



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

259361
(11) (B1)

[51] Int. Cl.⁴
G 01 N 33/487

[22] Prihlášené 17 10 85
[21] {PV 7391-85}

[40] Zverejnené 15 03 88

[45] Vydané 15 03 89

[75]

Autor vynálezu

MARCINKA KAMIL Ing. CSc., BRATISLAVA

- [54] **Súprava na stanovenie bielkovín detekčnou technikou striebrom**

1

2

Riešenie sa týka súpravy na stanovenie bielkovín detekčnou technikou striebrom. Podstata tejto súpravy na stanovenie bielkovín spočíva v tom, že obsahuje oddelene šesť zložiek vo forme roztokov, pričom prvá zložka obsahuje vodný roztok glutaraldehydu, druhá zložka roztok zmesi hydroxidu amónneho a hydroxidu sodného, tretia zložka roztok dusičnanu strieborného, štvrtá zložka roztok hydroxidu sodného, piata zložka roztok kyseliny citrónovej a šiesta zložka vodný roztok formaldehydu. Riešenie má využitie pri stanovení bielkovín v platňových polyakrylamidových géloch a to najmä v biochemických pracoviskách, v pivovarníctve, farmaceutickom priemysle a pod.

Vynález sa týka súpravy na stavenie bielkovín detekčnou technikou striebrom.

Súprava na farbenie striebrom, ktorú vyrába firma Bio-Rad (USA) pracuje na základe metodiky, ktorú opísal Merrill a spol. (Merrill C. R., Goldman D., Sedman S. A. a Ebert M. H.: Science 211, 1 437, 1981). Inú súpravu pod obchodným názvom GELCODE vyrábajú dve firmy v USA s určitými obmenami, avšak u oboch je postup odvodený z metodiky podľa Sammons (Ochs D. C., McConkey E. H. a Sammons D. W.: Electrophoresis 2, 304, 1981). Ani jedna z menovaných súprav nepoužíva strieborné ióny vo forme amoniakálneho komplexu.

Nevýhody doteraz vyrábaných súprav spočívajú hlavne v tom, že gél po spracovaní má pomerne intenzívne pozadie. Podľa firmných návodov pracovný postup trvá veľmi dlho alebo na dosiahnutie optimálneho zafarbenia autor jednej metodiky (Merrill C. R., Goldman D. a Van Keuren M. L.: Electrophoresis 3, 17, 1982) doporučuje po prvom farbení ešte dvakrát odfarbiť a farbenie znova zopakovať.

Uvedené nevýhody odstraňuje súprava na stanovenie bielkovín detekčnou technikou striebrom podľa vynálezu. Podstata vynálezu spočíva v tom, že súprava obsahuje oddelene zložky vo forme roztokov pre prípravu pracovných roztokov. Obsahuje metanol, kyselinu octovú, glutaraldehyd a vodu pre prípravu fixačno-vymývacieho roztoku, s výhodou v objemových pomeroch 50 : 12 : 38 : 0,25. Pre prípravu amoniakálneho strieborného komplexu ako farbiaceho roztoku súprava obsahuje vodný roztok hydroxidu sodného a hydroxidu draselného alebo ich zmes a roztok dusičnanu strieborného. Pre prípravu vymývacieho roztoku obsahuje roztok hydroxidu sodného s výhodou o koncentrácii 0,001 M pred použitím. Pre prípravu vývojky súprava obsahuje roztok kyseliny citrónovej, vodný roztok formaldehydu a vodu. Pre prípravu zastavovacieho kúpeľa súprava obsahuje roztok metanolu a roztok kyseliny citrónovej.

Výhody súpravy na stanovenie bielkovín podľa vynálezu spočívajú v tom, že aplikovaním jednotlivých roztokov pripravených podľa príkladu 1 a postupom podľa príkladu 2 sa obdrží gél s bielkovinami zafarbenými striebrom so zanedbateľným pozadím a celý pracovný postup trvá 160 minút.

Príklad 1

Príklad 1

Z koncentrovaných roztokov súpravy na stanovenie bielkovín detekčnou technikou striebrom sa pripravujú pracovné roztoky. a) Fixačno-vymývací roztok sa pripraví tak, že do 100 objemových dielov zmesi metanol, kyselina octová a voda v objemových pomeroch 50 : 12 : 38 sa pridá 1 objemový diel 25 % vodného roztoku glutaraldehydu. b) Roztok amoniakálneho strieborného komplexu sa pripraví pomalým zmiešavaním 5 objemových dielov roztoku zmesi 8,1 objemových dielov 17,3 % hydroxidu amónneho a 81,4 objemových dielov 0,14 M hydroxidu sodného s 1 objemovým dielom 20 % roztoku dusičnanu strieborného a zriedením tejto zmesi 60,7 objemovými dielmi deionizovanej vody a nasledujúcim filtrovaním. c) Vymývací roztok hydroxidu sodného sa pripraví 200-násobným zriedením roztoku 0,2 M hydroxidu sodného. d) Vývojka sa pripraví zmiešaním 0,1 objemového dielu 20 % roztoku kyseliny citrónovej, 400 objemových dielov vody a 0,4 objemových dielov 37 % vodného roztoku formaldehydu. e) Stop-kúpeľ sa pripraví zmiešaním 400 objemových dielov 20 %-ného metanolu s 1 objemovým dielom 20 % roztoku kyseliny citrónovej.

Príklad 2

Po skončení elektroforézy bielkovín v platňovom polyakrylamidovom géle, pri použití roztokov uvedených v príklade 1 sa gél vymýva 2 × 30 minút vo fixačno-vymývacom roztoku a preperie 3 krát 15 minút vodou. Na gél sa potom pôsobí 15 minút roztokom amoniakálneho strieborného komplexu. Gél sa ďalej vymýva vymývacím roztokom hydroxidu sodného 3 krát 10 minút a sa vyvoláva dovtedy, kým sa objavujú nové zóny bielkovín (cca 3 minúty). Vyvolávanie sa zastaví 10 minútovým práním v stop-kúpeli a nakoniec sa gél preperie 1 hodinu vodou. Takto pripravený gél sa použije na vyhodnotenie.

Vynález má využitie pri stanovení bielkovín v platňových polyakrylamidových géloch prítomných vo veľmi nízkej koncentrácii. Uplatní sa najmä v biochemických laboratóriách najrôznejšej špecializácie, klinických laboratóriách i v niektorých priemyslových odvetviach napr. v pivovarníctve, farmaceutickom priemysle a pod.

PREDMET VYNÁLEZU

1. Súprava na stanovenie bielkovín detekčnou technikou striebrom obsahujúca oddelené zložky vo forme roztokov pre prípravu pracovných roztokov, vyznačujúca sa tým, že obsahuje metanol, kyselinu octovú, glutaraldehyd a vodu pre prípravu fixačného vymývacieho roztoku, vodný roztok hydroxidu sodného a hydroxidu amónneho alebo ich zmesi a roztok dusičnanu strieborného pre prípravu amoniakálneho strieborného komplexu ako farbiaceho roztoku, roztok hydroxidu sodného pre prípravu vymývacieho roztoku, roztok kyseliny citrónovej, vodný roztok formaldehydu a vodu pre prípravu vývojky, roztok metanolu a roztok kyseliny citrónovej pre prípravu zastavovacieho kúpeľa.

2. Súprava na stanovenie bielkovín, podľa bodu 1, vyznačujúca sa tým, že fixačno-vymývací roztok obsahuje metanol, kyselinu octovú, vodu a glutaraldehyd v objemových pomeroch 50 : 12 : 38 : 0,25.

3. Súprava na stanovenie bielkovín, po-

dľa bodu 1, vyznačujúca sa tým, že farbiaci roztok pred použitím obsahuje amoniakálny strieborný komplex pripraviteľný zmiešaním 0,1 M roztoku hydroxidu sodného, 26 % roztoku hydroxidu amónneho, 20 % roztoku dusičnanu strieborného a vody v objemovom pomere 10 : 0,42 : 1,65 : 88.

4. Súprava na stanovenie bielkovín, podľa bodu 1, vyznačujúca sa tým, že vymývací roztok pred použitím má koncentráciu 0,001 M.

5. Súprava na stanovenie bielkovín, podľa bodu 1, vyznačujúca sa tým, že vývojka obsahuje 0,1 objemového dielu 20 % roztoku kyseliny citrónovej, 0,4 objemových dielov 37 % vodného roztoku formaldehydu a 400 objemových dielov vody.

6. Súprava na stanovenie bielkovín, podľa bodu 1, vyznačujúca sa tým, že zastavovací kúpeľ obsahuje 400 objemových dielov 20 % metanolu a 1 objemový diel 20 % roztoku kyseliny citrónovej.