



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004116635/15, 31.05.2004

(24) Дата начала действия патента: 31.05.2004

(45) Опубликовано: 27.12.2005 Бюл. № 36

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: Филиппович Ю.Б. и др. Практикум по общей биохимии. 2 изд. - М.: Просвещение, 1982, с.75-77. SU 1383201 A1, 23.03.1988. US 5693291 A, 02.12.1997. SU 805146 A1, 15.02.1981. RU 2178178 C1, 10.01.2002.

Адрес для переписки:

167982, г.Сыктывкар, ул. Коммунистическая,
 24, Коми научный центр УрО РАН, патентный
 отдел

(72) Автор(ы):

Донцов А.Г. (RU),
 Тарабукин Д.В. (RU)

(73) Патентообладатель(ли):

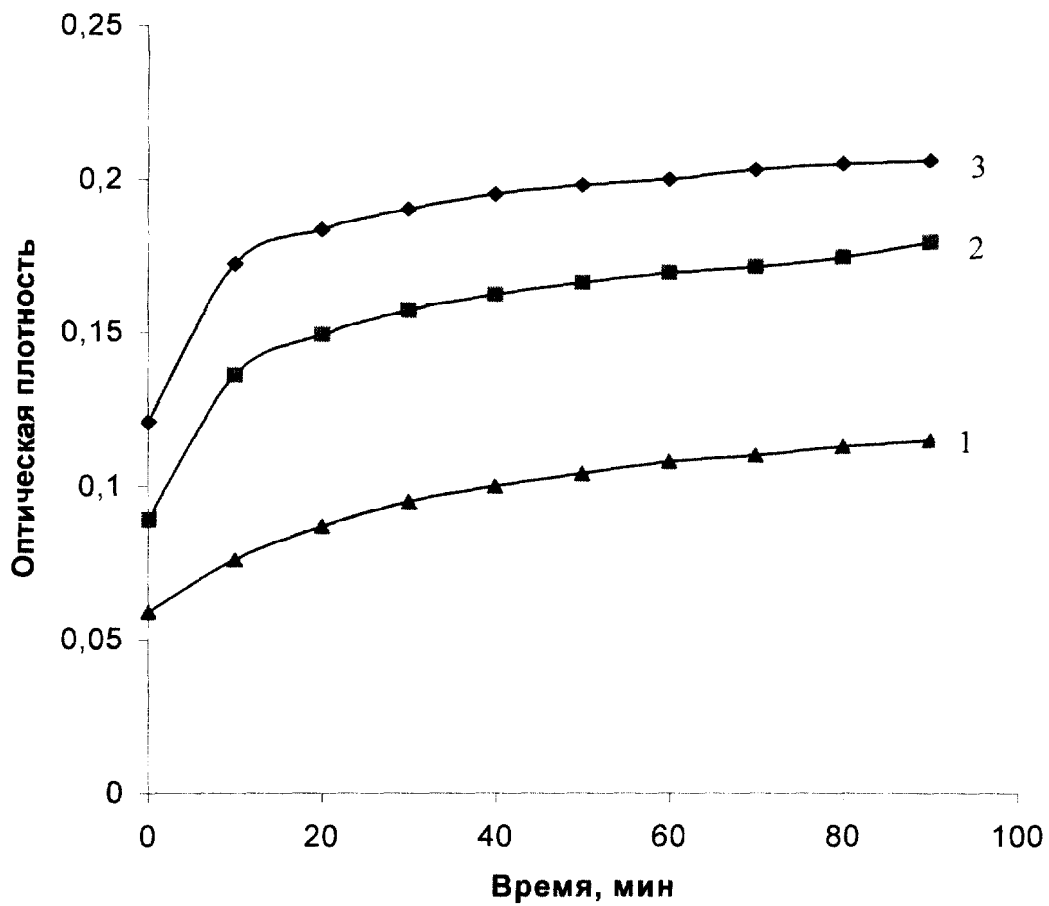
Институт биологии Коми научного центра
 Уральского отделения Российской академии
 наук (RU)

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА В РАСТВОРАХ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии и биотехнологии и может использоваться для ускоренного определения содержания белка в биологических жидкостях и ферментных растворах. Способ определения содержания белка в растворах включает обработку исследуемой пробы щелочным медьсодержащим реактивом, состоящим из 49 частей раствора А: 2%-ного карбоната натрия в 0,2 н. гидроксиде натрия и 1

части раствора В: 0,5%-ного медного купороса в 3,33%-ном тартрате натрия или калия, с последующим добавлением реактива Фолина и выдерживанием смеси в ультратермостате при температуре 50°C в течение 10 мин. Технический результат: изобретение позволяет снизить продолжительность анализа до 20 минут, а также увеличить чувствительность и воспроизводимость определений содержания белка в растворах по методу Лоури. 2 ил, 1 табл.



Изменение оптической плотности растворов при определении белка по методу Лоури: 1 - рН 9,0, 2 - рН 10,0, 3 - рН 11,0.

Фиг.1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2004116635/15, 31.05.2004**

(24) Effective date for property rights: **31.05.2004**

(45) Date of publication: **27.12.2005 Bull. 36**

Mail address:

**167982, g.Syktvykar, ul. Kommunisticheskaja,
24, Komi nauchnyj tsentr UrO RAN, patentnyj otdel**

(72) Inventor(s):

**Dontsov A.G. (RU),
Tarabukin D.V. (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Institut biologii Komi nauchnogo tsentra
Ural'skogo otdelenija Rossijskoj akademii
nauk (RU)**

(54) **DETERMINATION OF PROTEIN CONTENT IN SOLUTIONS**

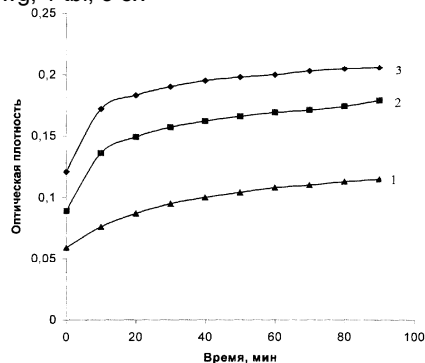
(57) Abstract:

FIELD: biochemistry, biotechnology.

SUBSTANCE: claimed method includes sample treatment with alkali copper-containing reagent comprising 49 pts of 2 % sodium carbonate solution in 2 N sodium hydroxide (A) and 1 pts of 0.5 % blue copper in 3.33 % sodium or potassium tartrate followed by addition of Folin's reagent and mixture conditioning in ultra-thermostat at 50°C for 10 min. Method of present invention allows reducing analysis time to 20 min and increasing sensitivity and reproducibility protein content determination by Lowry method.

EFFECT: accelerated method for determination of protein content in biological liquids and enzyme solutions.

2 dwg, 1 tbl, 3 ex



Изменение оптической плотности растворов при определении белка по методу Лоури: 1 - рН 9,0, 2 - рН 10,0, 3 - рН 11,0.

Фиг.1

Изобретение относится к области биохимии и биотехнологии и может использоваться для определения содержания белка в биологических жидкостях и ферментных растворах.

Известен способ определения содержания белка по методу Лоури (прототип), основанный на цветной реакции с тирозиновыми и цистеиновыми радикалами белковой молекулы, в результате которой происходит восстановление смеси фосфорно-вольфрамовой и фосфорно-молибденовой кислот с образованием комплексного соединения синего цвета. Протеканию указанной реакции способствуют комплексные соединения меди, возникшие при взаимодействии белка с щелочным раствором медного купороса. Для проведения анализа смешивают 49 частей раствора А (2%-ный карбонат натрия в 0,1 н. гидроксиде натрия) с 1 частью раствора В (0,5%-ный медный купорос в 3,33%-ном тартрате натрия или калия). Полученный щелочной медьсодержащий реактив добавляют в пропорции 4:1 к пробе, содержащей 10-100 мкг какого-либо белка, встряхивают и оставляют на 10 минут при комнатной температуре. Затем добавляют реактив Фолина в пропорции 1:10 к объему щелочного медьсодержащего реактива. При этом соотношение объемов пробы и реактивов составляет 1:4:0,4. Реакционную смесь энергично перемешивают и оставляют на 30-90 минут для развития окраски. Оптическую плотность определяют при длине волны 750 нм. Содержание белка в пробе устанавливают по калибровочному графику, построенному по растворам того же белка с точно известной концентрацией (Филиппович Ю.Б. и др. Практикум по общей биохимии. - 2-е изд., перераб. - М.: Просвещение, 1982. - С.75-77.).

Недостатком данного способа является большая продолжительность (до 100 минут), а также недостаточно высокие воспроизводимость, чувствительность, точность анализа и узкий линейный диапазон калибровочного графика (0-100 мкг/см³). Это связано с тем, что в условиях способа-прототипа цветная реакция протекает медленно и при неконтролируемых по времени выдержки измерениях (30-90 минут) возможно неполное развитие окраски раствора. В условиях способа-прототипа, т.е. при соотношении 10:1 объемов щелочного медьсодержащего реактива и реактива Фолина, достигается рН среды около 9,0, при этом, как показано на Фиг.1, наблюдаются наименьшие скорость развития окраски раствора и ее интенсивность.

Техническим результатом настоящего изобретения является увеличение экспрессности, чувствительности, воспроизводимости и точности определений содержания белка в растворах, а также расширение линейного диапазона калибровочного графика.

Технический результат достигается тем, что в ходе определений увеличивают концентрацию гидроксида натрия в растворе А до 0,2 н. при сохранении прежних объемов дозирования всех растворов или увеличивают объем щелочного медьсодержащего реактива до соотношения объемов пробы и реактивов 1:8:0,4, а оптическую плотность раствора определяют после его выдержки в течение 10 минут при температуре 50°C.

Увеличение концентрации гидроксида натрия в растворе А или объема используемого щелочного медьсодержащего реактива приводит к увеличению рН реакционной смеси до 11-12. Это способствует более полному развитию окраски (см. Фиг.1) и, как следствие, увеличению чувствительности и точности определений, а также расширению линейного диапазона калибровочного графика. Нагревание раствора после смешения реагентов в течение 10 минут при температуре 50°C приводит к увеличению скорости протекания цветной реакции, что способствует увеличению экспрессности и воспроизводимости анализа (см. Фиг.2).

Способ осуществляется следующим образом: к исследуемой пробе, содержащей 10-300 мкг какого-либо белка, добавляют щелочной медьсодержащий реактив (А+В) в пропорции 8:1 к объему пробы, встряхивают и оставляют на 10 минут при комнатной температуре, после чего добавляют реактив Фолина в пропорции 1:20 к объему щелочного медьсодержащего реактива. Соотношение объемов пробы и реактивов при этом составляет 1:8:0,4. Реакционную смесь энергично перемешивают и устанавливают в ультратермостат при температуре 50°C на 10 минут (по секундомеру). Оптическую плотность определяют после охлаждения реакционной смеси при длине волны 750 нм

относительно контрольного раствора, содержащего все реагенты, в тех же объемах, кроме пробы, вместо которой добавляют дистиллированную воду. Калибровочную кривую строят аналогичным образом по растворам того же самого белка с точно известной концентрацией.

5 При использовании раствора А с более высокой концентрацией гидроксида натрия (0,2 н.) способ осуществляют аналогичным образом, но щелочной медьсодержащий реактив (А+В) добавляют в пропорции 4:1 к объему пробы, а реактив Фолина добавляют в пропорции 1:10 к объему щелочного медьсодержащего реактива. Соотношение объемов пробы и реактивов при этом составляет 1:4:0,4.

10 Пример 1. Для проведения анализа смешивают 49 см³ раствора А (2%-ный карбонат натрия в 0,1 н. гидроксида натрия) с 1 см³ раствора В (0,5%-ный медный купорос в 3,33%-ном тартрате натрия или калия). К 1 см³ пробы, содержащей 10-300 мкг бычьего сывороточного альбумина (БСА), добавляют 8 см³ щелочного медьсодержащего реактива, встряхивают и оставляют на 10 минут при комнатной температуре. Затем добавляют 0,4
15 см³ реактива Фолина, энергично перемешивают и устанавливают смесь в ультратермостат при температуре 50°C на 10 минут (по секундомеру) для развития окраски. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и определяют оптическую плотность при длине волны 750 нм относительно контрольного раствора, содержащего все реагенты в
20 указанных количествах и дистиллированную воду вместо пробы. Содержание белка в пробе устанавливают по калибровочному графику, построенному аналогичным образом по растворам БСА с точно известной концентрацией. Коэффициенты калибровочного графика и результаты анализа раствора БСА с неизвестной концентрацией представлены в таблице 1.

25 Пример 2. Для проведения анализа смешивают 49 см³ раствора А (2%-ный карбонат натрия в 0,2 н. гидроксида натрия) с 1 см³ раствора В (0,5%-ный медный купорос в 3,33%-ном тартрате натрия или калия). К 1 см³ пробы, содержащей 10-300 мкг БСА, добавляют 4 см³ щелочного медьсодержащего реактива, встряхивают и оставляют на 10 минут при
30 комнатной температуре. Затем добавляют 0,4 см³ реактива Фолина, энергично перемешивают и устанавливают смесь в ультратермостат при температуре 50°C на 10 минут (по секундомеру) для развития окраски. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, доводят объем до 9,4 см³ (аналогично примеру 1) добавлением 4
35 см³ дистиллированной воды и определяют оптическую плотность при длине волны 750 нм относительно контрольного раствора, содержащего все реагенты в указанных количествах и дистиллированную воду вместо пробы. Содержание белка в пробе устанавливают по калибровочному графику, построенному аналогичным образом по растворам БСА с точно известной концентрацией. Коэффициенты калибровочного графика и результаты анализа
40 раствора БСА с неизвестной концентрацией представлены в таблице 1.

45 Пример 3 (по прототипу). Для проведения анализа смешивают 49 см³ раствора А (2%-ный карбонат натрия в 0,1 н. гидроксида натрия) с 1 см³ раствора В (0,5%-ный медный купорос в 3,33%-ном тартрате натрия или калия). К 1 см³ пробы, содержащей 10-100 мкг БСА, добавляют 4 см³ щелочного медьсодержащего реактива, встряхивают и оставляют на 10 минут при комнатной температуре. Затем добавляют 0,4 см³ реактива Фолина,
50 энергично перемешивают и оставляют на 90 минут для развития окраски. Доводят объем реакционной смеси до 9,4 см³ (аналогично примерам 1-2) добавлением 4 см³ дистиллированной воды и определяют оптическую плотность при длине волны 750 нм относительно контрольного раствора, содержащего все реагенты в указанных количествах и дистиллированную воду вместо пробы. Содержание белка в пробе устанавливают по калибровочному графику, построенному аналогичным образом по растворам БСА с точно известной концентрацией. Коэффициенты калибровочного графика и результаты анализа
55 раствора БСА с неизвестной концентрацией представлены в таблице 1.

Как видно из данных таблицы 1, предлагаемый способ позволяет снизить

продолжительность анализа в 5 раз и увеличить диапазон линейной зависимости оптической плотности от концентрации белка в растворе в 3 раза. Увеличение коэффициента пропорциональности k в уравнении прямой калибровочного графика способствует увеличению чувствительности определений, а снижение величин относительного стандартного отклонения S_n и доверительного интервала n приводит к увеличению воспроизводимости и точности определений по сравнению со способом-прототипом.

Таблица 1

№ п/п	Время анализа, мин.	Коэффициенты калибровочного графика		Диапазон линейности, мкг/см ³	Результаты определений, мкг/см ³	S_n , %	n , мкг/см ³
		k	b				
Пример 1	20	$1,95 \times 10^{-3}$	0	0-300	57,9	0,40	$\pm 0,3$
57,6							
57,4							
57,9							
Пример 2	20	$2,21 \times 10^{-3}$	0	0-300	57,4	0,31	$\pm 0,2$
57,5							
57,3							
57,7							
Пример 3 (прототип)	100	$1,47 \times 10^{-3}$	0	0-100	60,4	3,23	$\pm 2,4$
57,7							
61,1							
57,7							
* S_n - относительное стандартное отклонение ** n - доверительный интервал при $f=0,95$							

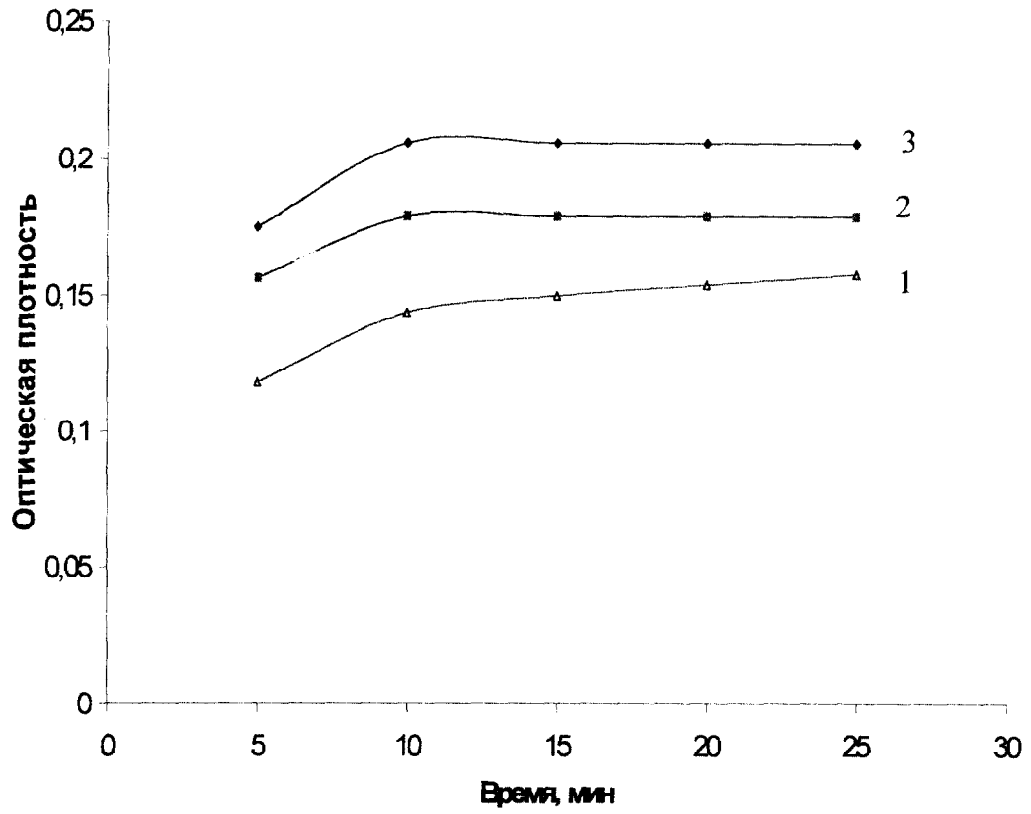
30 Формула изобретения

Способ определения содержания белка в растворах, включающий обработку исследуемой пробы щелочным медьсодержащим реактивом, состоящим из 49 частей раствора А: 2%-ного карбоната натрия в гидроксиде натрия и 1 части раствора В: 0,5%-ного медного купороса в 3,33%-ном тартрате натрия или калия с последующим добавлением реактива Фолина при соотношении объемов пробы и реактивов 1:4:0,4 и определением его оптической плотности при 750 нм, отличающийся тем, что используют раствор А с 0,2 н. концентрацией гидроксида натрия, а определение оптической плотности проводят после выдерживания реакционной смеси при температуре 50°C в течение 10 мин.

40

45

50



Изменение оптической плотности при определении белка по способу: температура 50 °С, время выдержки 10 минут, 1 - рН 9,0, 2 - рН 10,0, 3 - рН 11,0.

Фиг.2