



УКРАЇНА

(19) UA (11) 57591 (13) U
(51) МПК (2011.01)
G01N 21/64

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ БІЛКІВ

1

(21) u201008101

(22) 29.06.2010

(24) 10.03.2011

(46) 10.03.2011, Бюл.№ 5, 2011 р.

(72) ЛЕОНЕНКО ІННА ІГОРІВНА, АЛЕКСАНДРОВА ДАР'Я ІГОРІВНА, ЄГОРОВА АЛЛА ВОЛОДИМИРІВНА, УКРАЇНЕЦЬ ІГОР ВАСИЛЬОВИЧ, АНТОНОВИЧ ВАЛЕРІЙ ПАВЛОВИЧ

(73) ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. О.В. БОГАТСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб кількісного визначення білків, що включає приготування проби для аналізу, взаємо-

2

дію її з розчинами хлориду тербію і органічного реагенту при заданому рН, опромінювання утвореної системи УФ-світлом та вимірювання інтенсивності люмінесценції реакційного розчину при $\lambda_{\text{еміс}} = 545$ нм, який відрізняється тим, що як органічний реагент використовують розчин 6-[(1-гідрокси-3-оксо-6,7-дигідро-3Н,5Н-піридо[3,2,1-іj]хінолін-2-карбоніл)-аміно]-гексанової кислоти при рН 7,5-8,0, а опромінювання проводять УФ-світлом при $\lambda_{\text{збудж}} = 300$ нм.

Корисна модель належить до аналітичної хімії, зокрема до люмінесцентного визначення біологічно-активних речовин - білків (бичачий сироватковий альбумін - БСА, сироватковий альбумін людини - САЛ, імуноглобулін G - IgG).

Лантанідні комплекси широко вживають як люмінесцентні зонди для визначення органічних сполук (зокрема лікарських препаратів), нуклеїнових кислот та в імунофлуоресцентному аналізі. Люмінесценція у цих комплексах є результатом ефективної внутрішньомолекулярної передачі енергії від органічної частини молекули до іону лантаніду. Основними вимогами до комплексних сполук лантанідів для їх вживання як зонди в біоаналізі є: високий квантовий вихід, висока кінетична стабільність, добра розчинність у воді при оптимальних фізіологічних значеннях рН. Ефективність застосування таких комплексів як аналітичних форм в біоаналітичній хімії обумовлена їх вузькими емісійними смугами, можливістю усунення впливу біологічної матриці на аналітичний сигнал.

Білки, необхідні складові всіх живих організмів, відіграють важливу роль у процесах життєдіяльності, тому їх вивчення та визначення є актуальним.

При опромінюванні світлом білки проявляють власну люмінесценцію. У зв'язку з низькою ефективністю збудження, інтенсивність такої люмінесценції незначна, що не дозволяє використовувати її для високочутливого визначення.

Тому актуальна задача підвищення чутливості визначення білків завдяки застосуванню люмінесцентних зондів (іонів металів, органічних барвни-

ків, комплексів металів), люмінесценція котрих значно змінюється при взаємодії з білками (збільшується або гаситься).

Відомий спосіб, який полягає у збільшенні інтенсивності люмінесценції ($I_{\text{люм}}$) комплексу європію з доксицикліном (ДЦ) в лужному буферному розчині (рН=10,2) при додаванні сироваткового альбуміну людини (див. Jiang C., Luo L. Spectrofluorimetric determination of human serum albumin using a doxycycline - europium probe // Anal. Chim. Acta. - 2004. - V. 506. - P. 171-175.). Спосіб передбачає додавання компонентів у наступній послідовності: іонів Eu^{3+} ($1,6 \times 10^{-6}$ моль/л); ДЦ ($1,6 \times 10^{-6}$ моль/л); САЛ (0,0-9,2 мкг/мл) та амонійного буферного розчину (рН=10,2). Далі цю суміш залишають на 40 хвилин і потім реєструють $I_{\text{люм}}$ при $\lambda_{\text{збудж}} = 385$ нм та $\lambda_{\text{еміс}} = 612$ нм, межа виявлення 64,0 нг/мл.

Недоліками даного способу є: залежність люмінесцентного сигналу від часу реагування компонентів системи, що свідчить про недостатню стійкість комплексу, у зв'язку з чим визначення $I_{\text{люм}}$ необхідно вести при фіксованому часі (40 хвилин), а також використання сильно лужного середовища (рН=10,2), що не є годним для біоб'єктів, для яких необхідне фізіологічне значення рН.

Найбільш близьким є спосіб люмінесцентного визначення сироваткового альбуміну людини (див.

(19) UA (11) 57591 (13) U

Wu X., Zheng J., Guo Ch.Y., Yang J., Ding H., Zh. Hu, Li Chao. Determination of albumins by its quenching effect on the fluorescence of Tb^{3+} -oxolinic acid complex in presence of sodium dodecyl sulphate // J. Luminescence. - 2007. - V. 126. - P. 171-176), в якому до розчину хлориду тербію (6×10^{-6} моль/л) додають розчин оксолінової кислоти (ОК) (1×10^{-5} моль/л), САЛ (0,1-10,0 мкг/мл), додецилсульфат натрію (4×10^{-4} моль/л), ацетатно-аміачний буферний розчин pH=6,0, перемішують, залишають на 25 хвилин, записують люмінесценцію при $\lambda_{збдж} = 360$ нм та $\lambda_{еміс} = 545$ нм. Інтенсивність люмінесценції комплексу тербію з ОК зменшується у 3 рази в присутності 10 мкг/мл САЛ (це максимальна концентрація з інтервалу лінійності), але тільки у присутності додецилсульфату натрію, котрий теж значно гасить люмінесценцію комплексу (у 2 рази). Межа виявлення САЛ в цьому способі декларована авторами на рівні 25 нг/мл. Цей спосіб визначення білків застосовує гасіння люмінесценції зонду (комплексу тербію з ОК) в присутності додецилсульфату натрію при додаванні білків.

Даний спосіб обрано прототипом: Прототип та спосіб, що заявляється, мають такі спільні ознаки:

- приготування проби;
- взаємодію білка з розчином комплексу хлориду тербію з відповідним органічним реагентом при заданому pH водного середовища;
- опромінювання утвореної потрійної системи УФ світлом;
- вимірювання інтенсивності люмінесценції розчину при $\lambda_{еміс} = 545$ нм.

Але спосіб за прототипом вимагає використання міцелярного середовища, яке створюють додаванням поверхнево-активної речовини (ПАР) - додецилсульфату натрію (який теж є гасником $I_{\text{люм}}$ зонду), що призводить до ускладнення системи, а також до необхідності залишати аналізований розчин на 25 хвилин для одержання максимального сигналу ($I_{\text{люм}}$).

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб кількісного визначення білків за ефектом гасіння люмінесценції комплексної сполуки тербію, в якому шляхом використання нового органічного реагенту забезпечується просте та швидке визначення білків.

Поставлена задача вирішена в способі визначення білків, що передбачає приготування проби для аналізу, взаємодію її з розчинами хлориду тербію і органічного реагенту при заданому pH, опромінювання утвореної системи УФ-світлом та вимірювання інтенсивності люмінесценції, тим, що як органічний реагент використовують 6-[(1-гідрокси-3-оксо-6,7-дигідро-3Н,5Н-піридо[3,2,1-іj]хінолін-2-карбоніл)-аміно]-гексанову кислоту (L) при pH 7,5-8,0, а опромінювання проводять УФ світлом при $\lambda_{збдж} = 300$ нм.

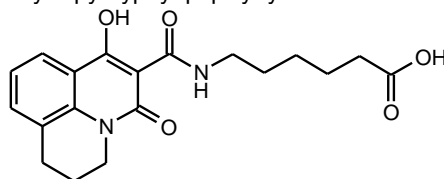
Новим у корисній моделі, що заявляється, є наявність наступних ознак:

- як органічний ліганд використовують 6-[(1-гідрокси-3-оксо-6,7-дигідро-3Н,5Н-піридо[3,2,1-іj]хінолін-2-карбоніл)-аміно]-гексанову кислоту;
- опромінювання утвореної системи Tb(III)-L-білок УФ-світлом з $\lambda_{збдж} = 300$ нм.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю суттєвих ознак, що заявляються, і технічним результатом, що досягається, полягає в наступному:

- високий квантовий вихід ($Q = 0,31$) водного розчину комплексної сполуки тербію з наведеним органічним лігандом дозволяє зменшити кількість реагентів та уникнути використання міцелярного середовища;
- зменшити час визначення білків.

Визначення стало можливим завдяки використанню нового люмінесцентного зонду - комплексу тербію з новим лігандом 6-[(1-гідрокси-3-оксо-6,7-дигідро-3Н,5Н-піридо[3,2,1-іj]хінолін-2-карбоніл)-аміно]-гексановою кислотою (див. Kuttyrev A., Kappe T. Methanetricarboxylates as key reagents for the simple preparation of heteroarylcarboxamides with potential biological activity. Part 1. Reaction of methanetricarboxylates with indoline and 1,2,3,4-tetrahydroquinoline // J. Heterocycl. Chem. 1997, V. 34, № 3, P. 969-972). Це можна пояснити наступним. Органічний ліганд відноситься до похідних 2-оксо-4-гідрокси-хінолінкарбонової кислоти і має таку структурну формулу:



Обробка стандартного розчину солі тербію водним розчином реагенту також, як і у випадку прототипу, посилює люмінесценцію тербію, але без використання ПАР. Цей реагент має в ультрафіолетовій області спектру смуги поглинання з високими молярними коефіцієнтами екстинкції ($\epsilon_{334} = 5100 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$;

$$\epsilon_{293} = 19900 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1};$$

$\epsilon_{236} = 49200 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), що обумовлює ефективне поглинання енергії збудження. Ця енергія передається з триплетного рівня ліганду ($E_T = 22000 \text{ см}^{-1}$) на енергетичний рівень Tb^{3+} ($E^5D_4 = 20500 \text{ см}^{-1}$), що призводить до значного зростання $I_{\text{люм}}$ тербію.

Взаємодія білків з люмінесцентним зондом - комплексом Tb(III)-L відбувається при pH 4,0-11,0, максимум люмінесценції спостерігається при pH 7,5-8,0 (див. Фіг. 1, де наведено залежність інтенсивності люмінесценції (відносних одиниць - відн. од.) системи Tb-L-БСА від pH розчину ($C_{Tb(III)} = C_L = 1 \times 10^{-6}$ моль/л; $C_{БСА} = 5$ мкг/мл)). У запропонованому способі для утворення оптимального pH середовища використовується 40 % уротропиновий розчин (pH=8,0).

Максимальний ефект гасіння спостерігається при співвідношенні Tb : L = 1:1, оптимальна концентрація іонів Tb³⁺ та реагенту становить 1×10^{-6} моль/л (див. Фіг. 2, де наведено залежність інтенсивності люмінесценції (відн. од.) системи Tb(III)-L-BCA від концентрацій L (а) та Tb(III) (б) ($C_{BCA} = 20$ мкг/мл)). Необхідний час для реагування компонентів системи Tb(III)-L-BCA та досягнення оптимального аналітичного сигналу становить 5 хвилин. Далі інтенсивність люмінесценції залишається постійною протягом 2 годин (див. Фіг. 3, де наведено залежність інтенсивності люмінесценції (відн. од.) системи Tb(III)-L-BCA від часу реагування компонентів ($C_{Tb} = C_L = 1 \times 10^{-6}$ моль/л; $C_{BCA} = 20$ мкг/мл). Гасіння $I_{\text{люм}}$ тербію в комплексі Tb(III)-L-білок спостерігається при опромінюванні утвореного комплексу УФ-світлом з $\lambda_{\text{збудж}} = 300$ нм (див. Фіг. 4, де наведено спектри люмінесценції комплексу Tb(III)-L в присутності різних концентрацій BCA (а), САЧ (б), IgG (в) ($C_{Tb} = C_L = 1 \times 10^{-6}$ моль/л; $C_{\text{Білка}} = 0,1 - 70,0$ мкг/мл)). Інтенсивність люмінесценції тербію в системах Tb(III)-L-білок пропорційна в інтервалі концентрацій BCA - 0,1-40,0 мкг/мл; САЧ - 0,1-40,0 мкг/мл; IgG - 0,1-70,0 мкг/мл (див. Фіг. 5, де наведено градувальні графіки у координатах Штерна-Фольмера для визначення BCA (а), САЧ (б), IgG (в) ($C_{Tb} = C_L = 1 \times 10^{-6}$ моль/л)).

Також встановлено, що при додаванні різних концентрацій білків час життя збудженого стану іонів тербію не змінюється. Для прикладу наведені криві затухання люмінесценції комплексу Tb(III)-L у присутності різних концентрацій BCA (див. Фіг. 6, де наведено криві затухання люмінесценції комплексу Tb(III)-L ($C_{Tb} = C_L = 1 \times 10^{-6}$ моль/л) у присутності різних концентрацій BCA (мкг/мл): 1 - 0; 2 - 0,5; 3 - 1,0; 4 - 2,0; 5 - 5,0).

Висунуто припущення щодо змішаного механізму гасіння: статичного, пов'язаного з утворенням систем Tb(III)-L-білок, та динамічного, обумовленого зіткненням молекул зонду та гасників у збудженому стані. При цьому спостерігається характерна в таких випадках особливість графіку Штерна-Фольмера - відхилення вгору та вгнутість по від-

ношенню до осі y (див. Lakowicz J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York: Plenum, 1986).

Приклад.

Визначення проводили на модельних розчинах шляхом введення відомої кількості білків. Кількісне визначення білків проводили за градувальним графіком.

Градувальний графік будують наступним чином: у мірні колби місткістю 10 мл вносять по 0,01; 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60; 0,70; 0,80; 0,90; 1,00; 1,20; 1,30; 1,50; 1,80; 2,00; 2,50; 3,00; 3,50; 4,00; 5,00; 6,00; 6,50; 7,00 мл робочого розчину BCA (САЛ, IgG) (100 мкг/мл) (5 паралельних вимірів). В кожен колбу додають по 1,0 мл 1×10^{-5} моль/л розчину хлориду тербію, 1,0 мл 1×10^{-5} моль/л розчину L, 0,4 мл 40 %-ного розчину уротропіну. Доводять водою до 10,0 мл та перемішують. Паралельно готують розчин контрольної проби, який містить усі компоненти, крім білків. Через 5 хв. вимірюють інтенсивність люмінесценції за $\lambda_{\text{еміс}} = 545$ нм ($\lambda_{\text{збудж}} = 300$ нм) у кожній точці (I) та інтенсивність люмінесценції контрольної проби (I_0).

За допомогою одержаних результатів будують градувальний графік залежності I_0 / I від концентрації білків (мкг/мл) у координатах Штерна-Фольмера (див. Фіг. 4, а,б,в) в інтервалі концентрацій білків 0,1-70,0 мкг/мл.

Методика

У мірні колби місткістю 10 мл вносять по 1,0 мл робочих розчинів хлоридів калію, натрію, кальцію та глюкози (1×10^{-4} моль/л); по 0,5 мл робочого розчину L-аланіну (1×10^{-4} моль/л), додають по 0,5; 2,0; 5,0 мл робочого розчину BCA (САЛ, IgG) (100 мкг/мл) (5 паралельних вимірів). Далі додають усі реактиви та проводять вимірювання як у випадку градувального графіка. Результати визначення білків в модельних розчинах представлено в таблиці.

Таблиця

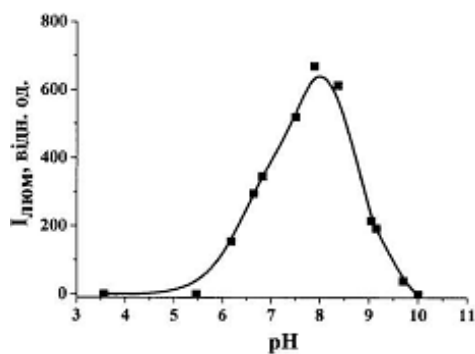
Результати визначення білків методом "введено - знайдено" (n=5; P=0,95)

Білок	Сторонні речовини	Введено білка, мкг/мл	Знайдено білка, мкг/мі	S_r
BCA	Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , глюкоза, L-аланін	5,0	5,2±0,3	0,048
		20,0	19,4±0,5	0,022
САЛ	Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , глюкоза, L-аланін	5,0	4,9±0,3	0,046
		50,0	50,6±1,4	0,023
IgG	Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , глюкоза, L-аланін	5,0	5,2±0,3	0,049
		20,0	20,6±0,5	0,019

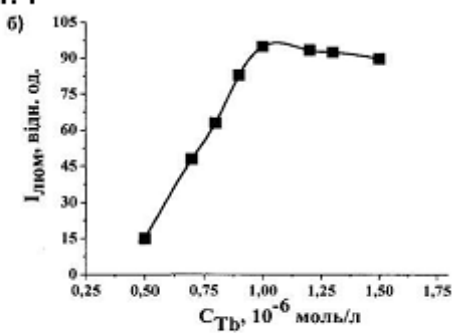
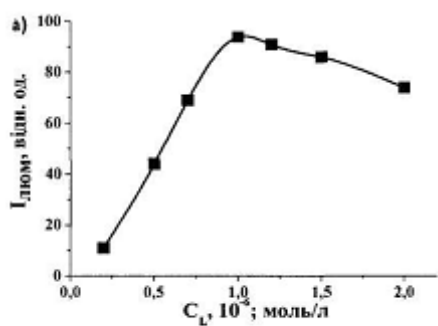
$$C_{\text{Me}}^{n+} = 1 \times 10^{-5} \text{ моль/л; } C_{\text{Глюкоза}} = 1 \times 10^{-5} \text{ моль/л; } C_{\text{L-Аланін}} = 5 \times 10^{-6}$$

Точність і правильність визначення білків у розчинах перевірені методом "введено - знайдено". При $n=5$; $P=0,95$ відносне стандартне відхилення (s_r) складає 0,019-0,049.

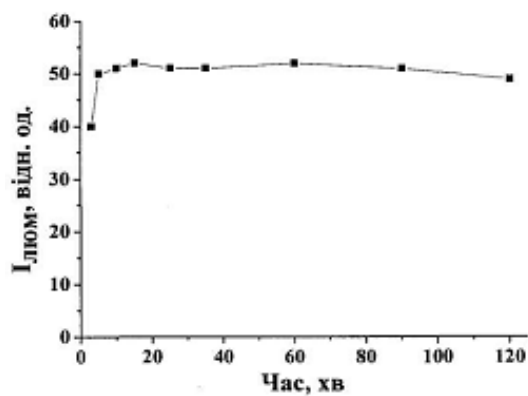
Таким чином, спосіб, що заявляється, дозволяє забезпечити достатню чутливість та збіжність визначення білків та прискорити проведення аналізу у 4-5 разів.



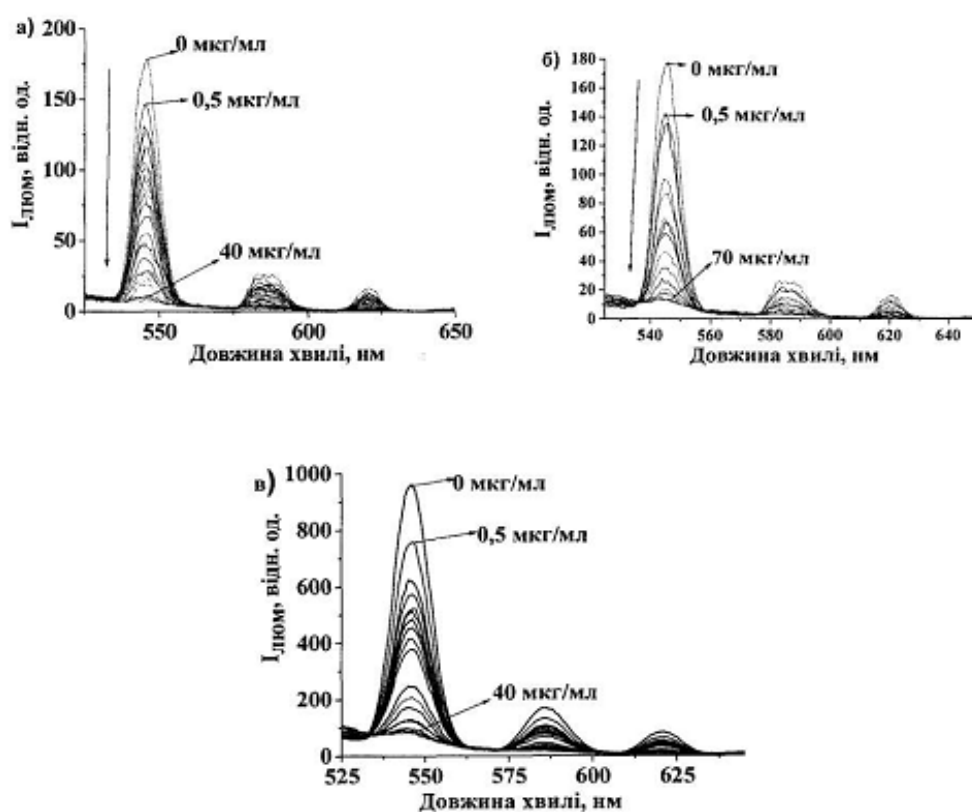
Фіг. 1



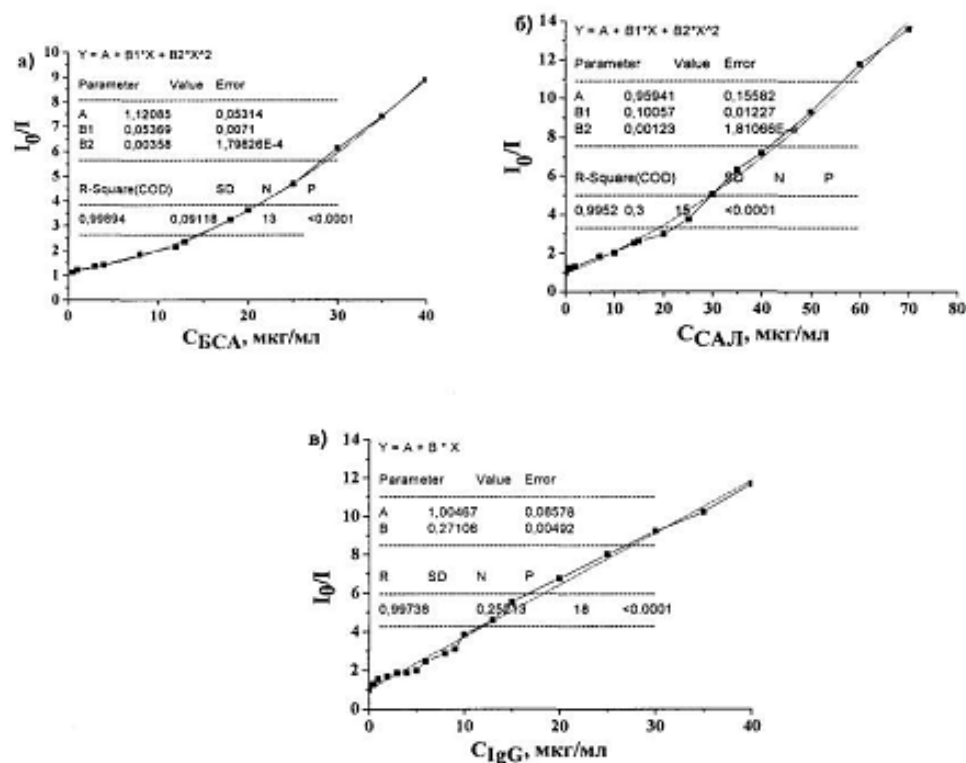
Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5

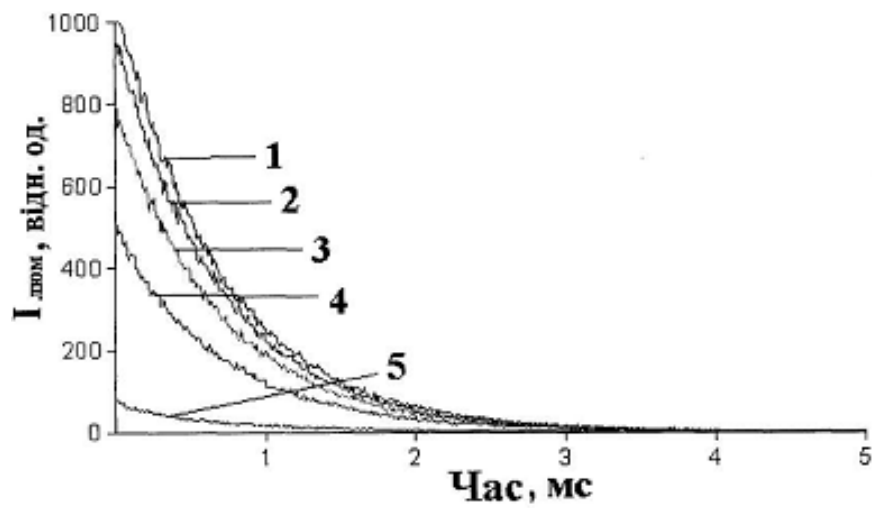


Fig. 6