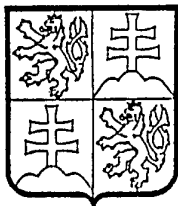


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu :

276 912

(21) Číslo přihlášky : 1844-89

(22) Přihlášeno : 24.03.89

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : B6

(51) Int. Cl.⁵ :

G 01 N 31/22

(40) Zveřejněno : 19.02.92

(47) Uděleno : 20.07.92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 16.09.92

(73) Majitel patentů : Slovenská technická univerzita, Bratislava, CS

(72) Původce vynálezu : Kuniak Ľudovít ing. CSc., Bratislava, CS;
Matusová Angela ing., Zlaté Klasy, CS

(54) Název vynálezu : Stabilizovaná reagentia na stanovenie koncentrácie
proteinov v biologických tekutinách

(57) Anotace :

Reagentia obsahuje farbivo zloženia 3-[N-etyl-N-/3-metyl-4-4-/4-etoxyanilino-/fenyl]-<2-metyl-4{N-etyl-N-[3-/sódium sulfonáto/fenyl metyl]}aminofenyl>/metylén-2,5 cyklohexadién-1-ylidén/}amoniobenzén sulfonát. V 1 litri vodného roztoku obsahuje 250 až 300 mg farbiva, 0,85 až 0,95 mólu kyseliny chlorovodíkovej, 0,15 až 0,20 mólu chloridu sodného a 0,15 až 0,20 mólu viacsytného alkoholu, napríklad monoetylenglykolu alebo glycerínu.

Vynález sa týka stabilizovanej reagentie na stanovenie koncentrácie proteínov v biologických tekutinách

Laboratórna prax pri purifikácii a izolácii proteínov ako diagnostické potreby klinickej praxe často vyžadujú rýchle a presné stanovenie koncentrácie proteínov vo vodných roztokoch a to s pomerne vysokou citlivosťou a pokiaľ možno s použitím minimálneho objemu analyzovanej vzorky. Uvedené priame kritériá v posledných rokoch splňuje metóda založená na tvorbe farebného komplexu proteínu s vhodným farbivom. Takýmto farbivom je napr. 3-[[N-etyl-N-/3-metyl-4-/4-/4-etoxyanilino/fenyl]-<2-metyl-4-(N-etyl-N-[3-/sódium sulfonato/fenyl metyl]] aminobenzén sulfonát Coomassie® brilliant blue G-250 /Color Index č. 42655/, u ktorej pozoroval ako prvý A.H.Reisner a spol. /Reisner A.H., Nemes P. a Bucholz G.: Anal. Biochem. 64/1975/ 509/, že existuje v dvoch farebných formách. Oxidová leukoforma v kyslom prostredí červená, ktorá sa mení na modrú adsorpciou proteínu v rovnakom prostredí. Tento poznatok využil M.M.Bradford a vypracoval metódu na stanovenie bielkovín vo vodných roztokoch kyseliny fosforečnej s prídavkom etanolu. /Bradford M.M.: Anal. Biochem. 72, /1976/ 248/. Zistilo sa však /Spector Z.: Anal. Biochem. 86/1978 142/, že reakčný roztok farbiva je pri skladovaní nestály a preto ho treba v dvojtýždenných intervaloch korigovať, čo je pre rutinnú prevádzku nevyhnutné. Taktiež sa zistilo, že závislosť absorbancie na koncentrácii proteínu nie je pri použitej metóde lineárna /Sedmak H.J. a Grossbery S.E.: Anal. Biochem. 79 /1977/ 544/, čo pri analytickej metóde nevyhnutným momentom.

Uvádzané nedostatky rieši stabilizovaná reagentia podľa príhlášky vynálezu, ktorá má podstatne vyššiu stabilitu pri skladovaní a závislosť adsorbancie na koncentrácii meraného proteínu je prísne lineárna v rozsahu do $2,0 \text{ g}^{-1}$.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že reagentia na stanovenie koncentrácie proteínov v biologických tekutinách obsahuje 0,000285 až 0,000342 mólu farbiva 3-[[N-etyl-N-/3-metyl-4-/4-/4-etoxyanilino/fenyl]-<2-metyl-4-(N-etyl-N-[3-/sódium sulfonato/fenyl metyl]]aminofenyl>metylen-2,5-cyklohexydién-1-ylidén/]]imóniobenzén sulfonát, 0,85 až 0,95 mólu kyseliny chlorovodíkovej, 0,15 až 0,2 mólu chloridu sodného a 0,15 až 0,2 mólu etylénglykolu alebo glycerínu v litri vodného roztoku.

Zistilo sa, že najvhodnejšia kyselina v ktorej sa najrýchlejšie rozpúšťa uvedené farbivo a vytvára oxidovanú leuko-formu červenej farby je kyselina chlorovodíková. Rovnako sa zistilo, že najvyššia citlivosť zafarbenia do modra prídavkom proteínu sa dosahuje vo veľmi úzkom rozsahu koncentrácie kyseliny chlorovodíkovej pri optimálnej koncentrácii farbiva. So stúpajúcou koncentraciou kyseliny pri konštantnej koncentrácii farbiva citlivosť farebnej reakcie na proteíny klesá a maximálna citlivosť sa dosahuje v koncentračnej oblasti kyseliny $1,175$ až $0,195 \text{ mol.l}^{-1}$, čo je nižšia ako v doteraz publikovaných prácach. V uvedenom koncentračnom rozsahu podľa postupu stanovenia prítomnosť 10 mg proteínu pôsobí zmenu absorbancie až $0,65$ až $0,75$.

Prídavok viacsýtnych alkoholov a chloridu sodného do reakčného roztoku urýchľuje ustáľovanie rovnováhy tvorby farebného

komplexu farbiva s proteínom. Rovnováha sa podľa navrhovaného postupu ustalauje do 5 minút. Okrem toho prítomné alkoholy a chlorid sodný zvyšuje atabilitu reakčného zásobného roztoku, takže nie je potrebné citlivosť roztoku tak často kontrolovať. Zistilo sa, že zásobný roztok podľa vynálezu i po 3 mesiacoch skladovania pri 15 až 30 °C mal rovnakú citlivosť ako roztok čerstvo pripravený. Rovnako sa zistilo, že pri príprave reakčného roztoku je dôležitý spôsob rozpúšťania farbiva. Od spôsobu rozpúšťania závisí podstatne rýchlosť jeho rozpúšťania a ustaloovania rovnováhy leuko-formy farbiva.

Príklad 1

250 mg farbiva zloženia 3-[[N-etyl-N-/3-metyl-4-4-/4-etoxy-anilino/fenyl]-2<-metyl-4-{N-etyl-N-[3-/sódium sulfonato/fenyl-metyl]} aminofenyl>/metylén-2,5 cyklohexadién 1-ylidén/] amonio-benzén sulfonát Coomasie brillant blue G-250 sa rozpustilo v roztoku pozostávajúceho z 80 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej /36 až 37% /, 160 ml destilovanej vody, 10 g chloridu sodného a 10 ml ethylénglykolu. Po rozpustení farbiva sa reakčný roztok doplnil destilovanou vodou na celkový objem 1 liter a prefiltraval sa cez filtračný papier, aby sa odstránili nerozpustné zvyšky farbiva, resp. nerozpustné nečistoty. Takto pripravený roztok, ktorý je zásobný roztok, ktorý sa pred použitím na stanovenie proteínov riedi destilovanou vodou v pomere 1 objemový diel zásobného roztoku a 4 diely destilovanej vody. Po zamiešaní je roztok pracovný, možno hneď použiť na meranie koncentrácie proteínov v roztokoch. Absorbancia pracovného roztoku oproti vode pri vlnovej dĺžke 595 nm bola 0,370. Pri meraní koncentrácie proteínov v kontrolných vzorkách napr. ľudského krvného proteínu s deklarovanou koncentráciou 66,7 g/l /100 nl séra sa zriedi s 3,2 ml destilovanej vody/. Potom sa do suchej kolorimetrickej kvety mikropipetou nadáva 2 x 1 ml pracovného roztoku na stanovenie proteínov, čím sa reakčný roztok súčasne dostatočne premieša.

Reakčný roztok sa okamžite zafarbí na modro a zmeria sa absorbancia v intervale od 2 do 5 minút, kedy je absorbancia maximálna. V tomto prípade bola absorbancia oproti vode 1,115, t.j. po odpočítaní pozadia 0,745. Kalibračná krivka absorbie v závislosti od koncentrácie proteínu je lineárne v celom rozsahu od 0,2 do 2,0 g/ proteínu.

Obdobné výsledky sa získali pri použití séra hovädzieho albumínu, namerané hodnoty boli v rámci reprodukovateľnosti metódy.

Príklad 2

Postup ako v príklade 1 s tým rozdielom, že 300 mg farbiva sa rozpúšťa v roztoku pozostávajúceho z 85 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej a 170 ml destilovanej vody, 15 g chloridu sodného a 15 ml glycerínu. Hotový zásobný roztok po zriedení na pracovný roztok mal absorbanciu 0,420. Kontrolné séra dávali pri rovnakých koncentráciách bielkovín zrovnateľné absorbancie ako v príklade 1.

Vynález má použitie všade tam, kde sa pracuje s roztokami proteínov a to tak vo výskume i priemyselnej aplikácii v rôznych odvetviach biotechnológie ako klinickej diagnostike.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Stabilizovaná regencia na stanovenie koncentrácie proteínov v biologických tekutinách s obsahom farbiva 3-[[N-etyl-N-/3-metyl-4-4-/4-etoxyanilino/fenyl]-<2-metyl-4{-etyl-N-[3-/sódium sulfonato/fenylmetyl]} aminofenyl>/metylén-2,5cyklohexadién1-ylidén/]]amoniobenzém sulfonát, vyznačujúci sa tým, že v 1 litri vodného roztoku obsahuje 0,000285 až 0,000342 mólu farbiva, 0,85 až 0,95 mólu kyseliny chlorovodíkovej 0,15 až 0,20 mólu chloridu sodného a 0,15 až 0,20 mólu viacsytného alkoholu, napríklad monoethylénglykolu alebo glycerínu.

Koniec dokumentu