

Изобретение относится к биохимии и может быть использовано как для научно-исследовательских работ, так и в клинико-биохимических лабораториях.

Известны различные способы выделения белков, например [1] способ выделения из сыворотки крови альбумина методом риванольного фракционирования, который заключается в том, что в сыворотку добавляют 15% раствор углекислого натрия. При постепенном перемешивании добавляют раствор риваноля. После отстаивания осадка и его промывания добавляют хлористый натрий, pH смеси доводят до 6,0 раствором уксусной кислоты при непрерывном перемешивании. Однако, данный способ очень громоздкий и с его помощью выделить термостабильный белок невозможно. Следует отметить, что в чистом виде термостабильные белки еще не выделялись, поэтому за прототип принят

косвенный способ определения термостабильных белков [2] электрофорезом в полиакриламидном геле, который заключается в том, что на сыворотку крови воздействуют температурой - 30-80°C с последующим фракционированием в полиакриламидном геле, причем сыворотку крови предварительно разводили раствором хлористого натрия. Однако, данный способ требует дорогостоящей аппаратуры, большие затраты времени и очень трудоемкой.

В основу изобретения поставлена задача усовершенствования способа выделения термостабильных белков из сыворотки крови, в котором за счет применения температуры 100°C, растворов хлористого натрия и ледяной уксусной кислоты обеспечивается получение чистых термостабильных белков, в результате чего уменьшаются материальные и временные затраты, а также упрощается способ выделения.

Поставленная задача решается тем, что в способе выделения термостабильных белков путем разбавления сыворотки хлористым натрием и нагревания, согласно изобретению, к сыворотке добавляют 0,02 М раствор хлористого натрия в соотношении 1:6 и равный сыворотке объем ледяной уксусной кислоты, концентрация которой в каждой пробе постепенно уменьшается от 0,27 М до 0,06 М, после чего смесь помещают на водяную баню при температуре +100°C и центрифугируют с дальнейшим определением порога осаджения белка - пробу, в которой появился осадок, по отношению к той, в которой его нет.

Необходимо отметить, что чем выше концентрация хлористого натрия, тем больше концентрация ледяной уксусной кислоты при которой осаждаются белки крови и, следовательно, выше порог осаджения.

Например, при разбавлении сыворотки крови доноров 1:6 0,15 М раствором хлористого натрия с последующим добавлением равного сыворотке количества ледяной уксусной кислоты приводит к резкому повышению порога осаджения, так как осаджение белков сыворотки, после воздействия температурой 100°C, происходит при концентрации ледяной уксусной кислоты 0,66 М - 0,69 М. Напротив, уменьшение концентрации хлористого натрия в пробе приводит к снижению порога осаджения. Так сыворотка крови доноров разбавленная 0,07 М раствором хлористого натрия, осаждается при добавлении ледяной уксусной кислоты концентрацией 0,29 М - 0,33 М, а разбавление сыворотки 0,02 М раствором хлористого натрия, позволяет осадить белки при концентрации уксусной кислоты 0,17 М - 0,20 М. Разведение сыворотки крови дистиллированной водой еще больше позволяет снизить порог осаджения, однако, при этом теряется специфичность метода при различной патологии. При концентрации хлористого натрия 0,02 М специфичность сохраняется и заметно упрощается методика, так как для ее выполнения не требуется больших затрат времени и сыворотки крови.

Воздействие на сыворотку крови температурой ниже 100°C приводит к тому, что она превращается в желеобразное состояние, что согласуется с данными литературы (Ф.С.Околов, 1959) и получить надосажок путем центрифугирования практически не удается даже при 8000 об/мин.

Разбавление сыворотки крови меньше чем в 8 раз также затрудняет отделить надосажок, а больше чем в 8 раз приводит к снижению концентрации термостабильных белков в надосаточной жидкости и специфичности метода.

Таким образом, наши исследования показали, что оптимальным вариантом при разработке методики является применение 0,02 М раствора хлористого натрия, температуры 100°C и разбавление сыворотки в 8 раз.

При осуществлении способа к 13 пробам сыворотки крови добавляют 0,02 М раствор хлористого натрия в соотношении 1:6, а затем в 1-ю пробу добавляют равный сыворотке объем 0,06 М, во 2-ю - 0,08 М, в 3-ю - 0,10 М, в 4-ю - 0,12 М, в 5-ю - 0,13 М, в 6-ю - 0,15 М, в 7-ю - 0,17 М, в 8-ю - 0,19 М, в 9-ю - 0,20 М, в 10-ю - 0,22 М, в 11-ю - 0,24 М, в 12-ю - 0,26 М, в 13-ю - 0,27 М раствор ледяной уксусной кислоты, пробы на 5 минут помещают на кипящую водяную баню и центрифугируют 30 минут при 3000 об/мин. Визуально определяют порог осаджения. В надосаточной жидкости этой пробы содержится максимальное количество выделенных термостабильных белков, которые можно определить одним из общепринятых методов определения белка в биологических жидкостях.

С целью экономии сыворотки крови способ можно осуществить следующим образом: к сыворотке крови прибавляют 0,02 М раствор хлористого натрия в соотношении 1:6, и равный сыворотке объем 0,17 М раствора ледяной уксусной кислоты. Пробу помещают на 5 минут на кипящую водяную баню и центрифугируют 15 минут при 3000 об/мин. Визуально определяют наличие осадка. Если осадок в данной пробе появился, тогда к 6 пробам сыворотки крови прибавляют 0,02 М раствор хлористого натрия в соотношении 1:6 и равный сыворотке объем ледяной уксусной кислоты в 1-ю - 0,19 М, во 2-ю - 0,20 М, в 3-ю - 0,22 М, в 4-ю - 0,24 М, в 5-ю - 0,26 М, в 6-ю - 0,27 М растворы. Если осадка нет, тогда в 6 проб сыворотки крови с хлористым натрием добавляют ледяную уксусную кислоту в концентрации в 1-ю пробу 0,06 М, во 2-ю - 0,08 М, в 4-ю - 0,10 М, в 4-ю - 0,12 М, в 5-ю - 0,13 М, в 6-ю - 0,15 М раствора. Пробы помещают на 5 минут на кипящую водяную баню и центрифугируют 30 минут при 3000 об/мин. Находят порог осадения и в надосаточной жидкости определяют концентрацию белка.

Учитывая, что при патологических состояниях изменяется порог осадения (с 0,19-0,20 М у доноров до 0,06 М при шоке и 0,27 М при сепсисе) и концентрация термостабильных белков (соответственно с $9,6 \pm 0,09$ г/л до $3,8 \pm 0,27$ г/л, и $34,5 \pm 5,7$ г/л) данное изобретение можно использовать не только для выделения термостабильных белков, а и для диагностических целей в практическом здравоохранении.

Предлагаемый способ позволяет относительно быстро (в течении 1,0-1,5 часа) с высокой степенью точности выделить из крови термостабильные белки и определить их концентрацию.