

Возможность определения белкового состава биологических жидкостей с использованием реагентов на основе пирогаллолового красного

Яковлева Виктория Ростиславовна¹, Верле Ольга Владимировна²

1 - Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; 2 - Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

E-mail: polina_91@mail.ru

Измерение содержания отдельных компонентов в биологических пробах к настоящему времени весьма далеко от метрологического определения термина «измерение» в связи с зависимостью результата от метода измерения. Особенно ярко это проявляется в случае анализа белкового состава в биопробах, где измеренная иммунотурбидиметрически концентрация отдельного компонента, может превышать концентрацию общего белка при фотометрическом определении. Цель данного исследования состояла в определении возможности использования реагента на основе красителя пирогаллолового красного (ПГК) (Watanabe N., et al., 1986) в качестве унифицированного реагента в одинаковой степени пригодного как для определения концентрации общего белка в биопробах, так и для концентрирования белков, и для окраски белковых фракций в гелях после ДСН-ПААГ электрофореза.

Материалы и методы.

Исследовали модельные растворы бычьего сывороточного альбумина (БСА) (от 5 мг/л до 200 мг/л), калибровочных белков, а также образцы мочи и лизаты клеток. Концентрацию белка измеряли стандартным методом с использованием реагента ПГК («Абрис+», Россия) и реагентом Ватанабе (W5x) (Caldwell R. B., Lattemann C. T., 2004) следующего состава: сукцинат (50 мМ), молибдат натрия (0,16 мМ), оксалат натрия (1 мМ) и ПГК (0,25 мМ), 20% карбинол (рН 2). Конечная концентрация основных компонентов W5x при соотношении реагент/проба 1:1 соответствовала конечным концентрациям стандартного реактива при соотношении реагент/проба 9:1. Окрашивание электрофоретических гелей производилось реагентом W5x, Coomassie Brilliant Blue R-250 под действием микроволнового излучения (800 Вт, 15 сек). Как опция, использовалась окраска серебром.

Результаты.

Определение белка в биопробах. Установленный предел обнаружения для стандартного реагента составлял менее 10 мг белка/л (по БСА), при отсутствии существенного влияния матрицы.

Окрашивание ДСН-ПААГ электрофореграмм реагентом W5x. Зависимость площади пика от концентрации белка на электрофореграммах была линейной (рис.1) в диапазоне от 5 до 200 мг/л. Чувствительность при окраске W5x была несколько ниже, чем при окрашивании Coomassie Brilliant Blue R-250. Наиболее чувствительным оказалось комбинированное окрашивание W5x и серебром. Линейность в этом случае сохранялась в диапазоне от 10 до 150 мг/л БСА.

Осаждение модельных смесей белков и биопроб реагентом W5x **не приводило** к изменению соотношения площадей пиков на электрофореграммах. Выход белка составлял не менее 75-80%. Дополнительно, оказалось возможным выравнивание концентраций белка в пробах при ресуспендировании осадков буфером Лэммли (при 600 нм).

При исследовании образцов мочи и лизатов клеток было обнаружено, что дополнительная отмывка белков, осажденных W5x, ацетоном, повышает качество ДСН-ПААГ-электрофореграмм.

Выводы. Показано, что интерпретируемость и прослеживаемость результатов анализов как общего белка, так и белкового состава биологических жидкостей могут быть улучшены путем использования реагентов на основе ПГК.

Иллюстрации

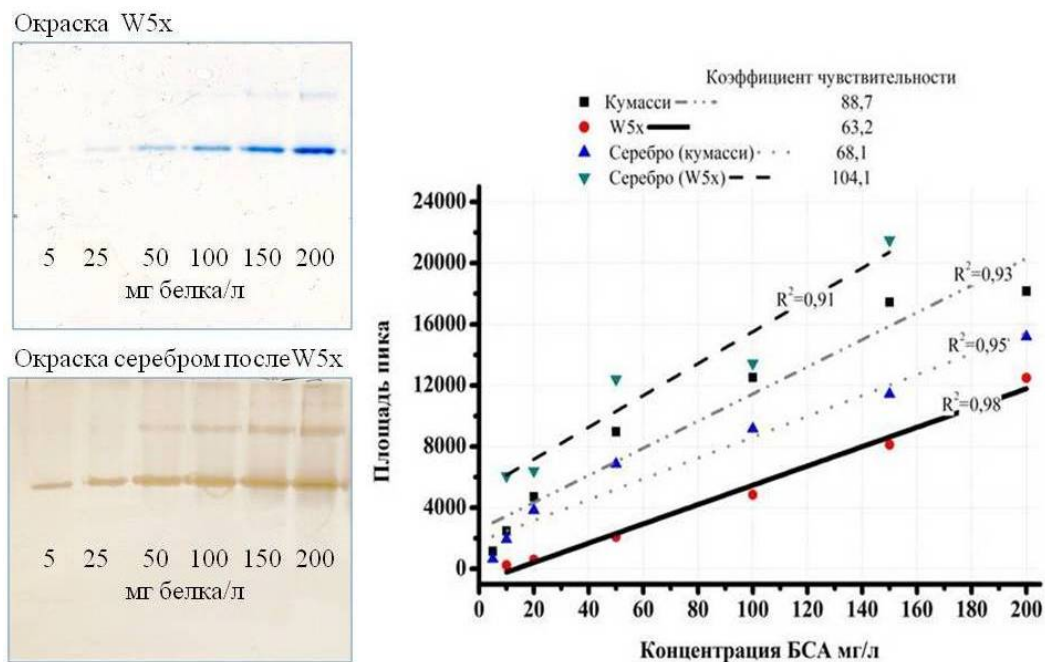


Рис. 1. Зависимость площади пика (ImageJ) от концентрации БСА при окрашивании 10% ДСН-ПААГ электрофореграмм (Mini-Protean) Coomassie Brilliant Blue R-250 или реагентом W5x с последующей окраской серебром