



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **107915**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 12897**

(22) Дата подання заявки: **28.12.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **24.06.2016**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **24.06.2016, Бюл.№ 12**

(72) Винахідник(и):

**Фалько Оксана Валеріївна (UA),
Дюбко Тетяна Станіславівна (UA),
Прокопюк Ольга Степанівна (UA),
Ліпіна Ольга Василівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І
КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,
вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015
(UA)**

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ СТАНУ БІЛКІВ У КРІОКОНСЕРВОВАНОМУ БІОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ

(57) Реферат:

Спосіб оцінки стану білків у кріоконсервованому біологічному матеріалі, який включає отримання набору спектрів і порівняння їх зі спектрами нативного матеріалу. Отримують набір синхронних спектрів флуоресценції, далі за допомогою програмного забезпечення одержують тривимірні спектри в координатах $\Delta\lambda$, $(\lambda_{\text{фл.}})$, $(I_{\text{фл.}})$, на основі аналізу яких роблять висновок про стан білків.

UA 107915 U

Корисна модель належить до галузі кріобіології і кріомедицини, і може бути використана у роботі низькотемпературних банків для проведення експрес-оцінки збереженості біологічного матеріалу.

Біологічну активність екстрактів тканин плаценти, сироватки і плазми плацентарної крові та подібних біоматеріалів забезпечують гормони, ферменти, фактори росту та інші біологічно активні речовини, які за своєю природою є білками. При заморожуванні - відігріві, а також при тривалому низькотемпературному зберіганні саме білки та їх комплекси з іншими класами сполук піддаються деградації, що впливає на біологічний потенціал матеріалу [1]. Тому оцінку стану білків можна використовувати як критерій збереженості біологічного матеріалу у цілому.

Відомий спосіб оцінки стану білків у кріоконсервованому біологічному матеріалі, який включає розділення білків за молекулярною масою методом електрофорезу, визначення відносного вмісту білка і оцінку кількості діамід-індукованих агрегатів. На основі отриманих даних роблять висновок про стан білків у біологічному матеріалі [2].

Недоліком цього способу є те, що він є довготривалим (понад 12 годин) і потребує використання дорогих реагентів, що не дозволяє використовувати його як експрес-метод.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб оцінки стану білків у кріоконсервованому біологічному матеріалі, який включає фракціонування білкових макромолекул по їх розміру шляхом пропускання через хроматографічний гель, отримання набору спектрів поглинання білків при довжині хвилі 280 нм, визначення відносного вмісту білка в отриманих фракціях, будування хроматограм і їх порівняння з хроматограмами білків нативного матеріалу. На основі отриманих даних роблять висновок про стан білків у кріоконсервованому біоматеріалі [3].

Недоліками цього способу є його низька інформативність і довготривалість (10-12 годин). Низька інформативність пов'язана з тим, що спосіб дозволяє оцінити стан білків тільки в ультрафіолетовій області спектра (280 нм). Довготривалість обумовлена складністю отримання і обробки результатів. Вказані недоліки не дозволяють використовувати цей спосіб як експрес-метод оцінки стану білків у кріоконсервованому біоматеріалі.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити такий спосіб оцінки стану білків у кріоконсервованому біологічному матеріалі, який би забезпечив можливість одержувати більш повну інформацію про стан білків при одночасному скороченні часу дослідження, що дозволить використовувати цей спосіб для проведення експрес-аналізу біологічного матеріалу після кріоконсервування.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі оцінки стану білків у кріоконсервованому біологічному матеріалі, який включає отримання набору спектрів і порівняння їх зі спектрами нативного матеріалу, згідно з корисною моделлю, отримують набір синхронних спектрів флуоресценції, далі за допомогою програмного забезпечення одержують тривимірні спектри в координатах $\Delta\lambda$, $(\lambda_{\text{фл.}})$, $(I_{\text{фл.}})$, на основі аналізу яких роблять висновок про стан білків.

Реєстрація набору синхронних спектрів флуоресценції і використання тривимірних спектрів флуоресценції дозволяє одночасно вимірювати довжину хвиль збуджуючого і реєструючого випромінювань білками у широкому спектральному діапазоні. Отримання результатів у вигляді тривимірних спектрів дозволяє швидко і з високим рівнем інформативності провести аналіз стану білків у кріоконсервованому біоматеріалі. Відсутність етапу фракціонування білків значно зменшує час вимірювання, а використання програмного забезпечення час обробки і отримання результатів. Весь процес дослідження триває лише 5-15 хв. Це дозволяє використовувати спосіб як експрес-метод оцінки стану білків. Крім того спосіб дозволяє отримувати інформацію у спрощеному і зручному вигляді, що є принципово важливим для створення і розширення бази даних в низькотемпературних банках.

Ефективність способу ілюструється прикладом:

Визначення стану білків сироватки плацентарної крові людини (СПКЛ) проводили після її заморожування до -20°C і наступного відігріву, а також після її зберігання при цій температурі протягом 12 місяців. Дослідження проводили за допомогою спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian). Зразки СПКЛ розводили 0,9 % розчином хлориду натрію (рН 7,4) у об'ємному співвідношенні 1:40, після чого переносили у кварцову кювету $1\times 1\times 3$ см. Реєстрацію набору синхронних спектрів флуоресценції виконували при 20°C шляхом одночасного сканування монохроматорів збудження і флуоресценції у діапазоні хвиль від 200 до 650 нм при постійному зсуві монохроматорів з кроком 10 нм. Після цього будували тривимірні спектри флуоресценції в координатах $\Delta\lambda$, $(\lambda_{\text{фл.}})$, $(I_{\text{фл.}})$, використовуючи програмне забезпечення Cary Eclipse.

Результати наведені на фіг. 1-3. На фіг. 1 представлені тривимірні спектри флуоресценції нативної СПКЛ, які мали вигляд областей овальної форми з локалізацією при 235-325 нм і з центром при 290-292 нм.

На фіг. 2 представлені тривимірні спектри флуоресценції СПКЛ, отримані після заморожування до -20°C з наступним відігрівом при 37°C , а на фіг. 3 - тривимірні спектри флуоресценції отримані після зберігання СПКЛ при -20°C протягом 12 місяців. Заморожування СПКЛ до -20°C і її зберігання при цій температурі протягом 12 місяців призводило до зниження загальної інтенсивності флуоресценції білків, короткохвильового зміщення і звужування локалізації областей і зміни їх форми, зростання розділення і розмиття зображення (фіг. 2, 3). Такі зміни спектральних характеристик обумовлені денатурацією і окисленням частини білків СПКЛ і супроводжуються зниженням інтенсивності флуоресценції і зміщенням положення триптофаної флуоресценції білків СПКЛ [4].

Таким чином, зміна параметрів тривимірних спектрів флуоресценції вказує на те, що в результаті кріоконсервування СПКЛ при помірно низьких температурах відбувається зміна стану білків СПКЛ.

Джерела інформації:

1. Cao E., et al. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. // *Biotechnology and Bioengineering*. - 2003. - Vol. 82, № 6. - P. 684-690.

2. Falko O.V., et al Modification of Placental Blood Serum Proteins Induced by Low Temperatures Biochemistry. Supplement Series Biomedical Chemistry. - 2012. - Vol. 6, № 2. - P. 194-202.

3. Фалько О.В. и др Влияние режимов замораживания и сроков низкотемпературного хранения на сохранность белков сыворотки плацентарной крови. // *Материалы Международной научно-практической конференции "Практико-ориентированные биотехнологические исследования в растениеводстве, животноводстве и медицине"*. - 2013. - С. 120-123.

4. Burstein E.A., Vedenkina N.S., Ivkova M.N. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. // *Photochemistry and Photobiology*. - 1973. - Vol. 18, № 1. - P. 263-279.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб оцінки стану білків у кріоконсервованому біологічному матеріалі, який включає отримання набору спектрів і порівняння їх зі спектрами нативного матеріалу, який відрізняється тим, що отримують набір синхронних спектрів флуоресценції, далі за допомогою програмного забезпечення одержують тривимірні спектри в координатах $\Delta\lambda$, $(\lambda_{\text{фл.}})$, $(I_{\text{фл.}})$, на основі аналізу яких роблять висновок про стан білків.



Фіг. 1

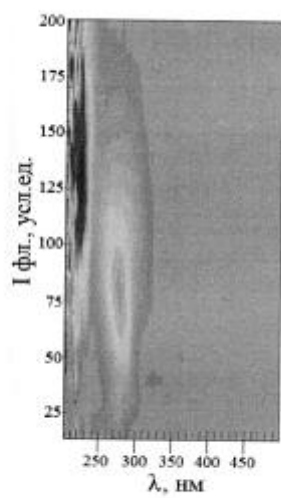


Fig. 2

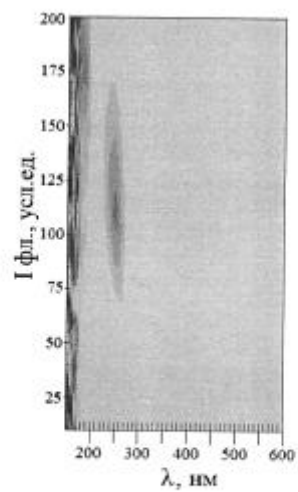


Fig. 3

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601