

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА НА ПРИМЕРЕ ЭКСТРАКТОВ ОРГАНОВ *SUS SCROFA*

Ахремко А.Г., Иванова Е.А.

ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН, г. Москва

Аннотация. В настоящей статье представлены результаты сравнительного анализа методов количественного определения белка в органах *Sus scrofa*, а также рассмотрено влияние условий хранения образцов. Метод Брэдфорда показал наиболее точные результаты для экстрактов тимуса, селезенки и лимфоузлов 44,4 мг/мл, 41,55 мг/мл и 47 мг/мл по сравнению со спектрофотометрическим и биуретовым методами.

В процессе выделения биологически активных веществ и выявления их ключевых свойств и функций первой ступенью исследования является предварительное определение содержания белка в выбранных объектах [1].

Биомолекулы, содержащиеся в животном сырье, обладают большим потенциалом в качестве основы для создания лекарственных средств и активных добавок, за счет своей уникальности. Для белкового анализа животных экстрактов необходимо подобрать наиболее совместимый с анализируемым образцом метод количественного определения белка, который обладал бы в равной степени инертностью к небелковым компонентам экстракта, быстротой, простотой, а также воспроизводимостью и чувствительностью [2], что осложняется многокомпонентностью смеси.

Другим немаловажным моментом, влияющим на выбор метода, является влияние условий хранения экстрактов на количество белково-пептидных комплексов. В работах зарубежных и отечественных ученых отмечается необходимость изучения денатурационных изменений белков, протекающих при низких температурах, которые могут влиять на биологическую ценность и качество сырья. В настоящее время нет однозначного мнения по поводу положительного или отрицательного воздействия замораживания экстракта [3].

Наиболее распространенными и точными методами определения концентрации белка являются: спектрофотометрический, метод Брэдфорда и биуретовый метод [4, 5].

Определение белка спектрофотометрическим методом основано на способности ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина и триптофана) поглощать ультрафиолетовый (УФ) свет при 280 нм. Но так как содержание данных кислот в белках неодинаковое, то их поглощение в УФ области спектра может сильно различаться. Поэтому используют другой способ, основанный на измерении оптической плотности при 280 и 260 нм. Белковую концентрацию можно рассчитать, используя коэффициенты экстинкции Варбурга и Христиана для различных белков и нуклеиновых

кислот [6].

Биуретовая реакция основана на взаимодействии пептидной связи и солей меди (II) в щелочном растворе. В щелочной среде белки вступают в реакцию с сернокислой медью, образуя при этом комплексные соединения, окрашенные в фиолетовый цвет (биуретовая реакция). Оптическая плотность данного комплекса измеряется при длине волны 540 нм [6].

Другим основным способом определения содержания белка был выбран метод Брэдфорда. Принцип его состоит во взаимодействии красителя Кумасси бриллиантового синего G-250 с белком, образуя в результате комплекс, окрашенный в синий цвет. Измерение оптической плотности при длине волны 595 нм позволяет определить концентрацию белка в образце. Комплекс краситель-белок образуется очень быстро (в течение 2 мин) и остается стабильным в течение 1 ч [6].

Таким образом, целью работы являлось сравнительное исследование методов количественного определения белка в свежих экстрактах органов *Sus scrofa* и после замораживания образцов при температуре минус 40°C.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования являлись органы *Sus scrofa*: тимус, селезенка и лимфатические узлы. Образцы замораживали, после дефростации проводили экстракцию на лабораторной диспергирующей установке («Лаботекс», Россия), в качестве экстрагента использовали раствор натрия хлорида (0,9 %), гидромодуль 1:5, при температуре 4-5 °С [7, 8]. Скорость перемешивания составляла 400 об/мин.

Отобранные гомогенаты центрифугировали на центрифуге 6М («ELMI», Латвия) в течение 5 минут при 3500 об/мин и отбирали супернатант. Измерение белка проводили на экстрактах сразу после центрифугирования и после заморозки при минус 40°C. Количественное определение белка было проведено тремя способами: биуретовым методом [9] на фотометре BioChem («SA», США), методом Брэдфорда [10, 11] и спектрофотометрическим методом [5] на спектрофотометре Cary 50 («Varian», Австралия).

Результаты исследований

Определение концентрации белка в свежих и замороженных экстрактах тимуса и селезенки показало, что методом Брэдфорда можно определить наиболее максимальное количество белковых соединений с высокой точностью. Данные, полученные с использованием спектрофотометрического и биуретового методов, были занижены более чем на 30 %, относительно результатов, полученных по методу Брэдфорда.

Данные, полученные при спектрофотометрическом анализе экстрактов, свидетельствуют о преимуществе данного метода при анализе экстракта на основе лимфоузлов (содержание белка 54,4 мг/мл, рис.1). Предположительно, это обусловлено наличием большого количества ароматических аминокислот, а также о наличии белков, в составе которых более двух гидроксильных групп и трех атомов азота, находящихся в полипептидной цепи.

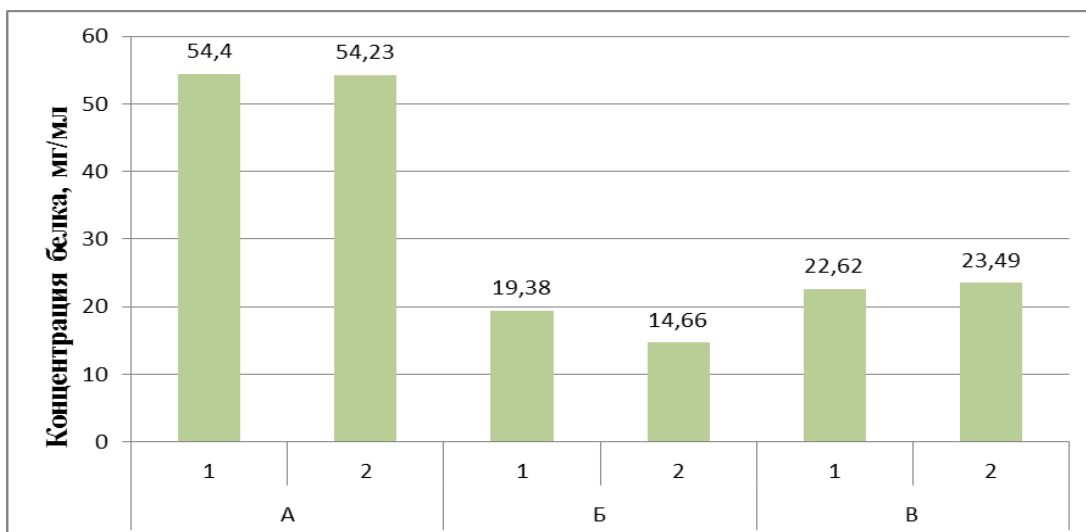


Рисунок 1. Результаты спектрофотометрического количественного определения концентрации белка в экстрактах лимфоузлов (А), тимуса (Б) и селезенки (В) в незамороженном (1) и замороженном (2) виде

Следующим исследуемым методом является биуретовая реакция при длине волны 540 нм.

Анализ данных, полученных с использованием биуретового метода, показал, что при исследовании животных экстрактов в замороженном и незамороженном виде он является недостоверным и наименее чувствительным. Значения концентрации белка были намного ниже относительно других методов: для лимфоузлов – 31,4 мг/мл, для тимуса – 21,367 мг/мл и для селезенки – 23,97 мг/мл (рис. 2). Подобные результаты могут быть получены из-за того, что биуретовая реакция не позволяет определять пептидные соединения ввиду ее специфики.

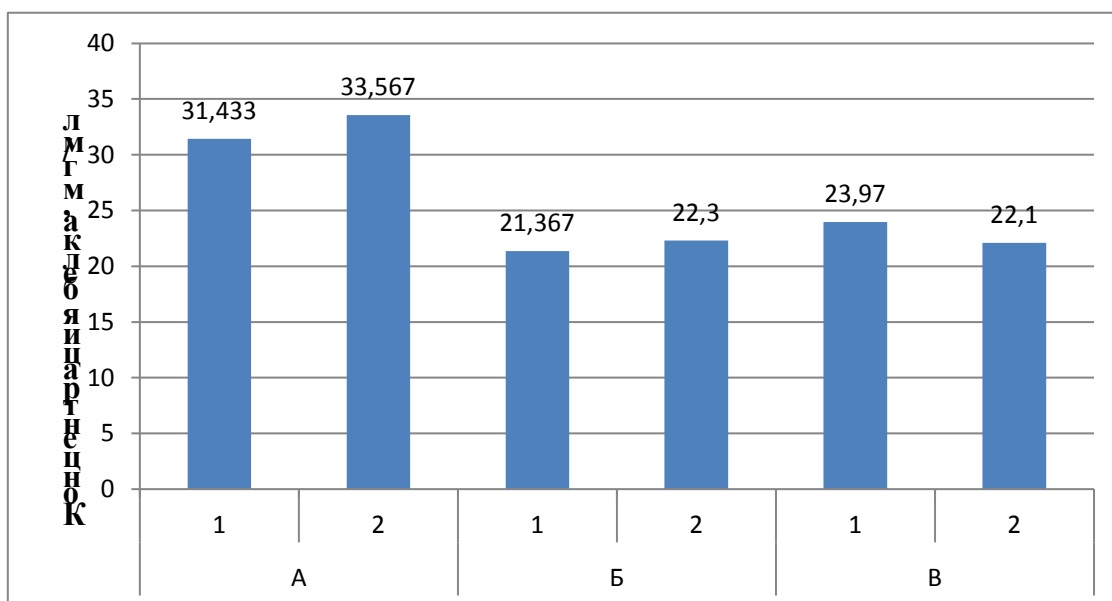


Рисунок 2. Результаты количественного определения концентрации белка биуретовым методом в экстрактах лимфоузлов (А), тимуса (Б) и селезенки (В) в незамороженном (1) и замороженном (2) виде

Сравнительный анализ результатов, полученных при исследовании, показал, что наиболее подходящим для определения концентрации белка в органах *Sus scrofa* является метод Брэдфорда. Значения содержания белково-пептидных соединений отличались от данных, полученных биуретовым и спектрофотометрическим методами (рис. 3): для селезенки – на 73,34 % и на 83,69 %, для тимуса – на 107,86 % и на 129,10 %, соответственно. Однако, для экстракта лимфатических узлов определенная концентрация белка была занижена относительно спектрофотометрического метода на 15,74 %, а относительно биуретового метода выше на 49,53 %.

При количественном определении белка в замороженных экстрактах методом Брэдфорда полученные результаты оставались практически неизменными для всех органов по сравнению с образцами, измеренными сразу после отбора, различия между полученными данными были статистически незначимы.

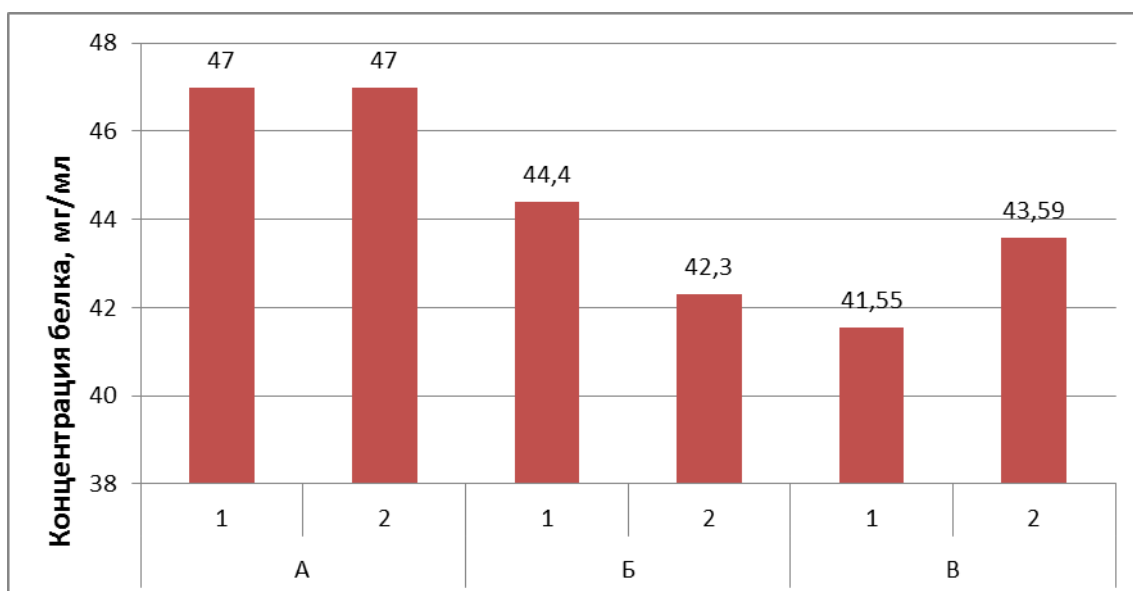


Рисунок 3. Результаты количественного определения концентрации белка методом Брэдфорда в экстрактах: лимфоузлов (А), тимуса (Б) и селезенки (В) в незамороженном (1) и замороженном (2) виде

Выводы

Полученные данные позволили индивидуально подобрать наиболее подходящие и чувствительные методы определения концентрации белка в различных органах *Sus scrofa*. Для тимуса и селезенки оптимальным был выбран метод Брэдфорда, что соответствовало максимальному значению концентрации белка (44,4 мг/мл и 41,55 мг/мл, соответственно) по сравнению со спектрофотометрическим (19,38 мг/мл и 22,62 мг/мл, соответственно) и биуретовым (21,367 мг/мл и 23,97 мг/мл, соответственно) методами. Для экстракта лимфатических узлов максимально результативным был спектрофотометрический метод, который показал наибольшую концентрацию белка (54,4 мг/мл) относительно биуретового (31,433 мг/мл) и метода Брэдфорда (47 мг/мл). Сравнительный анализ концентрации белка с

использованием данных трех методов при исследовании свежих животных экстрактов и экстрактов после заморозки показал, что концентрацию белково-пептидных комплексов практически не зависит от условий хранения образцов.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ (проект № 15-16-00008).

Литература

1. Noble, J.E. Quantitation of protein/ J. E. Noble, M.J. Bailey // *Methods Enzymol.*- 2009. - V.463. - P.73–95. DOI: 10.1016/S0076–6879(09)63008-1
2. Brady, P.N. Evaluation of Colorimetric Assays for Analyzing Reductively Methylated Proteins: Biases and Mechanistic Insights / P.N. Brady, M.A. Macnaughtan // *Analytical biochemistry.*- 2015. - V.491. - P.43–51. DOI: 10.1016/j.ab.2015.08.027
3. Hes, M. Changes of lipid oxidation degree and their influence on protein nutritive value of frozen meat products / M. Hes, J. Korczak, A. Gramza // *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences.* – 2007. - Vol. 57. - No 3. – P. 323–328.
4. Lanouette, S. The functional diversity of protein lysine methylation / S. Lanouette, V. Mongeon, D. Figeys, J.F. Couture // *Mol-Syst Biol.*- 2014. - V. 10. - P. 1–26.
5. Gordon, M.A.R. A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts / M.A.R. Gordon, E. Armenise, R.P. White, P.R. Hirsch, K.W.T. Goulding // *Soil BiolBiochem.*- 2013. - V. 67(100). - P. 166–173.
6. Василевская, Е.Р. Методология исследования белково-пептидных компонентов экстрактов тканей *Sus scrofa* / Е.Р. Василевская, Е.А. Котенкова, Е.А. Лукинова, Е.А. Калинова // *Теория и практика переработки мяса.* – 2017. – №.3. – С. 79–85.
7. Сова, В.В. Выделение и очистка белков: методическое пособие по курсу «Химия и биохимия белков и ферментов» / В.В. Сова, М.И. Кусайкин. – Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006. – 42 с.
8. Кашинова, Э.Б. Оптимизация технологических режимов выделения биологически активных веществ из сырья животного происхождения / Э.Б. Кашинова, Е.А. Котенкова, Е.А. Ертикеева, А.Г. Ахремко // *Актуальная биотехнология.* – 2016. – №.1 (16). – С. 17–22.
9. Jian, W. A. Workflow for absolute quantitation of large therapeutic proteins in biological samples at intact level using LCHRMS / W. Jian, L. Kang, L. Burton, N. Weng // *Bioanalysis.*-2016. - V. 8. - P. 1679–91.
10. Акимова, Е.И. Методы количественного определения белка: Учебное пособие/ Е. И. Акимова; ред.: В.Ф. Травень, В.В. Асеев. – М.:РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2009. - 88 с.: а-ил.- Библиогр.: с. 88.
11. Whiffen, L.K. Polyphenolic compounds interfere with quantification of protein in soil extracts using the Bradford method / L.K. Whiffen, D.J. Midgley, P.A. McGee // *Soil BiolBiochem.*-2007. - V. 39(2). - P. 691–694.