пресной воды с использованием ферментативной тест-системы, включающей фермент, выделенный из яйцеклеток или эмбрионов морского ежа, и субстрат, с последующим спектрофотометрическим определением степени ингибирования фермента в исследуемой пробе, в котором согласно изобретению в  
30 качестве фермента, выделенного из яйцеклеток или эмбрионов морского ежа, используют щелочную фосфатазу, а в качестве субстрата используют п-нитрофенилфосфат натрия.

Заявляемый способ предусматривает предварительную инкубацию щелочной фосфатазы в тестируемой пробе. После этого к ферменту добавляют п-  
35 нитрофенилфосфат натрия и проводят стандартное инкубирование этой смеси. В процессе гидролиза субстрата в качестве продукта реакции образуется окрашенное соединение (п-нитрофенолят натрия). Это дает возможность по степени ингибирования фермента (уменьшение интенсивности окраски пробы) сделать  
40 качественную оценку состояния загрязнения морских и пресных вод.

Для осуществления количественной оценки степени ингибирования фермента величину оптической плотности инкубационной смеси измеряют при длине волны 400  
нм. Значение фосфатазной активности, определяемое в стандартной буферной смеси, принимают за 100%.

Для уменьшения объема пробы (100-200 мкл) и сокращения времени  
45 тестирования (40-45 мин) ферментативную реакцию проводят в 96-луночном планшете, измеряя оптическую плотность одновременно во всех пробах при помощи ультрафиолетового ридера.

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в увеличении  
50 чувствительности и упрощении способа тестирования. Изобретение расширяет арсенал ферментативных способов интегральной оценки состояния загрязнения морских и пресных вод.

Способ получения щелочной фосфатазы разработан заявителем и заключается в следующем. Яйцеклетки или эмбрионы морского ежа гомогенизируют в 50 мМ трис-НСI-буфере, рН 7,5, содержащем 1 мМ фенолметилсульфонида (ФМСФ), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотрептола (ДТТ). Препарат центрифугируют и используют как источник фермента. Высокоочищенную фосфатазу получают хроматографией исходного препарата белка на ДЭАЭ-целлюлозе, фенол-сефарозе и сефакриле HR 100. Фермент хранят в 50 мМ трис-НСI буфере, рН 7,5, 1 мМ ДТТ в 50%-ном глицерине при -20°С в течение 6 месяцев без потери активности.

Исследования физико-химических и ферментативных свойств щелочной фосфатазы из яйцеклеток или эмбрионов морского ежа показали, что фермент имеет оптимум рН 8,0-8,5 и является металлозависимым (КФ 3.1.3.1). Фосфатаза обладает свойством гидролизовать субстрат в растворах с высоким содержанием солей (0,70 моль/л по NaCl), а также в морской воде без потери ферментативной активности относительно стандартной буферной смеси. Соли различных металлов, присутствующие в природной морской воде в фоновых концентрациях, и соленость от 10 до 32,5‰ не снижают ферментативную активность. Показано, что фосфатаза является более стабильным ферментом, чем ДНКазы, а ее чувствительность к большинству модельных токсикантов несколько выше. На увеличение чувствительности заявляемого способа оказывает влияние и процесс предварительного инкубирования исследуемой пробы с фосфатазой. Поэтому общая чувствительность заявляемого способа выше, чем способа с использованием ДНКазной тест-системы.

Предлагаемый способ тестирования совмещает в себе ряд достоинств, присущих ДНКазному тесту: получение интегральной характеристики токсичности морских вод разной степени солености, вплоть до пресной, а также точность и воспроизводимость результатов. Однако, в отличие от последнего, чувствительность фосфатазы к различным токсикантам выше, а способ применения фосфатазной тест-системы методически намного проще, так как в процессе гидролиза субстрата в качестве продукта реакции образуется окрашенное соединение. Это дает возможность визуально определять степень ингибирования фермента и увеличить количество одновременно исследуемых проб, используя 96-луночные планшеты для определения оптической плотности с помощью планшетного ридера. Таким образом, продолжительность анализа сокращается до 40-45 мин, а объем пробы - до 100-200 мкл.

В модельных экспериментах нами показано, что дополнительное введение как в чистую морскую воду, так и в стандартную инкубационную смеси различных концентраций двухвалентных ионов меди, цинка, кадмия и свинца практически полностью подавляет активность фермента при концентрациях 6-75 мкг/л. Чувствительность фосфатазной активности к присутствию в морской воде пестицидов (ДДТ, ГХБ, ТМТД), детергентов (додецилсульфат натрия, моющие средства) и углеводородов нефти значительно меньше и в значительной степени зависит от вида используемого соединения. Данное тестирование было проведено с целью создания базовых данных о токсикологических эффектах различных реагентов на предлагаемый модельный объект для определения его чувствительности и универсальности при анализе загрязнений морской среды. В таблице 1 представлены сравнительные данные чувствительности фосфатазной и ДНКазной тест-систем к различным токсикантам при добавлении их в морскую и пресную воду.

Чувствительность к различным реагентам фосфатазной и ДНКазной тест-систем				
Реагент Металлы:	Фосфатазная тест-система, ИК <sub>50</sub> *		ДНКазная тест-система, ИК <sub>50</sub> *	
	Морская вода	Пресная вода (станд. буфер)	Морская вода	
5	Медь, мкг/л	6,5	63,5	320,0
	Свинец, мкг/л	10	75	120
	Кадмий, мкг/л	11	56	3350
	Цинк, мкг/л	32,5	17	106,0
	Железо, мг/л	11	25	4500
10	Пестициды:			
	ГХБ, мг/л	1,0	1,1	
	ДДТ, мг/л	12,0	8,0	4,5
	ТМТД, мг/л	3,0	3,0	
	Детергенты:			
15	Додецилсульфат Na, г/л	0,07	0,06	0,09
	Порошок «Tide», г/л	0,05	0,18	0,10
	Жидкость «Fairg», мл/л	0,20	0,26	
	Нефтепродукты:			
	Дизельное топливо, мг/л	2,5	2,0	5,0

\*ИК<sub>50</sub> - значения концентраций реагентов, вызывающих 50%-ное ингибирование активности ферментов.

Изобретение иллюстрируется примерами конкретного осуществления. В примерах 7 и 8 показана различная степень ингибирования фосфатазы пробами морской воды, взятыми на анализ из загрязненных и относительно чистых акваторий залива Петра Великого Японского моря, и пробами пресной воды, т.е. представлена интегральная (суммарная) оценка состояния загрязнения морской и пресной воды (таблицы 2 и 3).

ПРИМЕР 1. В чистую морскую воду (450 мкл) добавляют 5 ед. акт. фосфатазы яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* (5-10 мкл) и проводят прединкубацию фермента с известными количествами модельных химических реагентов в течение 10-15 мин. Затем добавляют 10 мкл 0,2 М п-нитрофенилфосфата натрия и инкубируют при 25 или 37°C в течение 30 мин. Оптическую плотность инкубационной смеси измеряют на спектрофотометре при длине волны 400 нм по стандартной методике [Мензорова Н.И. и др. (2008) Прикл. биохимия и микробиология. Т.44. №1. С.106-110]. При оценке токсичности известного реагента определяют ту его концентрацию, при которой достигается 50%-ное ингибирование фосфатазной активности (ИК<sub>50</sub>). За 100% принимают активность фермента, определяемую в стандартной инкубационной смеси. Результаты параллельных опытов отличаются на 2-5%.

ПРИМЕР 2. Все стадии идентичны примеру 1, кроме того, что ингибирование фермента модельными реагентами проводят в стандартной инкубационной смеси, содержащей 5 ед. акт. фосфатазы, 4 мМ п-нитрофенилфосфата натрия в 25 мМ трис-НСl буфере, рН 8.5, 10 мМ MgCl<sub>2</sub> и 150 мМ NaCl.

ПРИМЕР 3. Проведение непосредственного тестирования загрязнения проб морской воды для измерения суммарной токсичности неизвестных химических веществ.

К 480 мкл исследуемого образца морской воды добавляют 5 ед. акт. фосфатазы яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* (5-10 мкл) и проводят прединкубацию фермента 10-15 мин при комнатной температуре, затем добавляют 0,2 М п-нитрофенилфосфат (10 мкл) и далее инкубируют 30 мин при 25 или 37°C.

ПРИМЕР 4. Все стадии идентичны примеру 3, кроме того, что вместо фосфатазы яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* используют фосфатазу

эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*.

ПРИМЕР 5. Все стадии идентичны примеру 3, кроме того, что вместо фосфатазы яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* используют фосфатазу яйцеклеток морского ежа *Tripheustes ventaicosus*.

ПРИМЕР 6. Все стадии идентичны примеру 3, кроме того, что вместо фосфатазы яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* используют фосфатазу яйцеклеток морского ежа *Lytechinus variegatus*.

ПРИМЕР 7. Все стадии идентичны примеру 3, кроме того, что тестирование проводят в 96-луночных планшетах, в связи с чем объем инкубационной смеси уменьшают до 100-200 мкл, а оптическую плотность измеряют с помощью ультрафиолетового планшетного ридера. Результаты тестирования представлены в таблице 2.

Таблица 2

Оценка суммарной степени загрязнения проб морской воды с помощью фосфатазной тест-системы

Место отбора проб, № станции	Активность фосфатазы, о.е./мл*	Ингибирование фосфатазы, %	Оценка качества морской воды**
Устье р. Туманная:			
1	0.590±0.020	33±3	грязная
2	0.470±0.020	47±3	грязная
3	0.710±0.030	20±4	загрязненная
4	0.750±0.035	15±5	загрязненная
5	0.820±0.015	7±2	условная норма
Бухта Троицы:			
6	0.880±0.015	0	условная норма
7	0.865±0.015	2±2	условная норма
8	0.745±0.010	16±1	загрязненная
Амурский залив:			
9	0.750±0.020	15±3	загрязненная
10	0.605±0.020	32±3	грязная
Стандартный буфер	0.885	0	

\* о.е./мл - единица оптической плотности в мл при длине волны 400 нм;  
 \*\* согласно разработанной нами ранее системе оценки загрязненности морских вод незагрязненной («условной нормой») считают воду, в которой степень ингибирования фермента не превышает 10%, «загрязненной» - 10-25%, «грязной» - 25-50% и «очень грязной» - свыше 50% [Мензорова Н.И. и др. (2007) Биол. моря. Т.33. №2. С.144-149].

ПРИМЕР 8. Все стадии идентичны примеру 3, кроме того, что вместо пробы морской воды берут 450 мкл исследуемого образца пресной воды, к которому добавляют инкубационную смесь до конечной концентрации 25 мМ трис-НСl буфера, рН 8.5, 10 мМ MgCl<sub>2</sub> и 150 мМ NaCl. Результаты тестирования представлены в таблице 3.

Таблица 3

Оценка суммарной степени загрязнения проб пресной воды с помощью фосфатазной тест-системы

Образец воды.	Активность фосфатазы, о.е./мл	Ингибирование фосфатазы, %	Оценка качества воды*
Сточная вода (концентрация сточной воды в пробе, %):			
100	0.440±0.030	54±4	очень грязная
75	0.540±0.020	43±3	грязная
50	0.655±0.030	30±4	грязная
20	0.780±0.035	18±5	загрязненная
10	0.865±0.015	9±2	условная норма
Водопроводная вода (горячая)	0.655±0.030	31±4	грязная

Водопроводная вода (холодная)	0.885±0.035	7±5	условная норма
Дистиллированная вода	0.940±0.015	1±2	условная норма
Стандартный буфер	0.950	0	

5

### Формула изобретения

Способ интегральной оценки состояния загрязнения морской и пресной воды, предусматривающий введение в тестируемую пробу щелочной фосфатазы, выделенной из яйцеклеток или эмбрионов морского ежа, предварительную инкубацию тестируемой пробы в течение 10-15 мин при комнатной температуре и введение субстрата п-нитрофенилфосфата натрия, последующую инкубацию в течение 30 мин при температуре 25°C или 37°C, после чего оценивают степень ингибирования фермента по величине оптической плотности продукта гидролиза субстрата при длине волны 400 нм с помощью ультрафиолетового ридера, используя 96-луночные планшеты, и по величине значения которой оценивают состояние загрязнения морской и пресной воды.

20

25

30

35

40

45

50