



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

232326

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³

G 01 N 21/31

(22) Prihlášené 31 01 83
(21) (PV 613-83)

(40) Zverejnené 15 02 84

(45) Vydané 15 07 86

(75)
Autor vynálezu

ZEMEK JURAJ ing. CSc., LEHNICE, KUNIAK LUDOVÍT ing. CSc.,
JANIŠ JOZEF MUDr., BRATISLAVA

(54) Spôsob stanovenia koncentrácie bielkovín v biologických materiáloch

Vynález sa týka spôsobu stanovenia koncentrácie bielkovín v biologických materiáloch. Podľa vynálezu sa postupuje tak, že vhodné farbivo s výhodou Coomassie Blue G (C.I. 42655) sa rozpustí v metanole, pridať sa kyseliny s výhodou kyselina chlórvoďíková, alebo kyselina chloristá, prípadne kyselina fosforečná o koncentrácii 0,25 až 0,8 mól/l a chlorid sodný na potlačenie adhézie na sklenné časti meracej kyvety. Do takto pripraveného reakčného roztoku sa pridá roztok obsahujúci bielkovinu, ktorá spôsobuje posun absorpčného pásu a zvýšenie hodnoty absorbancie meraného roztoku. Zvýšenie absorbancie je úmerné koncentrácii prítomnej bielkoviny.

Vynález má využitie predovšetkým v klinickej diagnostike pri stanovení bielkovín v rôznych telových tekutinách, no môže sa využiť i v priemyselnej praxi pri medzioperačnej kontrole prípravy bielkovinových substrátov.

Prihláška vynálezu sa týka spôsobu stanovenia koncentrácie bielkovín v biologických materiáloch ako v moči, likvore, krvnom sére a ďalších tekutinách predovšetkým v podmienkach základného a aplikovaného výskumu a v rutinej analytickej prevádzke.

V doterajšej laboratórnej praxi sa pre stanovenie koncentrácie bielkovín používa klasická metóda podľa Lowryho s fenolovým Polinovým činidlom Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: *J. Biol. Chem.* **193** (1951) 265 pre vyššie koncentrácie bežná biuretová reakcia (Rose 1833) alebo podľa Extona (Real Lexikon der Medizin, Urban and Schwarzenberg, München 1966, s. 206, E 274). V poslednej dobe sa objavil rad techník založených na tvorbe farebných komplexov medzi farbivom a bielkovinou Bradford M. M.: *Analyt. Biochem.* **72** (1976) 248; Sedmak J. J., Grossberg S. E.: *Analyt. Biochem.* **79** (1977) 544; Spector T.: *Analyt. Biochem.* **86** (1978) 142.

Tieto metódy sú založené na spektrofotometrickom stanovení koncentrácie farebného komplexu farbiva s bielkovinou. Farbivo je v kyslom prostredí v oxidovanom stave, pri vzniku komplexu s proteínom sa farbivo redukuje pričom dochádza k posunu absorbančného maxima a k podstatnému nárastu v hodnote absorbancie. Ako farbivo sa v súčasnosti využíva Coomassie brilliant blue G-250, čo je identické s farbivom Serva Blue G (Color Index č. 42655) a chemicky je to 3-[[N-etyl-N-(3-metyl-4-(4-etoxyanilino)fenyl)-2-metyl-4-(N-etyl-N-(3-(sódium sulfonáto)fenyl metyl)] aminofenyl]/metylé-2,5-cyklohexadién-1-ylidén/]] imóniobenzén sulfonát.

Oproti klasickým metódam použitie techniky tvorby farebného komplexu uvedeného farbiva s bielkovinami má výhodu v rýchlosti prevedenia analýzy, nevýhoda je však vysoká adhezivita farbiva k stenám meracích kviet. Vysoká citlivosť metódy sa prejavuje ako výhoda pri stanovení v moči resp. likvore, kde stačí k analýze aj 10 µl vzorky, znemožňuje však súčasne analýzu vzoriek s vysokou koncentráciou proteínov (krvné sérum, plazma).

Uvedené nedostatky rieši spôsob stanovenia koncentrácie bielkovín v biologických materiáloch a to jednak úpravou prostredia analyzovanej tekutiny, jednak modifikáciou štruktúry farbiva.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že v prvom stupni sa pripraví roztok 3-[[N-etyl-N-(3-metyl-4-(4-etoxyanilino)fenyl)-2-metyl-4-(N-etyl-N-(3-(sódium sulfonáto)fenyl metyl)] aminoetyl]/metylé-2,5 dimetyl-2,5 cyklohexadién-1-ylidén/]] imóniobenzénsulfonátu alebo 3-[[N-hydroxyetyl-N-(3-metyl-4-(4-etoxyanilino)fenyl)-2-metyl-4-(N-hydroxyetyl-N-(3-(sódium sulfonáto)fenyl metyl)] aminofenyl]/metylé-2,5-dimetyl-2,5-cyklohexadién-1-ylidén/]] imóniobenzénsulfonátu alebo 3-[[N-etyl-N-(3-hydroxymetyl-4-(4-etoxyanilino)fenyl)-2-hydroxymetyl-4-(N-etyl-N-(3-(sódium sulfonáto)fenyl metyl)] aminofenyl]/metylé-2,5 dihydroxymetyl-2,5-cyklohexadién-1-ylidén/]] imóniobenzénsulfonátu o koncentrácii 20 až 100 mg v 100 ml metanolu, potom sa pridá 100 ml roztoku kyseliny chlorovodíkovej o koncentrácii 2,5 až 8 mól/l alebo kyseliny chloristej o koncentrácii 0,3 až 1 mól/l alebo kyseliny fosforečnej o koncentrácii 0,8 až 2 mól/l a nakoniec sa pridá 800 ml roztoku chloridu sodného o koncentrácii 2 až 5 mmól/l, načo sa v druhom stupni k 25 až 300 objemovému dielom pripraveného reakčného roztoku pridá jeden objemový diel vzorky rozpusteného proteínu a po 5 minútach reakcie pri izbovej teplote sa zmeria absorbancia pri 560 až 620 nm, ktorej hodnota je priamo úmerná koncentrácii meraného proteínu.

Za podmienok podľa vynálezu možno pripraviť činidlo k stanoveniu proteínov prakticky bez adhezivity farbiva na steny sklenených predmetov, a to jednak v dôsledku rozpustenia farbiva v metanole, jednak v dôsledku nahradenia hydrofóbných alkalických skupín hydrofilnejšími hydroxyalkylovými skupinami. Príprava činidla k stanoveniu proteínov v biologických tekutinách podľa vynálezu umožňuje stanovenie koncentrácie proteínu nielen v ich zriedených roztokoch napríklad v moči, likvore, na ktoré je doteraz obmedzené využitie farebnej reakcie medzi farbivom a bielkovinou, ale v závislosti od koncentrácie použitej kyseliny aj v koncentrovaných roztokoch proteínov, krvnom sére, plazme. Pre stanovenie koncentrácie proteínov

v týchto prostrediach je vhodné použiť pri príprave činidla roztok koncentrovanejšej minerálnej kyseliny, tak ako je uvedené v príkladoch.

Pr í k l a d 1

Činidlo na stanovenie proteínov sa pripraví rozpustením 20 mg 3- N-hydroxyetyl-N/3-metyl-4-/ 4-/4-etoxyanilínofenyl - 2-metyl-4- N-hydroxyetyl-N- 3-(sódium sulfonáto)fenylmetyl aminofenyl /metylen-2,5-dimetyl-2,5-cyklohexadién-1-ylidén imóniobenzénsulfonátu v 100 ml metanolu, načo sa pridá 100 ml kyseliny chlór vodíkovej 6 mól/l a 800 ml chloridu sodného 2 mmól/l. Pridaním 50 µl roztoku albumínu hovädzieho séra (5 g/100 ml) v chloride sodnom 1 mmól/l k 3 ml činidla sa zmení hodnota absorbcie po 5 minútach pri teplote miestnosti o 0,42 (merané pri 620 nm). Lineárny rozsah pre stanovenie koncentrácie proteínov je za uvedeného usporiadania zabezpečený v rozsahu 0,2 až 6 mg proteínu vo vzorke s koeficientom variácie 2,4 % pre n = 10.

Pr í k l a d 2

Tak ako je uvedené v príklade 1 s tým rozdielom, že k príprave činidla sa použije 100 mg 3-[[N-etyl-N-/3-metyl-4-/ [4-(4-etoxyanilín)fenyl] - <2-metyl-4-{N-etyl-N-[3-(sódium sulfonáto)fenylmetyl]} aminofenyl] > /metylen-2,5-dimetyl-2,5-cyklohexadién-1-ylidén/} imóniobenzénsulfonátu v 100 ml metanolu a pridá sa 100 ml kyseliny chlór vodíkovej 2 mól/l a 800 ml chloridu sodného 5 mmól/l. Pridávkou 30 µg imunoglobulínu G v 100 µl vzorky k 3 ml takto pripraveného činidla dochádza k zmene absorbcie pri 18 °C po 5 minútach o 0,37 jednotiek absorbcie (merané pri 595 nm) lineárny rozsah stanovenia koncentrácie je zabezpečený od 5 až 50 µg imoglobulínu G. Koeficient variácie 3,16 % pre n = 10.

Pr í k l a d 3

Tak ako v príklade 1 s tým rozdielom, že k príprave činidla sa použije 40 mg 3-[[N-etyl-N-/3-hydroxymetyl-4-/ [4-etoxyanilín)fenyl] - <2-hydroxymetyl-4-{N-etyl-N-[3-/sódium sulfonáto)fenylmetyl]} aminofenyl/]] metylén-2,5-dihydroxymetyl-2,5-cyklohexadién-1-ylidén/} imóniobenzénsulfonátu v 100 ml metanolu a 100 ml kyseliny fosforečnej 0,3 mól/l a 800 ml chloridu sodného 2 mmól/l. Takto pripravené činidlo 3 ml reaguje so vzorkou 36 µg albumínu ľudského séra v 20 µl roztoku chloridu sodného 1 mmól/l pri teplote miestnosti 23 °C po dobu 5 minút za tvorby farebného komplexu o hodnote absorbcie 0,193 pri 560 nm. Koeficient variácie pre n = 15 je 2,12 %.

Pr í k l a d 4

Tak ako je uvedené v príklade 3 s tým rozdielom, že sa použije k príprave činidla kyselina fosforečná o koncentrácii 2 mól/l. Takto pripravené činidlo (2,5 ml) reaguje s 3 mg feritínu v 100 µl vzorky za vzniku farebného komplexu o hodnote absorbcie 0,315 pri 560 nm. Koeficient variácie pre n = 10 je 3,85 %.

Pr í k l a d 5

Tak ako je uvedené v príklade 1 s tým rozdielom, že namiesto kyseliny chlór vodíkovej sa použije kyselina chloristá o koncentrácii 0,3 mól/l. Pridávkou 25 µg ľudskej pankreatickej alfa amylázy prečistenej do kryštalického stavu v 50 µl vzorky sa zmení hodnota absorbcie po 5 minútach a pri teplote miestnosti o 0,262 pri 620 nm. Koeficient variácie 2,35 % pre n = 15.

Pr í k l a d 6

Tak ako je uvedené v príklade 1 s tým rozdielom, že namiesto kyseliny chlór vodíkovej sa použije kyselina chloristá o koncentrácii 1 mól/l. Pridaním 50 µl roztoku albumínu

hovädzieho séra (5 g/100 ml) v chloride sodnom 1 mmól/l k 3 ml činidla sa zmení absorbanca pri 620 nm o 0,48. Koeficient variácie pre $n = 10$ je 3 %.

Vynález má využitie všade, kde je potrebné stanoviť rýchlo a presne obsah bielkovín. Zvlášť výhodné je túto metódu využiť v klinickej biochémií pri stanovení bielkovín v biologických tekutinách pre diagnostické účely. Dá sa využiť i v priemyselnej praxi pri medzioperačnej kontrole najmä substrátov obsahujúcich vodorozpuštné bielkoviny.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob stanovenia koncentrácie bielkovín v biologických materiáloch pomocou absorbanca vyznačený tým, že v prvom stupni sa pripraví roztok 3-[[N-etyl-N-3-metyl-4-[4-(4-etoxyanilino)fenyl]-2-metyl-4-{N-etyl-N-[3-(sódium sulfonáto)fenyl metyl]}aminoetyl]/metylén-2,5-dimetyl-2,5-cyklohexadién-1-ylidén//imóniobenzénsulfonátu alebo 3-[[N-hydroxyetyl-N-3-metyl-4-[4-(4-etoxyanilino)fenyl]-2-metyl-4-{N-hydroxyetyl-N-[3-(sódium sulfonáto)fenylmetyl]}aminofenyl]/metylén-2,5-dimetyl-2,5-cyklohexadién-1-ylidén//imóniobenzénsulfonátu alebo 3-[[N-etyl-N-3-hydroxymetyl-4-[4-etoxyanilino)fenyl]-2-hydroxymetyl-4-{N-etyl-N-[3-(sódium sulfonáto)fenyl metyl]}aminofenyl]/metylén-2,5-dihydroxymetyl-2,5-cyklohexadién-1-ylidén//imóniobenzénsulfonátu o koncentrácii 20 až 100 mg v 100 ml metanolu, potom sa pridá 100 ml roztoku kyseliny chlórvoďíkovej o koncentrácii 2,5 až 8 mól/l alebo kyseliny chloristej o koncentrácii 0,3 až 1 mól/l alebo kyseliny fosforečnej o koncentrácii 0,8 až 2 mól/l a nakoniec sa pridá 800 ml roztoku chloridu sodného o koncentrácii 2 až 5 mmól/l, načo sa v druhom stupni k 25 až 300 objemovým dielom pripraveného reakčného roztoku pridá jeden objemový diel vzorky rozpusteného proteínu a po 5 minútach reakcie pri izbovej teplote sa zmesia absorbanca pri 560 až 620 nm, ktorej hodnota je priamo úmerná koncentrácii meraného proteínu.