

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1990

Том 36 выпуск 2

Внимание! Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

Voprosy meditsinskoi khimii

ISSN 0042-8809

1990

Volume 36 issue 2

Attention! OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

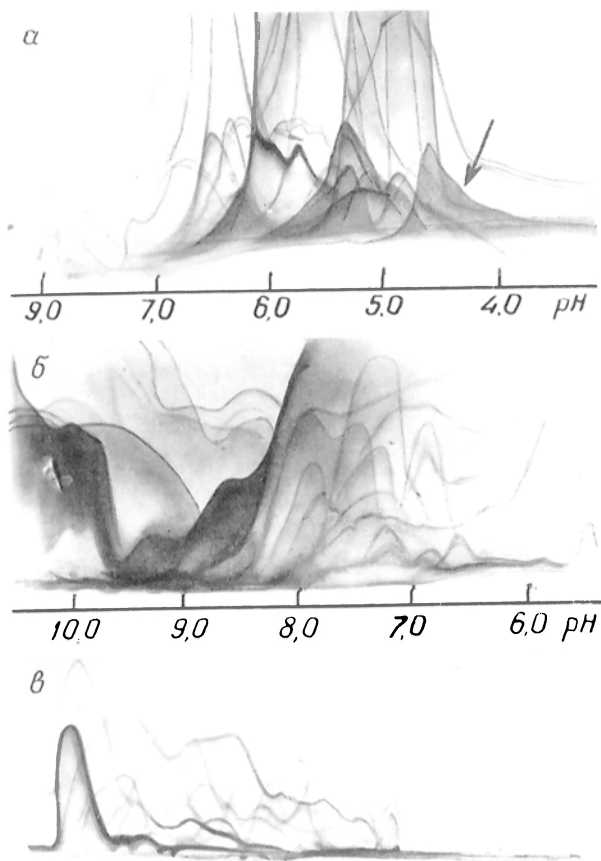


Рис. 1. Иммуноэлектрофореграммы белков сыворотки человека, разделенных с помощью электрофореза в ПААГ и ИЭФ.

a — ИЭФ в амфолитном градиенте; *б* — ИЭФ в борат-фосфатном градиенте, *в* — электрофорез в 5 % ПААГ. Стрелкой указан иммунопреципитат α_2 -МГ.

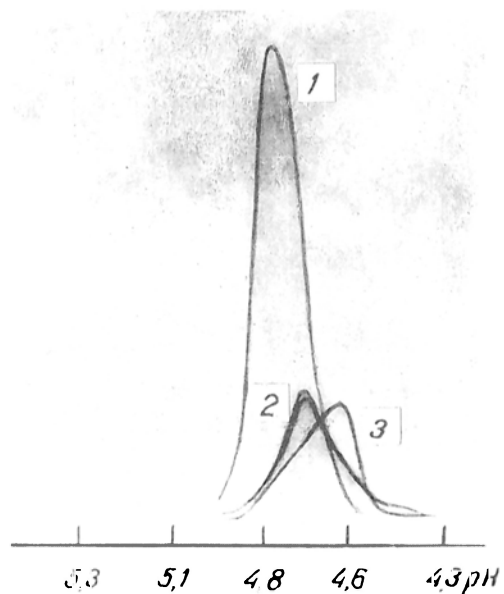


Рис. 2. Иммуноэлектрофореграммы трех α_2 -макроглобулинов человека, разделенных в первом направлении ИЭФ в амфолитном градиенте.

1 — PAPP — A; 2 — α_2 -МГ; 3 — АБГ.

Содержание СОД в тканях и биологических жидкостях

Объект исследования	Рабочее разведение	Содержание СОД, мкг/мл
Кровь:		
мужчины	1:1000	31,0±2,8 (7)
женщины	1:1000	21,0±1,9 (17)
Плазма	1:10	0,35±0,02
Синовиальная жидкость (больные ревматоидным артритом)	1:10	0,27±0,07 (3)
Кровь крыс*	1:1000	34,5±2,45 (5)
Мозг крыс* (10 % гомогенат)	1:100	52,5±3,8** (6)
Печень крыс* (10 % гомогенат)	1:100	197,0±10,1** (6)

Примечания. Представлены средние арифметические величины ± средние ошибки средних арифметических. В скобках — число опытов. Одна звездочка — самки, две — мкг на 1 г ткани.

случаях даже после кипячения в течение 10—15 мин анализируемые образцы сохраняют некоторую способность ингибировать окисление кверцетина, по-видимому, за счет эндогенных антиоксидантов. Поэтому при определении активности СОД следует использовать следующую формулу:

$$\% \text{ ингибирования} = \frac{\Delta D_{406}^{\text{III}} - \Delta D_{406}^{\text{II}}}{\Delta D_{406}^{\text{I}}} \cdot 100,$$

где $\Delta D_{406}^{\text{I}}$ — изменение оптической плотности при 406 нм за 20 мин в контрольной пробе, без биологического материала;

$\Delta D_{406}^{\text{II}}$ — изменение оптической плотности при 406 нм за 20 мин в пробе, содержащей анализируемый материал; $\Delta D_{406}^{\text{III}}$ — изменение оптической плотности при 406 нм за 20 мин в пробе, содержащей инактивированный образец.

При анализе образцов с большим содержанием балластных белков и низкой активностью СОД для инактивации фермента можно использовать цианид. В этих же случаях анализируемые образцы можно предварительно освободить от низкомолекулярных антиоксидантов путем диализа или на сефадексе G-25.

ЛИТЕРАТУРА

1. Костюк В. А., Потапович А. И. // Кислородные радикалы в химии, биологии и медицине. — Рига, 1988. — С. 45—54.
2. Титовец Э. П., Кошкин В. В. А. с. 855502 СССР.
3. Beyer W. F., Jr., Fridovich I. // *Analyt. Biochem.*—1987.— Vol. 161.— P. 559—566.
4. McCord J. M., Fridovich I. // *J. biol. Chem.*—1969.— Vol. 244.— P. 6049—6055.
5. Misra H. P., Fridovich I. // *Ibid.*—1972.— Vol. 247.— P. 3170—3175.
6. Paoletti F., Aldinucci D., Mocali A., Caparrini A. // *Analyt. Biochem.*—1986.— Vol. 154.— P. 536—541.
7. Wright J. R., Colby H. D., Miles P. R. // *Arch. Biochem.*—1981.— Vol. 206.— P. 296—304.

Поступила 28.09.88

A SIMPLE, SENSITIVE ASSAY FOR DETERMINATION OF SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY BASED ON REACTION OF QUERCETIN OXIDATION

V. A. Kostyuk, A. I. Potapovich, Zn. V. Kovaleva

Byelorussian State University, Minsk.

An indirect method for determination of superoxide dismutase (SOD) activity, based on inhibition of quercetin autooxidation,

was developed. The optimal conditions of reaction ensuring high sensitivity of measurement ($I_{50}=1.5 \text{ ng/ml}$) were selected. NaN_3 , catalase and physiological concentrations of ascorbic acid did not interfere with the SOD estimation in blood and tissue homogenates.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 615.844.6.07:615.31:547.96

С. Г. Жабин, Н. А. Зорин, С. В. Зайцева

ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ, РАЗДЕЛЕННЫХ МЕТОДАМИ ЗОНАЛЬНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ФОКУСИРОВАНИЯ

ЦИИЛ Новокузнецкого института усовершенствования врачей Минздрава СССР

Разделение макромолекул методами зонального электрофореза и изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) имеет большое значение при установлении их массы, заряда и конформации [1, 3]. В качестве поддерживающей среды при ИЭФ в самоорганизующихся, амфолитных, и искусственных, борат-полиольных, pH-градиентах часто используется полиакриламидный гель (ПААГ) [1, 2]. Разрешающая способность зонального электрофореза в ПААГ значительно выше, чем в агарозном геле [3]. Однако идентифицировать и количественно оценить большое число белковых фракций, полученных этими методами, не всегда представляется возможным. Эту проблему пытаются решить с помощью блоттинга или иммунофиксации, но оба метода малоприменимы для оценки концентрации белков [15]. Предпринимаются многочисленные попытки приспособить для этой цели перекрестный иммуноэлектрофорез [1, 4, 11], но на стыке агарозного и полиакриламидного гелей постоянно формируются участки неравномерного напряжения из-за различного эндоосмоса сред и возникает ток жидкости. Все это приводит к разделению соприкасающихся поверхностей, высыханию агарозы и искажению иммунопреципитатов. Поиск адекватных сочетаний указанных выше методов является актуальной задачей, послужившей предпосылкой настоящей работы.

Методика

В качестве антигенов выбраны смесь сывороток беременных женщин (III триместр беременности) и сыворотка пуповинной крови. Для иммуноэлектрофореза применялись анти-сыворотка против белков сыворотки крови человека (Горьковский НИИЭМ) и антисыворотка против α_1 -фетопротейна (НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи). Для получения моновалентных антисывороток против ассоциированного с беременностью α_2 -гликопротеина (АБГ), ассоциированного с беременностью протеина А (РАРР-А), α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ) и тропобластического β_1 -гликопротеина (ТБГ) высокоочищенными препаратами этих белков внутрикожно иммунизировали кроликов [5]. РАРР-А был выделен из сыворотки ретроплатен-тарной крови с помощью аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе CL-4B («Pharmacia», Швеция) по методу Sinosich [13] и затем освобожден от примесей негативной аффинной хроматографией на колонке с цианбромированной агарозой («Кемотекс», СССР) с ковалентно присоединенными антителами к сывороточным белкам человека (Горьковский НИИЭМ). АБГ и ТБГ были выделены из сыворотки крови беременных женщин при помощи сочетания гель-хроматографии и негативной иммунной хроматографии [2]. α_2 -МГ был

получен из плазмы доноров методом цинк-хелатной хроматографии на колонке аминокислотной агарозы («Кемотекс», СССР) [12]. Для диск-электрофореза белков применяли набор реактивов фирмы «Reanal» (ВНР) и аппарат АВГЭ-1 («Химифил», СССР). Диск-электрофорез проводили в 5 % и 7,5 % ПААГ общепринятым путем [6]. Градиентный ПААГ (4—17 %) формировали по рекомендациям Г. В. Троицкого и соавт. [7]. При электрофорезе в этом геле использовали следующие маркеры молекулярной массы («Pharmacia», Швеция): овальбумин (43 кД), альбумин (67 кД), альдолазу (158 кД), каталазу (232 кД), ферритин (440 кД) и тиреоглобулин (669 кД). С этой же целью применяли IgM, выделенный из плазмы крови доноров путем сочетания позитивной аффинной хроматографии на колонке с цианбромированной агарозой («Кемотекс», СССР) с ковалентно присоединенными антителами к этому белку (Горьковский НИИЭМ) и последующей геле-фильтрации на колонке сефакрила S-200 («Pharmacia», Швеция).

После окончания электрофореза вырезали полоску ПААГ шириной 1—2 см и вымачивали ее в течение 5—10 мин в специально разработанной нами уравнивающей смеси при легком покачивании на встряхивателе (WU-2, Польша). Для приготовления уравнивающей смеси в 100 мл 0,02 М барбитуратного буфера pH 8,6 [5] вносили 0,62 г борной кислоты и закисляли его глицерином до pH 7,0. Затем избыток буфера с поверхности полоски ПААГ удаляли промакательной бумагой и переносили ее на пластинку 1 % агарозы («Calbiochem», США) без антител. Остальную поверхность пластины предварительно заливали расплавленной 1 % агарозой марки А («Биолар», СССР) в 0,02 М барбитуратном буфере pH 8,6 с добавлением соответствующего количества антисыворотки. В дальнейшем методика соответствовала общепринятому варианту перекрестного иммуноэлектрофореза [5]. Низковольтный иммуноэлектрофорез проводили в течение 16—20 ч на аппарате ПЭФ-3 при градиенте потенциала 2 В/см. Преципитаты окрашивали раствором кумасси R-250 («Reanal», ВНР) в смеси этанол — вода — уксусная кислота (45:45:10). Контрольное окрашивание ПААГ проводили 0,1 % раствором кумасси R-250 в 25 % ТХУ в течение ночи с последующей отмывкой в 7 % уксусной кислоте [3].

ИЭФ белков в борат-полиольном градиенте в среде ПААГ по методу Г. В. Троицкого [7] проводили на аппарате АВГЭ-1. Искусственный градиент pH готовили путем наслаивания друг на друга порций компонентов 5 % ПААГ с возрастающими значениями pH [7]. Фотополимеризацию гелей осуществляли с помощью ртутно-кварцевой лампы в течение 30 мин. Апробировали различные диапазоны pH-градиентов: 4,0—6,0, 6,0—7,0, 6,0—8,0, 5,0—7,0, 4,0—8,0, 6,0—10,0. В карманы гелевых пластинок (10×12×0,1 см) вносили по 10—15 микролитров цельной сыворотки и ИЭФ проводили в течение 14—16 ч при напряжении 300 В и температуре 4 °С. После окончания ИЭФ из геля вырезали полоску ПААГ шириной 1—2 см и без уравнивания переносили ее на стекло с агарозными гелями с соблюдением условий, описанных при использовании предыдущего способа, затем выполняли иммуноэлектрофорез [5]. Для количественной оценки стабильности pH-градиента рядом с исследуемым треком через каждый сантиметр вырезали диски геля диаметром 10 мм и гомогенизировали их в 1 мл дистиллированной воды. Через 16 ч осуществляли pH-метрию и полученные данные использовали для оценки стабильности искусственных градиентов.

ИЭФ в самоорганизующихся градиентах pH проводили в агарозном геле с применением амфолитов («Химифил», СССР) в диапазонах pH 4,0—6,0 и 4,0—9,0 по методу [9]. Агарозный гель готовили путем добавления 3,6 мл соответствующих амфолитов в расплавленный золь, содержащий 0,3 г агарозы марки I. (ЛКВ, Швеция), 3,6 г сорбита и 26,2 мл дистиллированной воды. Гель толщиной 1 мм выдерживали 20 мин при комнатной температуре, затем 2 ч при 4 °С. Для ИЭФ применяли аппарат ЛГЭ-3 («Химифил», СССР). В качестве прокладок между платиновым электродом и гелем использовали полоски хроматографической бумаги («Whatman», № 1, Великобритания) шириной 0,5 см, сложенной в 5 слоев. При работе в диапазоне pH от 4,0 до 9,0 анодный мостик пропитывали 0,05 М серной кислотой, катодный — 0,5 М едким натром. В течение 1-го часа выполняли преизоэлектрофокусировку при 250 В, после чего на гель помещали аппликаторы их хроматографической бумаги размером 0,5×1 см, содержащие 5—50 микролитров исследуемых сывороток. В течение 30 минут при том же напряжении осуществляли перенос в гель анализируемой смеси белков, затем аппликаторы удаляли и ИЭФ проводили в течение 2 ч при напряжении 400 В. После ИЭФ вырезали полоски геля, соответствующие белковым трекам, и переносили их на гелевые пластины для имму-

ноэлектрофореза, как при использовании предыдущего способа. Иммуноэлектрофорез проводили в указанных выше условиях, с той лишь разницей, что для приготовления гелей применяли иной препарат агарозы («Bio-Rad», США). Конечный градиент pH оценивали таким же образом, как при применении предыдущего метода. Контрольное окрашивание белковых фракций после ИЭФ осуществляли в соответствии с рекомендациями [9].

Результаты и обсуждение

Перекрестные иммуноэлектрофореграммы, полученные при различных вариантах разделения белков в гелях первого направления, представлены на рис. 1 (см. на вклейке). Общими свойствами всех иммуноэлектрофореграмм являются четкость иммунопреципитатов, наличие единой базовой линии, что делает возможным их точную дифференцировку и количественную оценку. Следует отметить, что основная часть белков сыворотки крови гетерогенна по заряду, поскольку их иммунопреципитаты имеют вид слившихся пиков. Ввиду того что при выделении и очистке ряда протеинов некоторые их фракции могут теряться, а также денатурировать, результаты анализа высокоочищенных препаратов не всегда полно отражают истинные их свойства, в частности не позволяют установить количественное соотношение различных форм. После электрофоретического фракционирования в 7,5 % ПААГ сыворотки пуповинной крови и последующего иммуноэлектрофореза была выявлена микрогетерогенность α_1 -фетопротеина. На иммуноэлектрофореграмме отчетливо дифференцировались четыре фракции этого белка, существенно различавшиеся по заряду, тогда как в конвенциональных вариантах иммуноэлектрофореза удавалось обнаружить лишь один преципитат. Выбрав в качестве образца сыворотку беременных женщин, мы определили, что изоэлектрические точки АБГ, РАРР-А и α_2 -МГ находятся в области pH 4,8 независимо от варианта ИЭФ, что соответствует данным литературы, но в первые показали отсутствие полного совпадения изоэлектрических точек этих белков (рис. 2, см. на вклейке). Для этого при иммуноэлектрофорезе использовали смесь антисывороток против указанных белков. Установлено, что изоэлектрическая точка РАРР-А соответствует pH 4,76 и достоверно выше изоэлектрических точек α_2 -МГ (4,70) и АБГ (4,66). Более широкие основания иммунопреципитатов белков, фокусированных в борат-полиольном градиенте pH, указывают на несколько меньшую разрешающую способность этого метода по сравнению с ИЭФ в амфолитах (см. рис. 1). Положительным качеством ИЭФ, по данным Г. В. Троицкого [7], является отсутствие комплексования и денатурации белков в среде, состоящей из борат-ионов, глицерина, сахаров, тогда как амфолиты могут образовывать комплексы соединения с белками, что нередко приводит к возникновению искусственных артефактных фракций [1]. Поэтому оптимальным является параллельно проводимое разделение белков в первом направлении указанными вариантами ИЭФ.

В градиентном ПААГ первого направления электрофоретически разделили сыворотку крови беременных женщин и смесь маркеров с известной молекулярной массой. Белки сыворотки крови идентифицировали с помощью соответствующих моноантисывороток. Затем их местоположение

определяли на ПААГ-электрофореграммах градиентного геля. Полученные данные позволили оценить молекулярную массу белков по калибровочному графику, построенному с помощью маркеров, окрашенных кумасси. Установлено, что молекулярная масса ТБГ равна 90 кД, АБГ — 360 кД, α_2 -МГ — 720 кД, РАРР-А — 810 кД, что соответствует значениям этого показателя, полученным другими исследователями при использовании иных методов.

Таким образом, предлагаемые сочетания методов фракционирования и иммунохимической идентификации белков в гелях расширяют сферу применения ИЭФ и зонального электрофореза. Установление массы, заряда и гетерогенности молекул белков, входящих в состав сложных смесей, подобных сыворотке, осуществляется в условиях, в которых антигены сохраняют исходные свойства, тогда как при очистке происходит их определенная денатурация. Иммуноэлектрофорез делает возможной точную количественную оценку реально существующих фракций нативных биополимеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул: Пер. с англ.— М., 1982.
2. Зорин Н. А. // Вопр. мед. химии.— 1983.— № 5.— С. 41—43.
3. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование.— М., 1981.
4. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами.— М., 1983.
5. Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу:

- Методы и применение / Под ред. Н. Аксельсен и др.: Пер. с англ.— М., 1977.
6. Такач Б. // Методы исследования в иммунологии: Пер. с англ.— М., 1981.— С. 95—119.
 7. Троцкий Г. В., Ажицкий Г. Ю. Изоэлектрическое фокусирование белков в самоорганизующихся и искусственных pH-градиентах.— Киев, 1984.
 8. Bohn H., Winckler W. // Blut.— 1976.— Bd 33.— S. 377—388.
 9. D'Andrea A. L., Leedham V. M. T. // Electrophoresis.— 1986.— Vol. 7.— P. 454—457.
 10. Engvall E. // Oncodevelop. Biol. Med.— 1980.— Vol. 1, N 2.— P. 113—122.
 11. Johnson A. H., Wright G. L., Chaparas S. D., Mancuso D. J. // Immunol. Commun.— 1980.— Vol. 9, N 6.— P. 595—609.
 12. Kurecki T., Kress L. F., Laskowski M. // Analyt. Biochem.— 1979.— Vol. 99.— P. 415—420.
 13. Sinosich M. J., Davey M. W., Ghosh P., Grudzinskas J. G. // Biochem. int.— 1982.— Vol. 5, N 6.— P. 777—786.
 14. Schutcliffe H. G., Kukulska-Langlands B. M., Coggins J. R. et. al. // Biochem. J.— 1980.— Vol. 191.— P. 799—809.
 15. Towbin H., Gordon J. // J. immunol. Meth.— 1984.— Vol. 72.— P. 313—340.

Поступила 28.09.88

IMMUNOELECTROPHORETIC IDENTIFICATION OF PROTEINS SEPARATED BY MEANS OF ZONAL ELECTROPHORESIS AND ISOELECTRIC FOCUSING

S. G. Zhabin, N. A. Zorin, S. V. Zaytseva

Medical School, Novokuznetsk.

Modified procedure of cross immunoelectrophoresis is developed, which involved zonal polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing in borate polyol and ampholine pH gradients for the first-dimension separation of proteins. Immunoelectrophoretic detection of proteins is suitable for evaluation of their molecular mass, isoelectric points and heterogeneity as well as for estimation of various protein fractions concentrations.