



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 355 915**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07733647 .7**

96 Fecha de presentación : **30.04.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2016421**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.01.2009**

54 Título: **Reactivos de detección de proteínas y procedimientos con colorantes y dextrinas.**

30 Prioridad: **28.04.2006 GB 0608377**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2011

73 Titular/es: **EXPEDEON LIMITED**
Button End Unit 1A Harston
Harston Cambridge, Cambridgeshi, GB

72 Inventor/es: **Jones, Daniel Brian y**
Lanckriet, Heikki

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 355 915 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Campo Técnico

La presente invención se refiere a procedimientos para la detección de proteínas y determinación cuantitativa de concentración de proteínas.

5 Antecedentes de la Técnica

10 Están disponibles varios procedimientos para la detección de proteínas y la determinación de concentración de una proteína en solución. Estos incluyen procedimientos de unión a colorante, que se conocen bien en la técnica, e implican una reacción no específica en la que un colorante que forma complejo con una proteína se une a la proteína. La formación de un complejo colorante-proteína provoca un cambio en las propiedades ópticas del colorante, de modo que existe un cambio de color proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra. Los colorantes que forman complejo con proteínas usados para la cuantificación de proteínas *in vitro* incluyen verde de bromocresol (Gindler, Patente de Estados Unidos N° 3.884.637), HABA y naranja de metilo, pero estos son de uso limitado puesto que se unen casi exclusivamente a albúmina y generalmente no son muy sensibles.

15 Otros procedimientos para determinar concentración de proteína incluyen el procedimiento de Biuret (Mokrasch y McGilvery, J. Biol. Chem. (1956). 221, p. 909), en el que las estructuras peptídicas que contienen al menos dos engarces peptídicos reaccionan con Cu^{2+} en solución alcalina para formar un complejo quelado de color violeta.

20 Lowry y col. (J. Lab. Clin. Med. (1951). 39, 663) emplearon un pre-tratamiento de proteínas con una solución de cobre alcalina, similar al procedimiento de Biuret, seguido de la adición de reactivo de Folin-Ciocalteu (que contiene sales de litio de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico). El color producido fue un resultado de la reducción de los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico a azul de tungsteno y molibdeno por el complejo de proteína-Cu y por el triptófano y la tirosina de la proteína.

25 Un inconveniente importante de los procedimientos de Biuret y Lowry es que no pueden tolerar agentes reductores que están presentes con frecuencia en muestras de proteína.

30 Se ha descrito la formación de complejo colorante/proteína usando Azul Brillante de Coomassie G-250 como colorante que forma complejo con proteínas (Bradford Patente de Estados Unidos N° 4.023.933). Los colorantes de Azul Brillante de Coomassie se unirán a una amplia diversidad de proteínas. Además, el uso del colorante G-250 en el medio ácido apropiado da como resultado un reactivo de ensayo de proteínas que tiene una sensibilidad aproximadamente 100 veces mayor que las técnicas de unión del colorante convencional y de Biuret y aproximadamente de 3 a 5 veces la del procedimiento de Lowry (Bradford Patente de Estados Unidos N° 4.023.933). El uso del colorante de Azul Brillante de Coomassie G-250 en el procedimiento desvelado en el documento US 4.023.933, el "Ensayo de Bradford", tiene muchas ventajas con respecto a procedimientos que emplean otros colorantes, incluyendo alta sensibilidad, que permite el uso de un tamaño de muestra pequeño y utilidad cuando están presentes agentes reductores en una muestra.

40 El Azul Brillante de Coomassie G-250 existe en dos formas de color diferentes, rojo y azul. La forma azul del colorante está presente en solución neutra y alcalina mientras que la forma roja está presente en solución notablemente ácida (pH 0-1). En solución ácida, el Azul Brillante de Coomassie G-250 está presente en equilibrio entre las formas roja y azul; dichas soluciones son parduscas en apariencia. Se cree que puesto que la proteína se une al colorante, el colorante se sitúa en un microambiente diferente y después se protege del medio ácido que proporciona el color rojo al colorante. La fuerza del medio ácido es importante para la sensibilidad del ensayo de proteínas usando colorante de Coomassie, puesto que un aumento en la fuerza del medio ácido provoca una pérdida de sensibilidad del ensayo significativa. El complejo proteína-colorante tiende a agregarse, lo que afecta a la estabilidad del producto de color. La presencia de un agente solubilizante, tal como etanol, tiende a evitar que el complejo proteína-colorante se agregue durante un periodo de tiempo razonable; sin embargo, demasiado etanol da como resultado un cambio notable a la forma azul del colorante, es decir, cambio del ambiente a uno que es menos polar. Se ha postulado que el mecanismo del ensayo es la unión de una forma de carbanión del colorante a un ambiente menos polar de la proteína. Esto quizá explique también el efecto negativo de grandes cantidades de detergente y de acetona en el ensayo, puesto que estos compuestos generalmente son de naturaleza no polar y tenderían a cambiar el ambiente del colorante.

55 Los principales inconvenientes del ensayo de Bradford son la falta efectiva de estabilidad de color durante periodos prolongados, debido principalmente a la precipitación del complejo proteína-colorante; la incapacidad de mostrar sustancialmente la misma reactividad ante diferentes proteínas; la incapacidad de seguir la ley de Beer; y, de forma más importante, el efecto adverso en el ensayo de detergentes presentes en una muestra (Bradford, M., Anal. Biochem., 72 248-254, 1976 y Patente de Estados Unidos N° 4.023.933). Pei-Pei Xu, Microchemical Journal 49, 85-90 (1994) se refiere a

interferencia por Ciclodextrinas en la Determinación de Proteína por el procedimiento de Bradford. La formación de complejo colorante/proteína también se usa para teñir proteínas en geles, tal como los usados en electroforesis. Por ejemplo, el colorante Azul Brillante de Coomassie G-250 en solución de ácido perclórico se ha usado de este modo (Reisner, A. H. y col. (1975) Anal. Biochem. 64, 509-516).

5 En la actualidad, están disponibles varias formulaciones basadas en Coomassie comerciales para teñir proteínas en geles después de la separación electroforética. Para muchas aplicaciones electroforéticas, se usan detergentes tales como SDS para facilitar la separación de proteínas. Debido a que los detergentes afectan de forma adversa al cambio de color en la unión de colorantes de Coomassie con la proteína, debe retirarse del detergente por varios procedimientos de lavado, dando como resultado
10 procedimientos de teñido prolongados y complicados.

De este modo una desventaja principal de la detección y cuantificación de proteínas basadas en colorantes, en particular usando reactivos del ensayo de Lowry o colorantes de Coomassie, es la interferencia de detergentes, tensioactivos y otras moléculas anfipáticas.

15 En consecuencia, existe un deseo para reactivos y procedimientos para la detección y determinación cuantitativa de proteína que tengan una tolerancia mejorada a la presencia de detergentes en las muestras y que tengan una estabilidad de color de proteína-colorante mejorada.

Divulgación de la Invención

Los inventores describen en el presente documento un reactivo para la detección de proteínas que comprende, o consiste en:

- 20 (a) un colorante que forma complejo con proteína y
(b) una o más dextrinas.

25 El colorante que forma complejo con proteínas es un colorante que experimenta típicamente un cambio en las propiedades ópticas en la formación de un complejo proteína-colorante, este puede ser un cambio en los espectros de absorción como sucede con los colorantes de azul brillante de Coomassie™, verde de bromocresol, HABA, naranja de metilo, reactivo de Biuret, reactivos de Biuret con reactivo de Folin-Ciocalteu (reactivos de Lowry); o un cambio en los espectros de emisión, como se produce para los colorantes que forman un complejo de colorante/proteína fluorescente, por ejemplo Naranja de Coomassie™, fluoresceína, Alexofluor, ficoeritrina, Rojo de Texas™.

30 Se prefiere que el colorante que forma complejo con proteína no comprenda una proteína, preferentemente el colorante que forma complejo con proteína no comprende un anticuerpo o péptido.

35 El colorante que forma complejo con proteína es preferentemente un colorante de Coomassie, tal como un colorante azul brillante de Coomassie, por ejemplo colorante azul brillante de Coomassie G-250 o colorante azul brillante de Coomassie R-250. Para algunos colorantes que forman complejo con proteína y en particular los colorantes de Coomassie, se requiere un pH bajo para conseguir el cambio necesario en las propiedades ópticas de la formación de complejo proteína/colorante.

Los inventores describen adicionalmente en el presente documento además un reactivo para la detección de proteína que comprende:

- 40 (a) un colorante que forma complejo con proteína,
(b) una o más dextrinas, y
(c) un ácido con una pKa de 4 o menos.

45 En el reactivo, se prefiere que el colorante esté presente a una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,1% (p/v), preferentemente de aproximadamente 0,005% a 0,05% (p/v). Para su uso el reactivo puede diluirse, típicamente la relación de reactivo y diluyente, por ejemplo solución que contiene proteína, estará en el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:60. Para la detección de proteína en soluciones que contienen 25 µg/ml o menos proteína, podría usarse una relación de volumen 1:1 de reactivo y solución que contiene proteína. Para soluciones con una concentración de proteína mayor, por ejemplo de 0,1 mg/ml a 2 mg/ml, sería apropiada una relación de volumen 1:60 de reactivo y solución que contiene proteínas.

50 Los ácidos útiles tienen una pKa en el intervalo de 0 a 4, preferentemente 3 o menos de modo que el reactivo tiene un pH de -1 a 1; más preferentemente el ácido tendrá una pKa en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, de modo que el reactivo tiene un pH de 0 a 1. Muchos ácidos útiles se identifican en la patente de Bradford (documento US 4.023.933) y la patente de Gindler (documento US 4.239.495), los ácidos adecuados incluyen un ácido fosfórico, un ácido fosforoso

(fosfónico), ácido periódico, ácido selénico, ácido maleico, ácido oxálico y ácido dicloroacético. Se prefieren ácidos fosfórico y fosfónico. Un ácido fosfónico preferido es ácido Nitrilotris (metileno) trifosfónico (NTP), un ácido polibásico disponible en el mercado.

5 En un reactivo descrito en el presente documento, cuando está presente un ácido, generalmente estará presente a una concentración de aproximadamente 4% a aproximadamente 20% preferentemente de aproximadamente 4% a aproximadamente 12%, preferentemente de aproximadamente 7,5% a aproximadamente 9,5% (p/v). El reactivo puede diluirse en su uso de modo que la concentración final de ácido estará en el intervalo de aproximadamente 2% a aproximadamente 20%.

10 El ácido puede ser una mezcla de ácido polibásico y monobásico, en dichas mezclas se prefiere que la relación de ácido polibásico y monobásico esté en el intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 3:1. En el reactivo, generalmente está presente una mezcla de ácido polibásico/monobásico a una concentración en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 15% (v/v), preferentemente de aproximadamente 2% a aproximadamente 5% (v/v). Para su uso, el reactivo puede diluirse para dar una concentración final de mezcla de ácido polibásico/monobásico en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 15%.

15 Un reactivo descrito en el presente documento comprende una o más dextrinas, preferentemente seleccionadas de una dextrina lineal (D), una ciclodextrina (CD), una ciclomilosa (CA) y derivados de las mismas. Un reactivo preferido comprende una o más ciclodextrinas. Las dextrinas lineales adecuadas comprenden 6 o más unidades de glucosa, preferentemente 10 o más unidades de glucosa, por ejemplo 20 15 unidades de glucosa; las ciclodextrinas generalmente tendrán 6 (α -CD), 7 (β -CD) u 8 (γ -CD) unidades de glucosa; las cicloamilosas generalmente comprenderán 8 o más unidades de glucosa. Los derivados adecuados incluyen heptakis 2,6-di-o-butil β -ciclodextrina, carboximetil β -ciclodextrina y carboximetil α -ciclodextrina.

25 Pueden usarse mezclas de dextrinas, por ejemplo mezclas de dextrinas cíclicas, tales como dos o más dextrinas cíclicas seleccionadas de α -CD, β -CD y γ -CD; dos o más dextrinas cíclicas seleccionadas de α -CD, β -CD, γ -CD y CA; mezclas de dextrinas lineales y cíclicas tales como una dextrina lineal y uno o más de α -CD, β -CD y γ -CD; o una dextrina lineal y una o más de α -CD, β -CD, γ -CD y CA. A no ser que el contexto indique lo contrario, el término "dextrina" como se usa en el presente documento abarca dextrinas y derivados de dextrinas.

30 Algunos derivados de ciclodextrina, dextrina y ciertas cicloamilosas pueden actuar como tensioactivos y pueden ser menos adecuados para su uso en reactivos, procedimientos y kits de la invención. Algunas dextrinas en ciertas concentraciones interferirán con ciertos colorantes debido a las propiedades tensioactivas de la dextrina. Las dextrinas y sus concentraciones de interferencia respectivas para diferentes colorantes pueden determinarse fácilmente por los expertos en la materia.

35 Para una proteína determinada, la selección de dextrina o mezcla de dextrinas usada puede optimizarse y cuando se usa una o más dextrinas, la relación puede ajustarse para conseguir las condiciones más eficaces para la detección y/o cuantificación de una proteína o muestra de proteínas dada.

40 En los reactivos descritos en el presente documento la dextrina o dextrinas generalmente estarán presentes en una concentración en el intervalo de 0,01 a 200 mg/ml, preferentemente en el intervalo de 0,5 a 50 mg/ml. Cuando se usan mezclas de dextrinas estas concentraciones se refiere a la concentración total de dextrina. La dilución del reactivo puede ajustarse de modo que la concentración final de dextrina se optimice para una proteína y concentración de proteína dadas. Cuando un detergente está presente en la muestra de proteínas, la selección y concentración de la dextrina o dextrinas puede optimizarse para un detergente determinado y una concentración particular del detergente. Las concentraciones de dextrina 45 finales apropiadas pueden determinarse fácilmente por los expertos en la materia por ejemplo mediante la medición de los espectros de emisión de absorbancia o emisión, según sea apropiado, del complejo proteína-colorante en presencia de diversas concentraciones de la dextrina o mezcla de dextrinas. Para azul brillante de Coomassie G-250, la absorción puede medirse en el pico de absorción, 595 nm.

50 Un reactivo descrito en el presente documento puede comprender adicionalmente un agente de solubilización, tal como un alcohol, para mantener la solubilidad del complejo colorante-proteína. El agente de solubilización puede ser cualquier agente que reduce o retarda la precipitación del complejo colorante-proteína.

55 Uno o más alcoholes pueden estar incluidos en el reactivo, los alcoholes adecuados incluyen etanol, metanol y propanol. Otros alcoholes apropiados son los que tienen buena solubilidad en agua y muestran poco o ningún comportamiento como detergentes. Cuando está presente un alcohol en el reactivo, la concentración es generalmente de 0,1% a aproximadamente 10% (v/v), preferentemente de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 5% (v/v), más preferentemente de aproximadamente 1% a

aproximadamente 5% (v/v).

Un reactivo descrito en el presente documento puede comprender un detergente.

5 El reactivo puede proporcionarse en un sistema de varias partes, por ejemplo como uno o más componentes acuosos, que se combinan para formar un reactivo de la invención. Si se proporciona en dos partes, una parte puede comprender el colorante, opcionalmente ácido y/u opcionalmente alcohol, mientras que el otro puede comprender la dextrina o dextrinas. Cada componente individual tiene una estabilidad prolongada (durante aproximadamente un año cuando se mantiene refrigerado) y cuando se mezcla para formar el reactivo, el reactivo en sí mismo es estable durante más de 6 meses cuando se mantiene refrigerado a 4°C. Un reactivo de acuerdo con la invención puede generarse mediante la combinación de una o más dextrinas con reactivos de tinción de proteínas disponibles en el mercado, por ejemplo reactivos del ensayo de Bradford u otros reactivos de tinción de proteínas de Coomassie. Los reactivos, procedimientos y kits de tinción de proteínas disponibles en el mercado, en particular los reactivos, procedimientos y kits del ensayo de Bradford disponibles en el mercado, pueden adaptarse por inclusión de una o más dextrinas de acuerdo con la invención. Los ejemplos de kits disponibles en el mercado de este tipo incluyen los siguientes:

Pierce:

- 23236 Coomassie Plus – Kit de Ensayo de Better Bradford (incluye patrones)
- 23238 Coomassie Plus – El Reactivo de Ensayo Better Bradford
- 23200 Kit de Ensayo de Proteínas de Coomassie (Bradford)
- 20 23296 Placas Secas de Ensayo de Proteína de Coomassie (Bradford) 2 x 96 pocillos
- 23596 Placas Secas de Ensayo de Proteína de Coomassie (Bradford) 5 x 96 pocillos

BioRad:

- 500-0201EDU Kit de Ensayo de Proteínas Quick Start Bradford 1
- 500-0202EDU Kit de Ensayo de Proteínas Quick Start Bradford 2
- 25 500-0203EDU Kit de Ensayo de Proteínas Quick Start Bradford 3
- 500-0204EDU Kit de Ensayo de Proteínas Quick Start Bradford 4
- 500-0006EDU Concentrado de Reactivo Colorante de Ensayo de Proteína Bio-Rad

Sigma Aldrich:

- B6916 Reactivo de Bradford (Sigma)
- 30 27813 reactivo de ensayo de proteína de Coomassie® BioChemika (Fluka)

35 Convencionalmente, la detección y cuantificación de la proteína usando algunos colorantes que forman complejo con proteína está sometida a una interferencia muy significativa de detergentes; particularmente se ven afectados de forma adversa los colorantes que forman complejo con proteína azul de Coomassie G-250, Rojo de Coomassie G-250, Naranja de Coomassie, reactivo de Biuret y reactivo de Biuret con reactivo de Folin-Ciocalteu. La presente invención supera estas dificultades. Sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que el detergente forma un complejo con la dextrina y la afinidad del detergente por la dextrina es mayor que la afinidad del detergente por el colorante. Mediante el uso de una cantidad adecuada de una dextrina o una mezcla de dextrinas, el detergente puede atraparse en un complejo dextrina-detergente, limitando de este modo el grado en el que el detergente inhibe la reacción de proteína-colorante.

45 En comparación con reactivos disponibles en la actualidad para la detección de proteínas, los reactivos descritos en el presente documento pueden usarse de forma exitosa cuando están presentes detergentes en las muestras que contienen proteína. Esto es de gran relevancia puesto que los reactivos de la invención permiten la detección de proteínas en un ambiente rico en detergentes o tensioactivos, tal como puede requerirse para solubilizar proteínas de membrana o para extraer proteínas directamente de microorganismos usando soluciones ricas en detergente, por ejemplo, soluciones de extracción disponibles en el mercado tales como B-PER® y CellLytic™.

La invención proporciona un procedimiento para detectar y/o cuantificar proteína que comprende poner en contacto una proteína con una solución que comprende:

(a) un colorante que forma complejo con proteína y

(b) una o más dextrinas

5 y detectar y/o cuantificar la formación de complejo de colorante/proteína, en el que el procedimiento es adecuado para detectar y/o cuantificar la proteína cuando la proteína está en presencia de un detergente o un tensioactivo.

Para colorantes que requieren condiciones fuertemente ácidas, la invención proporciona un procedimiento para detectar proteína que comprende poner en contacto una muestra que contiene proteína con una solución que comprende:

(a) un colorante que forma complejo con proteína,

10 (b) una o más dextrinas, y

(c) un ácido con una pKa de 4 o menos;

y detectar la formación de un complejo de colorante/proteína.

15 La detección de la formación de complejo de colorante/proteína puede comprender cuantificar la cantidad de complejo de colorante/proteína formado, para determinar la concentración de proteína en la muestra.

En una realización adicional la invención proporciona un procedimiento para cuantificar proteína que comprende poner en contacto una muestra que contiene proteína con una solución que comprende:

(a) un colorante que forma complejo con proteína y

(b) una o más dextrinas,

20 y cuantificar la formación de complejo de colorante/proteína, como se define en las reivindicaciones.

Para colorantes que requieren un ambiente fuertemente ácido, la invención proporciona un procedimiento para cuantificar proteínas que comprende poner en contacto una muestra que contiene proteína con una solución que comprende:

(a) un colorante que forma complejo con proteína,

25 (b) una o más dextrinas, y

(c) un ácido con una pKa de 4 o menos;

y cuantificar la formación de complejo de colorante/proteína.

30 La muestra que contiene proteína puede ser una solución o puede proporcionarse la muestra que contiene proteína en un soporte, tal como un gel, sol, placa de cromatografía, papel de filtro, membrana de nitrocelulosa o resina.

En consecuencia, en una realización adicional la invención proporciona adicionalmente un procedimiento para detectar proteína que comprende:

(a) proporcionar un soporte que comprende proteína,

(b) poner en contacto la proteína con una solución que comprende:

35 (i) un colorante que forma complejo con proteína y

(ii) una o más dextrinas

y detectar la formación de complejo de colorante/proteína, como se define en las reivindicaciones.

Para los colorantes que forman complejo con proteínas que requieren condiciones ácidas, la invención proporciona un procedimiento de detectar proteínas que comprenden:

40 (a) proporcionar un soporte que comprende proteína,

(b) poner en contacto la proteína con una solución que comprende:

(i) un colorante que forma complejo con proteína

- (ii) una o más dextrinas y
- (iii) un ácido con una pKa de 4 o menos;

y detectar la formación de complejo de colorante/proteína.

5 Los colorantes que forman complejos con proteína adecuados, dextrinas y, si se requiere, ácidos para su inclusión en la solución usada en los procedimientos de la invención se describen anteriormente. El colorante que forma complejo con proteína, una o más dextrinas y, si está presente, el ácido con una pKa de 4 o menos, pueden proporcionarse mediante un reactivo de acuerdo con la invención, que puede diluirse para formar la solución. La solución puede comprender un agente solubilizante tal como un alcohol como se describe en el presente documento.

10 El soporte puede ser un gel, sol, placa de cromatografía, papel de filtro, membrana de nitrocelulosa o resina. El soporte puede comprender un detergente. Usando los procedimientos de la invención el contacto puede realizarse en presencia de un detergente. Estos procedimientos son particularmente adecuados para detectar proteína en gel de poliacrilamida, gel de agarosa o gel compuesto de polímeros, por ejemplo cuando se ha separado una muestra proteica usando un campo eléctrico, por ejemplo por electroforesis.

15 Los reactivos y procedimientos descritos en el presente documento para la detección y determinación cuantitativa de proteínas en geles, tales como las producidas tras la separación usando un campo eléctrico, por ejemplo por electroforesis, simplifican los procedimientos convencionales de modo que los procedimientos de lavado para retirar detergentes tales como SDS y tinción excesiva (tinción de fondo) ya no se requieren.

Típicamente, los procedimientos se llevan a cabo a temperatura ambiente.

20 En procedimientos de la invención la detección de la formación de un complejo de colorante y proteína puede comprender detectar un cambio en los espectros de absorción o emisión del complejo de colorante/proteína. En algunos casos, puede detectarse un cambio de color; por ejemplo cuando se usan colorantes azules brillantes de Coomassie tales como G-250. Los cambios de color pueden detectarse usando un aparato convencional, tal como un colorímetro, por ejemplo capaz de medir la absorbancia a una longitud de onda en el intervalo de 570 nm a 620 nm.

30 Para colorantes que experimentan un cambio en los espectros de absorción en la formación de un complejo de colorante/proteína, la detección puede realizarse midiendo la absorbancia, por ejemplo usando un procedimiento espectrofotométrico. Puede usarse un aparato convencional para los análisis espectrofotométricos, tal como un espectrofotómetro UV/VIS con un intervalo de longitud de onda de 400 a 700 nm.

35 Para los colorantes que experimentan un cambio en los espectros de emisión en la formación de un complejo proteína/colorante, puede realizarse la detección midiendo la emisión, por ejemplo usando un espectrofluorómetro (espectrómetro de luminiscencia), de forma adecuada con un intervalo de longitud de onda de 190 nm a 800 nm.

40 La detección del complejo de proteína/colorante puede comprender cuantificar la cantidad de complejo de proteína/colorante presente para determinar la cantidad o concentración de proteína. La cuantificación puede realizarse por procedimientos que comprenden medir un cambio en los espectros de absorción o emisión del complejo de colorante/proteína. La cuantificación puede comprender por ejemplo medir un cambio en el color. Como se ha descrito la absorbancia puede medirse por un procedimiento espectrofotométrico y puede medirse un cambio en la absorbancia a lo largo del tiempo. La absorbancia generalmente se mide a una longitud de onda en el intervalo de aproximadamente 400 a aproximadamente 700 nm.

45 Para el azul brillante de Coomassie G-250, la absorbancia se mide a una longitud de onda de aproximadamente 595 nm, el máximo de absorbancia para este colorante cuando forma complejo con una proteína. Cuando se usa azul brillante de Coomassie G-250, la proteína puede detectarse controlando el aumento de la absorbancia a 595 nm debido a la formación de complejo de colorante/proteína.

50 Para determinar la concentración de proteína, la absorbancia o emisión medida puede compararse con un valor patrón, un conjunto patrón de valores o una curva patrón. Los resultados son altamente reproducibles y precisos como se muestra en los ejemplos.

55 Debido a la alta sensibilidad presentada usando reactivos y procedimientos de la invención, pueden seleccionarse concentraciones de proteína que son tan bajas como aproximadamente 0,1 µg por 1 ml de muestra. Además, el tiempo requerido para tales determinaciones precisas y sensibles es menor de aproximadamente 2 minutos por muestra a diferencia de los 30-40 minutos generalmente requeridos

para ensayos de tipo Lowry o Biuret tradicionales. En consecuencia, los procedimientos de la presente invención son altamente susceptibles de automatización y análisis de grandes números de muestras.

5 Los inventores describen adicionalmente kits para la detección y/o cuantificación de proteína, comprendiendo los kits una o más dextrinas. Los kits para la detección y/o cuantificación de proteína pueden comprender una o más dextrinas y un colorante que forma complejo con proteína. Adicionalmente un kit puede comprender uno o más ácidos y/o alcoholes como se describe en el presente documento. Un kit para la detección y/o cuantificación de proteínas puede comprender un reactivo, que puede proporcionarse como un sistema de varias partes en el que los componentes se mezclan para formar un reactivo.

10 La invención proporciona adicionalmente el uso de una o más dextrinas para mejorar la formación de un complejo de colorante que se une a proteína/proteína en presencia de un detergente.

Además, la invención proporciona el uso de una o más dextrinas para reducir la interferencia de un detergente en la formación de un complejo de colorante de unión a proteína/proteína en presencia de un detergente.

15 La invención proporciona adicionalmente el uso de una o más dextrinas para alterar las propiedades ópticas de un colorante, tal como un colorante que forma complejo con proteína, en presencia de un detergente.

Lista de Figuras

20 Figura 1: Curvas patrón para muestras de proteínas sin detergente. Ambos métodos proporcionan una respuesta lineal razonable para muestras sin detergente. La pendiente de la curva y el coeficiente de correlación son comparables por ambos procedimientos lo que indica que las dextrinas incluidas en el reactivo no interfieren con la unión de proteína-colorante.

25 Figura 2: Curvas patrón para muestras de proteína que incluyen detergente (CTAB 0,25%). Sólo el reactivo que incluye dextrinas proporciona una respuesta lineal siendo las pendientes y el coeficiente de correlación comparables a las pendientes y el coeficiente de correlación de muestras sin detergente.

Figura 3: Detección de proteína en gel de poliacrilamida.

Las siguientes muestras se ejecutan en cada gel:

Carril 1 patrón de peso Molecular, Mark 12™

30 Carril 2 Beta-lactoglobulina 0,08 mg/ml

Carril 3 Beta-lactoglobulina 0,16 mg/ml

Carril 4 Beta-lactoglobulina 0,31 mg/ml

Carril 5 Beta-lactoglobulina 0,63 mg/ml

Carril 6 Beta-lactoglobulina 1,25 mg/ml

35 Carril 7 Beta-lactoglobulina 2,5 mg/ml

Carril 8 Vacío

Carril 9 Beta-lactoglobulina 5 mg/ml

Carril 10 Vacío

Carril 11 Beta-lactoglobulina 10 mg/ml

40 Carril 12 patrón de peso Molecular

El gel B se tiñó con solución B, el gel A se tiñó con solución A, como se describe en el Ejemplo 3. Los geles se fotografiaron después de 1 hora y 45 minutos de incubación en las soluciones de tinción.

Ejemplos

Ejemplo 1:

45 **Preparación de Reactivo de Bradford**

5 A 100 mg de Azul Brillante de Coomassie (G-250) se añadieron 47 g de etanol, 85 g de ácido fosfórico y 850 g de agua. Esta solución se mezcló durante 20 minutos, para asegurar que todos los componentes se disolvieron, dando como resultado un reactivo que comprende Azul Brillante de Coomassie G-250 al 0,01% (p/v), etanol al 4,7% (p/v) y ácido fosfórico al 8,5% (p/v). A esta solución se añadieron diferentes dextrinas como se indica en los ejemplos específicos.

Ensayo de Bradford (Procedimiento Convencional)

10 Se distribuyeron con pipeta cinco microlitros de las soluciones de muestra que contenían de 0,1 mg/ml a 1,5 mg/ml de proteína y/o detergente del 0,00% a 0,5% en los pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos. A estas se añadieron 300 microlitros de reactivo de Bradford. La absorbancia se midió a 595 nm.

Reducción de la Interferencia del Detergente

15 Se usaron cinco detergentes diferentes en el experimento, en concreto dodecilsulfato sódico (SDS) (aniónico), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (catiónico), TWEEN™-20 (no iónico), TRITON™-X 100 (no iónico) y Brij-35 (no iónico). Se usaron cuatro dextrinas diferentes en el experimento, en concreto dextrina-15 (D15), alfa-ciclodextrina (α -CD), beta-ciclodextrina (β -CD) y gamma-ciclodextrina (γ -CD), también se usó una mezcla de masas equivalentes de estas dextrinas (MIX). Además, también se ensayaron diferentes concentraciones de cicloamilosa.

A) Ensayo de Bradford que contiene un total de 100 mg/ml de dextrina o dextrinas o una concentración saturada de las diversas dextrinas.

20 Tabla de absorbancia medida a 595 nm con una muestra de agua como blanco.

	Sin dextrina	D15	α -CD	β -CD	γ -CD	MIX
SDS (0,5% p/v)	0,326	0,007	0,013	0,089	0,038	0,047
CTAB (0,25% p/v)	0,785	0,024	0,003	0,067	0,015	0,020
TWEEN-20 (0,25% p/v)	1,027	0,453	0,134	0,077	0,344	0,041
TRITON-X 100 (0,10% p/v)	0,677	0,101	0,034	0,017	0,022	0,003
Brij-35 (0,50% p/v)	0,231	0,035	0,015	0,019	0,143	0,018

B) Ensayo de Bradford que contiene un total de 10 mg/ml de dextrina o dextrinas de las diversas dextrinas.

Tabla de absorbancia medida a 595 nm con una muestra de agua como blanco.

	Sin dextrina	D15	α -CD	β -CD	γ -CD	MIX
SDS (0,5% p/v)	0,326	0,051	0,003	0,025	0,005	0,000
CTAB (0,25% p/v)	0,785	0,184	0,026	0,029	0,164	0,008
TWEEN-20 (0,25% p/v)	1,027	0,855	0,167	0,171	0,625	0,376
TRITON-X100 (0,10% p/v)	0,677	0,076	0,003	0,006	0,019	0,095
Brij-35 (0,50% p/v)	0,231	0,046	-0,02	0,001	0,007	0,026

C) Ensayo de Bradford que contiene un total de 1 mg/ml de dextrina o dextrinas de las diversas dextrinas.

25 Tabla de absorbancia medida a 595 nm con una muestra de agua como blanco.

	Sin dextrina	D15	α -CD	β -CD	γ -CD	MIX
SDS (0,5% p/v)	0,326	0,195	0,010	0,056	0,079	0,020
CTAB (0,25% p/v)	0,785	0,674	0,163	0,176	0,603	0,407
TWEEN-20 (0,25% p/v)	1,027	0,999	0,842	0,803	0,952	0,947

TRITON-X100 (0,10% p/v)	0,677	0,248	0,288	0,040	0,032	0,003
Brij-35 (0,50% p/v)	0,231	0,098	0,003	0,033	0,040	0,002

D) Ensayo de Bradford que contiene diversas concentraciones de cicloamilosa (CA).

Tabla de absorbancia medida a 595 nm con una muestra de agua como blanco.

	Sin dextrina	CA 10 mg/ml	CA 1 mg/ml
SDS (0,1% p/v)	-0,063	-0,072	-0,023
CTAB (0,1% p/v)	0,412	-0,081	0,003
TWEEN-20 (0,1% p/v)	0,462	0,074	0,352
TRITON-X 100 (0,1% p/v)	0,677	-0,024	0,410
Brij-35 (0,1% p/v)	-0,024	-0,025	-0,011

5 La absorbancia a 595 nm proporciona un indicio de la cantidad de la forma azul del colorante de Coomassie G-250. A una concentración dada de un detergente particular, un valor de absorbancia alto indica un fondo alto, debido a la presencia del detergente, de modo que el color azul detectado no es representativo de la cantidad de complejo proteína-colorante presente y por lo tanto no es representativo de la concentración de proteína. Se puede ver que para cada uno de los detergentes ensayados, la presencia de una dextrina o dextrinas en la solución dio como resultado un valor de absorbancia más bajo, lo que indica que existe una interferencia de fondo menor y que la presencia de dextrina aumenta la sensibilidad y precisión de la detección de proteína. Para un detergente dado, la selección óptima de dextrina y concentración de dextrina puede determinarse midiendo la absorbancia en el pico de absorbancia del complejo de colorante/proteína en presencia de diversas concentraciones de dextrinas y combinaciones de las mismas.

15 Ejemplo 2: Linealidad de las Curvas Patrón en Presencia de Detergentes

Se creó una serie de diluciones de dos proteínas diferentes, albúmina de suero bovino (BSA) (Pierce, 23209) e inmunoglobulina bovina (IgG) (Sigma, 15506) en el intervalo de concentraciones de 0,1 mg/ml a 1,5 mg/ml. Se seleccionó CTAB como detergente y se añadió a las muestras de proteína a una concentración de 0,25% (p/v). Se realizaron ensayos de Bradford con reactivo de Bradford que contenía dextrina-15 (D15) 0,25 mg/ml, alfa-ciclodextrina (α -CD) 0,25 mg/ml, beta-ciclodextrina (β -CD) 0,25 mg/ml y gamma-ciclodextrina (γ -CD) 0,25 mg/ml, se compararon estos con el ensayo de Bradford realizado con reactivo de Bradford que no contenía dextrinas.

20 Ejemplo 3: Detección de Proteína en Gel de Poliacrilamida

Preparación de las Soluciones de Tinción de Gel

25 A 80 mg de Azul Brillante de Coomassie (G-250) se añadieron 50 g de etanol, 80 g de ácido fosfórico y 850 g de agua. La solución se mezcló durante 20 minutos para asegurar que todos los componentes se disolvieron - esta fue la solución A. Después de esto, se preparó la solución B añadiendo 250 mg de dextrina-15, 250 mg de alfa-ciclodextrina (α -CD), 250 mg de beta-ciclodextrina (β -CD) y 250 mg de gamma-ciclodextrina (γ -CD) a 100 ml de solución A.

30 Preparación de las Muestras y Geles

35 Se preparó una serie de diluciones de beta-lactoglobulina (BLG) (Sigma, L-0130) en el intervalo de concentraciones de 0,08 mg/ml a 10 mg/ml. Se diluyeron treinta microlitros de la muestra con diez microlitros de tampón de Muestra Nupage LDS (Invitrogen, NP0007). Se prepararon geles duplicados, se cargaron quince microlitros de cada muestra en cada gel (Nupage 10%, Bis-Tris, Invitrogen, NP0302). También se cargaron diez microlitros del patrón de peso molecular Mark 12™ (Invitrogen, LC5677) en el gel. Los geles se ejecutaron a una tensión constante (200 V) durante 35 minutos en tampón MES convencional. Después de esto, se sumergió un gel en 25 ml de solución B (una solución de tinción que consiste en 25 ml de solución A como se ha descrito anteriormente que contiene una mezcla de dextrinas como sigue: dextrina-15 (D15) 2,5 mg/ml, alfa-ciclodextrina (α -CD) 2,5 mg/ml, beta-ciclodextrina (β -CD) 2,5 mg/ml y gamma-ciclodextrina (γ -CD) 2,5 mg/ml. El otro gel se sumergió en una solución de tinción que consistía en 25 ml de la solución A. Después de 1 hora y 45 minutos de incubación en las soluciones de tinción, se fotografiaron los geles (Figura 3).

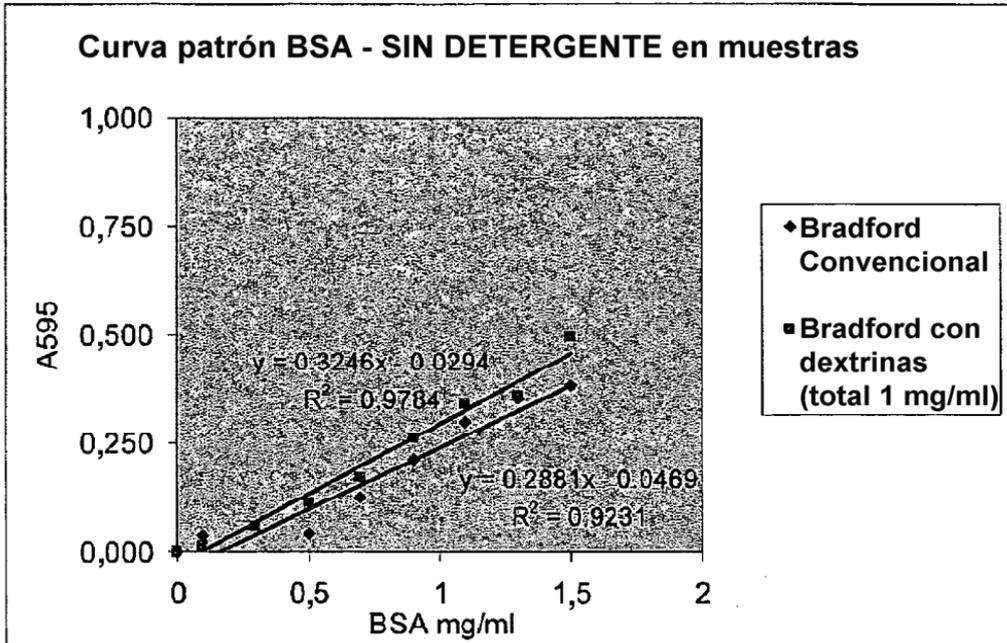
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar y/o cuantificar proteína que comprende poner en contacto una proteína con una solución que comprende:
- 5 (a) un colorante que forma complejo con proteína y
(b) una o más dextrinas
- y detectar y/o cuantificar la formación de complejo de colorante/proteína,
en el que el procedimiento es adecuado para detectar y/o cuantificar proteína cuando la proteína está en presencia de un detergente o un tensioactivo.
- 10 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína está en presencia de un detergente.
3. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en el que la proteína está en solución o la proteína se proporciona en un soporte.
- 15 4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3 en el que el soporte es un gel (por ejemplo un gel de poliacrilamida o gel de agarosa), sol, placa de cromatografía, papel de filtro, membrana de nitrocelulosa o resina.
5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 en el que el soporte es un gel de poliacrilamida o gel de agarosa y la proteína se ha sometido a separación usando un campo eléctrico, por ejemplo por electroforesis.
- 20 6. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 en el que el soporte comprende un detergente y/o en el que el contacto se realiza en presencia de un detergente.
7. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que la detección y/o cuantificación comprende detectar un cambio en los espectros de absorción o emisión del complejo de colorante/proteína.
- 25 8. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que la detección y/o cuantificación comprende detectar un cambio de color, por ejemplo midiendo la absorbancia, de forma adecuada mediante un procedimiento espectrofotométrico, por ejemplo a una longitud de onda en el intervalo de aproximadamente 400 a aproximadamente 700 nm.
- 30 9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 en el que el colorante que forma complejo con proteína es azul brillante de Coomassie G-250 y la absorbancia se mide a una longitud de onda de aproximadamente 595 nm.
10. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que la cuantificación se realiza midiendo la absorbancia a lo largo del tiempo.
- 35 11. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 en el que la absorbancia o emisión medida se compara con un valor patrón, conjunto patrón de valores o curva patrón.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende adicionalmente proporcionar un soporte que comprende proteína, antes de la etapa de puesta en contacto.
- 40 13. El uso de una o más dextrinas para mejorar la formación de un complejo de colorante que se une a proteína/proteína en presencia de un detergente.
14. El uso de una o más dextrinas para reducir la interferencia de un detergente en la formación de un complejo de colorante de unión a proteína/proteína en presencia de un detergente.
15. El uso de la reivindicación 13 ó 14 en el que la dextrina se proporciona como un reactivo que comprende un colorante que forma complejo con proteína y una o más dextrinas.
- 45 16. Uso de acuerdo con la reivindicación 15 en el que el reactivo es un concentrado de reactivo.
17. Un uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16 en el que el reactivo comprende adicionalmente un ácido con una pKa de 4 o menor.
18. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 en el que reactivo comprende adicionalmente un agente solubilizante.

ES 2 355 915 T3

19. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 en el que el colorante que forma complejo con proteína no comprende una proteína.
20. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19 en el que el colorante es un colorante de Coomassie, por ejemplo un colorante azul brillante de Coomassie, tal como G-250.
- 5 21. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20 en el que la concentración de dextrina está en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 200 mg/ml.
22. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21 en el que la concentración de dextrina está en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50 mg/ml.
- 10 23. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22 en el que el colorante está presente en una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,1% (p/v).
24. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 23 en el que el reactivo puede diluirse, en el que típicamente la relación de reactivo a diluyente está en el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:60.
- 15 25. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 24 que comprende un ácido con una pKa de 4 o menor, teniendo preferentemente el ácido una pKa en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 3.
26. Uso de acuerdo con la reivindicación 25 en el que el ácido es un ácido seleccionado de un ácido fosfórico, un ácido fosforoso (fosfónico), ácido periódico, ácido selénico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido dicloroacético y ácido Nitrilotris (metileno) trifosfónico y en el que el ácido está presente a una concentración de aproximadamente 4% a aproximadamente 20% (p/v).
- 20 27. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 26 en el que la dextrina o dextrinas se selecciona(n) de una dextrina lineal, ciclodextrina, cicloamilosa y derivados de las mismas.
- 25 28. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 27 en el que el reactivo comprende uno o más alcoholes, en el que el uno o más alcoholes se selecciona(n) de etanol, metanol y propanol y en el que la concentración de alcohol es de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 10% v/v.
29. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 28 en el que el reactivo comprende un detergente.
- 30 30. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 29 en el que el reactivo se proporciona como un sistema de múltiples partes.

A



B

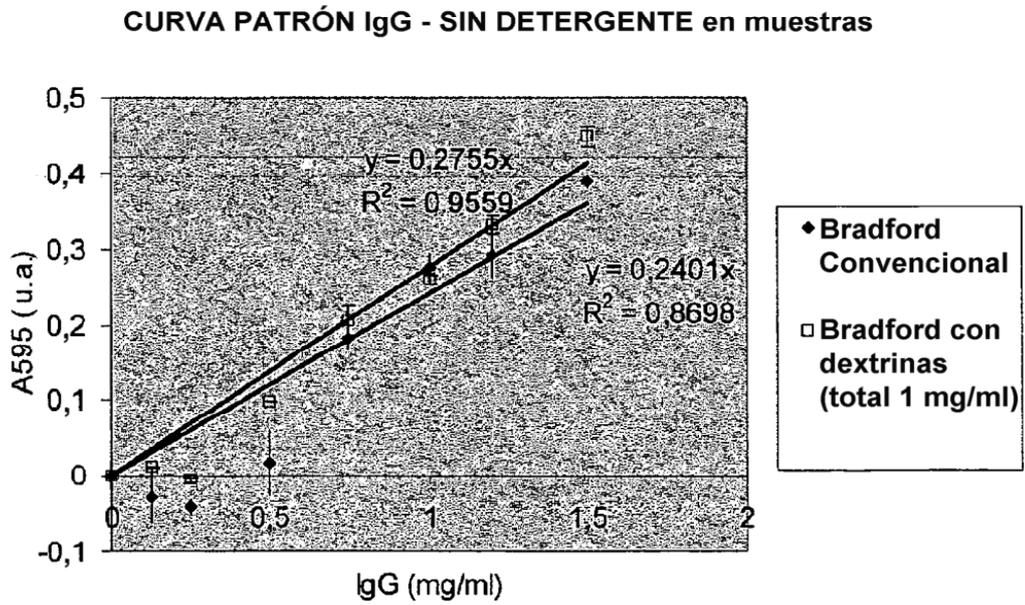
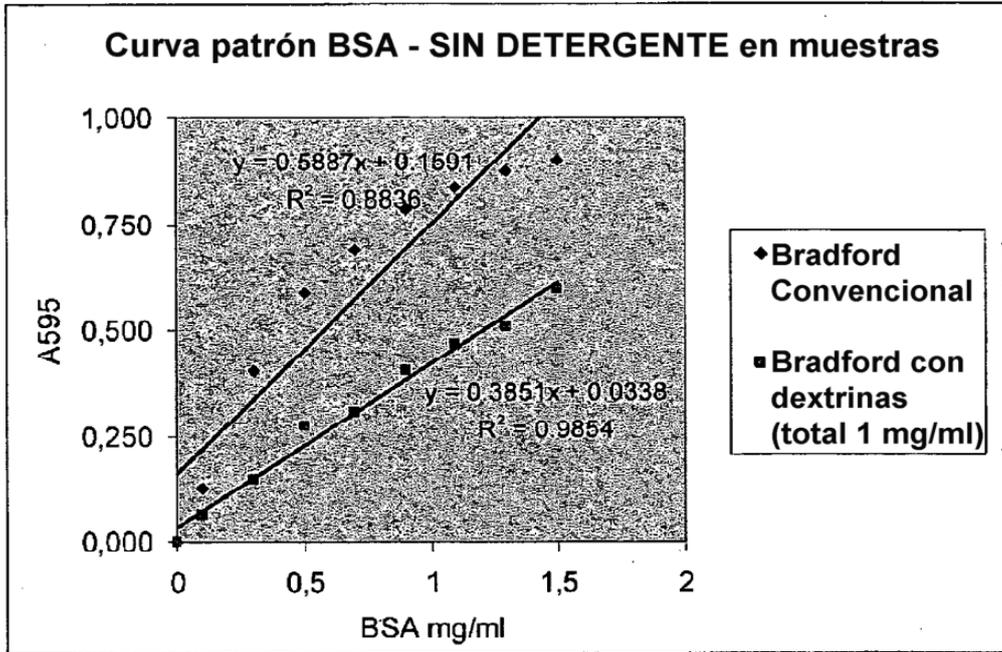


Figura 1

A



B

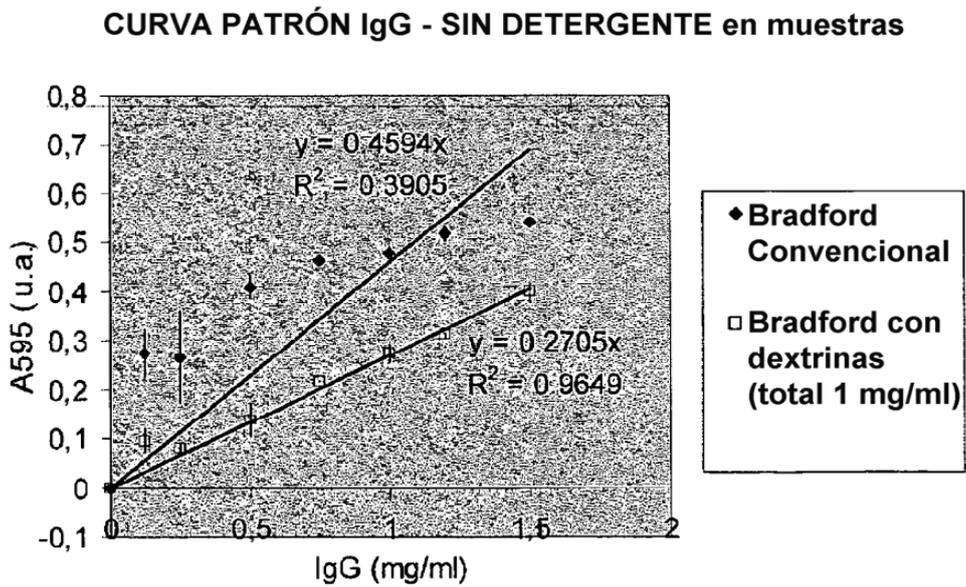
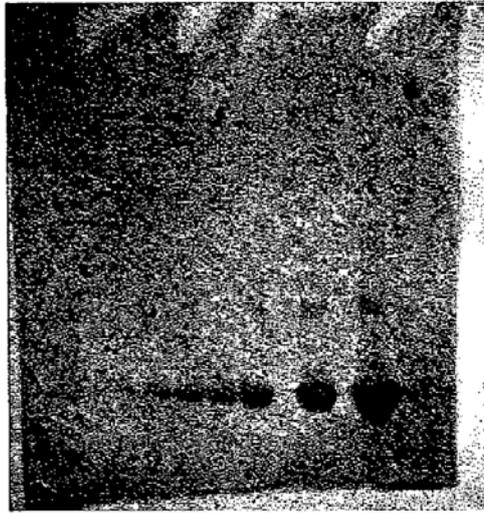


Figura 2

B



A

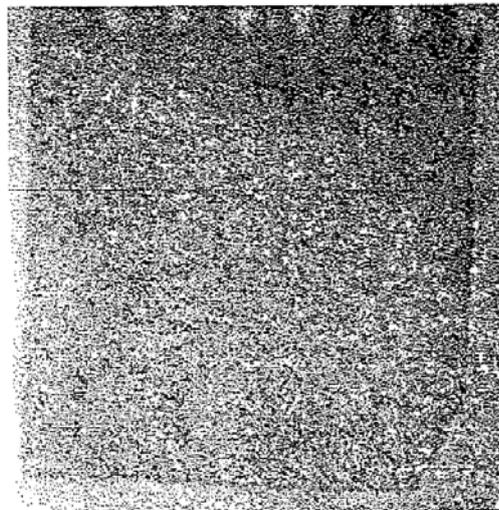


Figura 3