

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(18)



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

(22) Prihlášené 17 10 85
(21) (PV 7392-85)

(40) Zverejnené 15 03 88

(45) Vydané 15 03 89

259362
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 33/487

(75)

Autor vynálezu

MARCINKA KAMIL ing. CSc., BRATISLAVA

(54) Fixačno-vymývací roztok pre detekčnú techniku striebrom

1

2

Riešenie sa týka fixačno-vymývacieho roztoku na stanovenie bielkovín detekčnou technikou striebrom. Roztok obsahuje 40 až 50 obj. dielov metylalkoholu, 10 až 12 obj. dielov kyseliny octovej, 38 až 50 obj. dielov deionizovanej vody a 0,2 až 0,5 obj. dielov glutaraldehydu. Roztok má využitie pri fixovaní bielkovín v polyakrylamidových géloch, najmä pri stanovení bielkovín detekčnou technikou striebrom na biochemických pracoviskách, v pivovarníctve a farmaceutickom priemysle.

Vynález sa týka fixačno-vymývacieho roztoku na stanovenie bielkovín detekčnou technikou striebrom.

Z literatúry sú známe mnohé obmeny tzv. fixačného roztoku. Zakladateľ metódy farbenia striebrom v polyakrylamidovom géle Merrill doporučuje vo všetkých jeho prácach zmes 50 % metylalkoholu + 12 % kyseliny octovej vo vode. Rovnakú zmes doporučujú i Schleicher M. a Watterson D. M. (Anal. Biochem. **131**, 312, 1983). Zmes metylalkoholu resp. etylalkoholu a kyseliny octovej v rôznych nižších koncentráciách uvádzajú rôzni iní autori. Niektoré metodiky uvádzajú fixačné roztoky, ktoré obsahujú iné látky, najmä kyselinu trichlóroctovú a kyselinu sulfosalicylovú v rôznych koncentráciách. Glutaraldehyd ako fixatívum pri tejto technike prvý použil r. 1980 Oakley a spol. (Oakley B. R., Krisch D. R. a Morris N. R.: Anal. Biochem. **105**, 361, 1980) vo forme 10 % vodného roztoku. Iné fixačné látky nepoužili. Glutaraldehyd si našiel odvtedy prvé miesto v metodike farbenia striebrom ako vodný roztok v koncentrácii 10 %, iba v jednom prípade v koncentrácii 1 % (Porro M., Viti S., Antoni G. a Saletti M.: Anal. Biochem. **127**, 316, 1982).

Väzba glutaraldehydu na bielkovinu pred aplikáciou strieborných iónov zvyšuje citlivosť stanovenia farbením striebrom, ak sa použije strieborný ión vo forme amoniakálneho komplexu. Nevýhodou stanovenia bez použitia glutaraldehydu je jeho nižšia citlivosť. Použitím glutaraldehydu vo forme 10 %-ného vodného roztoku sa však pracovný proces značne predlžuje, pretože vymývanie glutaraldehydu z gélu je veľmi zdĺhavé a vždy nedokonalé, v dôsledku čoho ostáva po zafarbení pozadie. Práca s glutaraldehydom v koncentrácii 10 % je navyše zdraviu škodlivá.

Uvedené nevýhody odstraňuje fixačno-vymývacie roztok pre detekčnú techniku striebrom, ktorého podstata spočíva v tom, že obsahuje 40 až 50 objemových dielov metylalkoholu, 10 až 12 objemových dielov kyseliny octovej a 38 až 50 objemových dielov vody a táto zmes obsahuje 0,2 až 0,5 obj. dielov glutaraldehydu.

Výhodou fixačno-vymývacieho roztoku podľa vynálezu je, že fixuje bielkoviny v polyakrylamidovom géle, vymyje nízkomolekulové látky z gélu a súčasne zabezpečí, že glutaraldehyd sa veľmi účinne naviaže na

bielkovinu i v použitej nízkej koncentrácii. Väzba je dostatočne pevná a to, aby pri pôsobení ďalších roztokov ostal glutaraldehyd na bielkovinu naviazaný, zatiaľ čo nenaviazaný sa z gélu odstráni. Táto skutočnosť je jedna z podmienok, ktoré zabezpečujú, že gél ostane po zafarbení striebrom prakticky bez pozadia.

Príklad 1

Príprava fixačno-vymývacieho roztoku:

Pripraví sa zmes, pozostávajúca z 50 objemových dielov metylalkoholu, 12 objemových dielov koncentrovanej kyseliny octovej a 38 objemových dielov deionizovanej vody. Do tejto zmesi sa pridá 1 objemový diel 25 % glutaraldehydu.

Príklad 2

Postupovalo sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa pripravila zmes pozostávajúca zo 40 objemových dielov metylalkoholu, 10 objemových dielov kyseliny octovej a 50 objemových dielov vody.

Príklad 3

Postupovalo sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že do zmesi sa pridali 2 objemové diely glutaraldehydu (25 %).

Príklad 4

Spôsob stanovenia bielkovín detekčnou technikou striebrom

Po ukončení elektroforézy sa gél preperie fixačno-vymývacím roztokom uvedeným v príkladoch 1, 2, 3. Potom sa gél premýva vodou, ďalej sa pôsobí roztokom amoniakálneho strieborného komplexu, gél sa ďalej vymyje 0,001 M hydroxidom sodným a vyvolá sa roztokom kyseliny citrónovej a formaldehydu. Potom sa proces zastaví stop-kúpeľou a gél sa nakoniec premyje vodou.

Fixačno-vymývacie roztok podľa vynálezu možno použiť pri fixovaní bielkovín v polyakrylamidových géloch. Jeho špeciálne využitie je pri stanovení bielkovín v polyakrylamidovom géle detekčnou technikou striebrom.

PREDMET VYNÁLEZU

Fixačno-vymývacie roztok pre detekčnú techniku striebrom, obsahujúci metylalkohol, kyselinu octovú, vodu a glutaraldehyd, vyznačujúci sa tým, že obsahuje 40 až 50 objemových dielov metylalkoholu, 10 až 12

objemových dielov kyseliny octovej, 38 až 50 objemových dielov deionizovanej vody a 0,2 až 0,5 objemových dielov glutaraldehydu.

Opravy ve vytištěných popisech vynálezů

Ve vytištěném popisu vynálezu k autorskému osvědčení č. 259 362
bylo chybně vytištěno číslo přihlášky vynálezu.

Správně PV 8102-85

Tisk
Talichov
-3. V. 1990.