

**ОПИСАНИЕ
ИЗОБРЕТЕНИЯ
К ПАТЕНТУ**
(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **24707**

(13) **С1**

(45) **2025.10.20**

(51) МПК

G 01N 27/26 (2006.01)

G 01N 33/48 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ОБНАРУЖЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ ПРИ
НАТИВНОМ ДИСК-ЭЛЕКТРОФОРЕЗЕ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ
ГЕЛЕ**

(21) Номер заявки: а 20240004

(22) 2024.01.11

(43) 2024.04.20

(71) Заявитель: Учреждение образования
"Витебская ордена "Знак Почета"
государственная академия ветери-
нарной медицины" (ВУ)

(72) Автор: Бизунов Андрей Викторович
(ВУ)

(73) Патентообладатель: Учреждение обра-
зования "Витебская ордена "Знак По-
чета" государственная академия
ветеринарной медицины" (ВУ)

(56) SU 1239596 A1, 1986.

SU 951121, 1982.

SU 1307338 A1, 1987.

KZ 14836 A, 2004.

(57)

Способ обнаружения белковых фракций, при котором проводят нативный диск-электрофорез в полиакриламидном геле, затем образцы полиакриламидного геля обрабатывают 10%-ной трихлоруксусной кислотой, после чего выдерживают 3 часа в растворе, содержащем 0,5 г красителя кумасси G-250, растворенного в 200 мл 96%-ного этанола и 800 мл 2%-ной трихлоруксусной кислоты, далее выдерживают в течение 30 минут в растворе, содержащем 5 г красителя амидочерного 10В в 1 л 7%-ного раствора уксусной кислоты, и визуалью фиксируют окрашенные белковые фракции.

Изобретение относится к молекулярной биохимии, а именно к новому способу обнаружения белковых фракций в полиакриламидном геле после диск-электрофореза в неденатурирующих условиях.

Известны следующие способы: SU 372498 A1, SU 146086 A1, SU 405071 A1, SU 951121 A1, SU 1307338 A1.

Наиболее близким является способ, описанный в [1]. Недостатками данного способа являются более длительное выдерживание геля в красителе для выявления белковых фракций, использование для хранения гелей раствора, содержащего два вещества (уксусную кислоту и хлорид железа (III)), использование для окраски хлорида железа (III), который затрудняет обработку геля на выявление железосодержащих белков. Также в данном способе обнаружения белковых фракций не представлена возможность высушивания окрашенного геля для удобства хранения и возможности дальнейшего использования.

Цель изобретения - разработка способа обнаружения белковых фракций при нативном диск-электрофорезе в полиакриламидном геле, при котором повышается чувствительность и интенсивность окрашивания белковых фракций после электрофоретического разделения белка в биологических жидкостях.

Способ осуществляется следующим образом.

ВУ 24707 С1 2025.10.20

Способ обнаружения белковых фракций, при котором проводят нативный диск-электрофорез в полиакриламидном геле, затем образцы полиакриламидного геля обрабатывают 10%-ной трихлоруксусной кислотой, после чего выдерживают 3 часа в растворе, содержащем 0,5 г красителя кумасси G-250, растворенного в 200 мл 96%-ного этанола и 800 мл 2%-ной трихлоруксусной кислоты, далее выдерживают в течение 30 минут в растворе, содержащем 5 г красителя амидочерного 10В в 1 л 7%-ного раствора уксусной кислоты, и визуальнo фиксируют окрашенные белковые фракции.

После разделения белковых фракций в полиакриламидном геле с помощью диск-электрофореза в трубках в системе концентрирующего и разделяющего гелей с различной концентрацией по акриламиду [2, 3], гель помещается в 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты для осаждения и фиксации белковых фракций в течение 1,5 часа с последующим окрашиванием первоначально раствором кумасси G-250, содержащим 0,25 % красителя, 2 % трихлоруксусной кислоты и 20 % этанола [4, 5], в течение 3 часов, а затем дополнительным окрашиванием 0,5 % раствором амидочерного 10В (фиг. 2) в 7 %-ной уксусной кислоте в течение 30 минут [2].

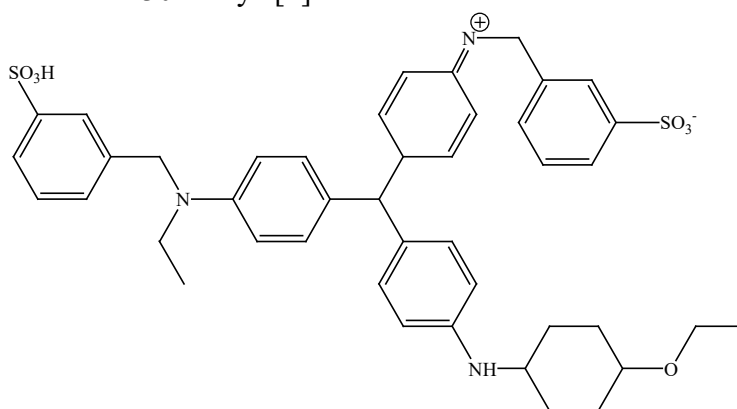


Рис. 1. Кумасси G-250

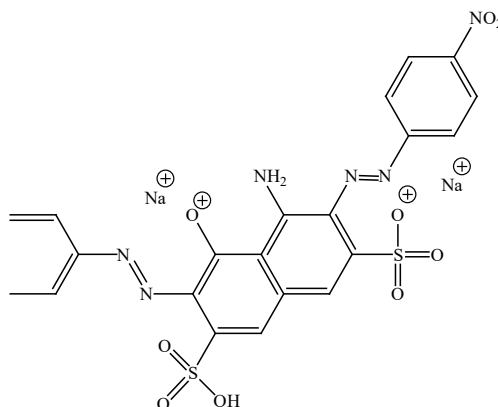


Рис. 2. Амидочерный 10В

Отмывка избытка красителя осуществляется 7%-ным раствором уксусной кислоты путем многократной смены растворителя [2].

Пример. Была исследована сыворотка крови крупного рогатого скота. Образцы полиакриламидного геля после диск-электрофореза помещали в кристаллизатор и заливали 10%-ным раствором трихлоруксусной кислоты на 1,5 часа для осаждения и фиксации белка. Затем образцы переносились в пробирки с раствором кумасси G-250, содержащим 0,25 % красителя, 2 % трихлоруксусной кислоты и 20 % этанола и 0,5%-ный раствор ами-

BY 24707 C1 2025.10.20

дочерного 10В в 7%-ной уксусной кислоте, и выдерживались в течение 3 часов. Белковые фракции проявлялись визуально в виде светло-синих полос. После окраски геля в кумасси G-250 гель извлекали и помещали в пробирки с 0,5%-ным раствором амидочерного 10В в 7%-ной уксусной кислоте на 30 минут. Гель полностью окрашивался в темно-синий цвет. В дальнейшем краситель сливался, а его избыток многократно отмывали 7%-ным раствором уксусной кислоты. При этом избыток красителя вымывался, а окраска зон с белковыми фракциями становилась более резко выраженной и позволяла визуально зафиксировать фракции, которые не наблюдались или были не ярко выражены при окрашивании гелей красителем кумасси G-250. Длительное хранение гелей с проявленными фракциями белков осуществляли в 7%-ном растворе уксусной кислоты (качество окраски при хранении гелей в этом растворе в течение нескольких месяцев не изменялось) или подвергали гель высушиванию с последующим восстановлением его структуры и расположением белковых фракций в 7%-ном растворе уксусной кислоты как и до момента высушивания. Полученный гель с фиксированными белковыми фракциями использовали для качественного и количественного анализа белковых фракций в сыворотке крови крупного рогатого скота. Краситель, приготовленный для покраски гелей, можно использовать многократно.

Достоинствами данного метода выявления белковых фракций являются более быстрая их фиксация, повышение интенсивности окрашивания, более высокая чувствительность, достаточно длительное хранение окрашенных гелей в 7%-ном растворе уксусной кислоты, возможность высушивания гелей для удобства их хранения, а в случае необходимости их дальнейшего исследования - полное восстановление структуры геля со всеми белковыми фракциями в 7%-ном растворе уксусной кислоты.

Источники информации:

1. SU 1239596 A1, 1984.
2. ХОЛОД В.М. Белки сыворотки крови в клинической и экспериментальной ветеринарии. Минск: Ураджай, 1983, 78 с.
3. ГААЛЬ Э. и др. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. Москва: Мир, 1982, 448 с.
4. ОСТЕРМАН Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. Москва, 1981, 286 с.
5. СТРУЧКОВА И.В. и др. Теоретические и практические основы электрофореза белков в полиакриламидном геле. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012, 60 с.