

# МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 616.61: 578.088

© Коллектив авторов

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ МОЧИ И ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ, РАЗДЕЛЕННЫХ МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И ОКРАШЕННЫХ СЕРЕБРОМ

Е. Б. ОКОН<sup>1</sup>, Й. ХРАНИСЛАВЛЕВИЧ<sup>2</sup>, Д. ВУЧЕЛИЧ<sup>3</sup>, Ю. Г. КАМИНСКИЙ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия  
142292; ФАКС (0967) 790553; E-mail: kaminsky@trik.itb.serpukhov.su

<sup>2</sup>Институт общей и физической химии, Белград, Югославия 11000

<sup>3</sup>Факультет физической химии Белградского университета, Белград, Югославия  
11000

Описан метод окрашивания серебром белков, фракционированных гель-электрофорезом, как новый способ комплексного анализа биологических жидкостей, дающий ценную диагностическую информацию и позволяющий производить количественное определение индивидуальных белков в моче и перитонеальной жидкости, в частности при почечных заболеваниях.

**Ключевые слова:** белки мочи, окрашивание серебром

**ВВЕДЕНИЕ.** Окрашивание серебром электрофоретически разделенных белков обеспечивает высокую чувствительность при их количественном определении, но сложность и низкая воспроизводимость процедуры ограничивают применение этого метода. Между тем, его аккуратное использование может оказаться незаменимым для диагностики, например, почечных патологий различного генеза, поскольку метод дает наиболее полную картину протеинурии и потенциально полезен для количественной оценки индивидуальных белков в сложной смеси.

**МЕТОДИКА.** Для окрашивания серебром полос белков мочи и перитонеальной жидкости после электрофореза в плоском геле с додецилсульфатом натрия (градиент полиакриламида 5 - 22,4%; размер пластинки геля 260x120x0,5 мм; число мест для образцов - 18) мы применили модификацию метода, описанного в работе [1] и основанного на насыщении геля с белком ионами серебра в 0,1% растворе азотнокислого серебра в течение 30 мин с последующим восстановлением 0,05% раствором формальдегида в 3% растворе Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> до появления полос. Вначале белковые полосы окрашивали в растворе Кумасси голубого G-250 общепринятым способом. Затем производилось окрашивание серебром после обесцвечивания пластинки геля от Кумасси до такой степени, что фон полностью терял окраску. Последовательное двойное окрашивание полос (Кумасси голубым и серебром) резко повышало чувствительность метода. Все этапы процедуры окрашивания серебром проводились (и желательно проводить) при красном свете.

Сканирование окрашенных серебром гелей производили с помощью денситометра Ultrosan XL фирмы «LKB» (Швеция); результаты сканирования переводились в цифровой код и обсчитывали компьютером в программе Gelscan фирмы «LKB» (Швеция). Для расчетов использовали интеграл светопоглощения полосы белка на длине волны 633 нм. Сканирование пластинки с полосами белков во влажном состоянии повышало точность измерения малых концентраций белков, так как при высушивании геля темнел фон.

Рассчитывали концентрацию 5 белков:  $\beta_2$ -микроглобулина (мол. масса. 11800), ретинолсвязывающего белка (мол. масса. 22400),  $\alpha_1$ -микроглобулина (мол. масса. 31000), альбумина (мол. масса. 67000) и  $\gamma$ -иммуноглобулина (мол. масса. 160000). Это белки, которые попадали в мочу из плазмы крови, обуславливая протеинурию смешанного типа (гломерулярная + тубулярная). Для построения калибровочных кривых на каждую пластинку геля помещали смесь перечисленных белков в пяти различных концентрациях от 12,5 до 200 мг/мл, что в основном перекрывает диапазон концентраций этих белков в анализируемых образцах мочи или перитонеальной жидкости. Поскольку окрашивание серебром весьма чувствительно к изменению условий [2], важно, чтобы все реагенты были высокой степени чистоты, растворы готовились на деионизированной воде.

Чувствительность метода достигала 1-2 мг/л для белков, дающих узкую полосу при электрофорезе (таких, как  $\beta_2$ -микроглобулин и ретинолсвязывающий белок), и 2-4 мг/л для белков, дающих диффузные полосы ( $\alpha_1$ -микроглобулин и  $\gamma$ -иммуноглобулин). Воспроизводимость метода лучше 10%-ой при концентрации белков 10-90 мг/л и много лучше при более высоких концентрациях анализируемых белков.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Метод применен для анализа образцов мочи и перитонеальной жидкости, полученных у 91 пациента в возрасте от 35 до 60 лет. Все пациенты страдали различными почечными болезнями (пиелонефрит, гломерулонефрит, хронический нефрит, балканская эндемическая нефропатия), имели протеинурию на уровне от 50 до 1600 мг/л и рН мочи от 5 до 7,5. У 23 больных протеинурию анализировали в динамике болезни, так что общее количество проанализированных образцов мочи превышало 400. Образцы перитонеальной жидкости отбирали у 8 больных, находящихся на перитонеальном диализе; концентрация белка в этих образцах варьировала от 272 до 1575 мг/л.

На рис. 1 приведена типичная денситограмма белков мочи и перитонеальной жидкости, на рис. 2 - результат компьютерного моделирования распределения белков в моче и перитонеальной жидкости, представленного на рис. 1.

На рис. 1 справа (на рис. 2 сверху) от полосы альбумина - низкомолекулярные белки, слева (снизу) - высокомолекулярные. Преобладание высокомолекулярных белков в моче в большинстве случаев совпадало с диагнозом гломерулонефрита, а преобладание низкомолекулярных белков - с диагнозом пиелонефрита. Балканская эндемическая нефропатия, как и хронический нефрит, характеризовалась смешанной формой протеинурии, при которой содержание низкомолекулярных и высокомолекулярных белков в моче сопоставимо с ранее опубликованными данными [3].

Около 70% всего количества белка в моче больных представлено альбумином. Содержание  $\gamma$ -иммуноглобулина могло достигать 200 мг/л при протеинурии гломерулярного или смешанного типа. Низкомолекулярные белки ( $\beta_2$ -микроглобулин, ретинолсвязывающий белок и  $\alpha_1$ -микроглобулин) обычно представлены в концентрациях до 80 мг/л при протеинурии смешанного типа (тубулярная вместе с гломерулярной) и до 50 мг/л при чисто тубулярной протеинурии (при которой общая концентрация белка в моче не превышала 500 мг/л). Обнаружена прямая корреляция между концентрациями индивидуальных низкомолекулярных белков, а также между концентрацией каждого из них и



концентрациями трансферрина и  $\gamma$ -иммуноглобулина: коэффициенты корреляции близки к значению 0,7 для всей обследованной группы больных и достигали 0,96 при построении корреляционной зависимости в динамике. В тех особых случаях, когда моча имела рН 5,5 и ниже, из корреляционной связи выпадала резко сниженная концентрация  $\beta_2$ -микроглобулина. Это обусловлено, вероятно, нестабильностью  $\beta_2$ -микроглобулина в кислой среде [4] и устранялось приемом пациентами раствора соды за 8 час до отбора образца мочи.

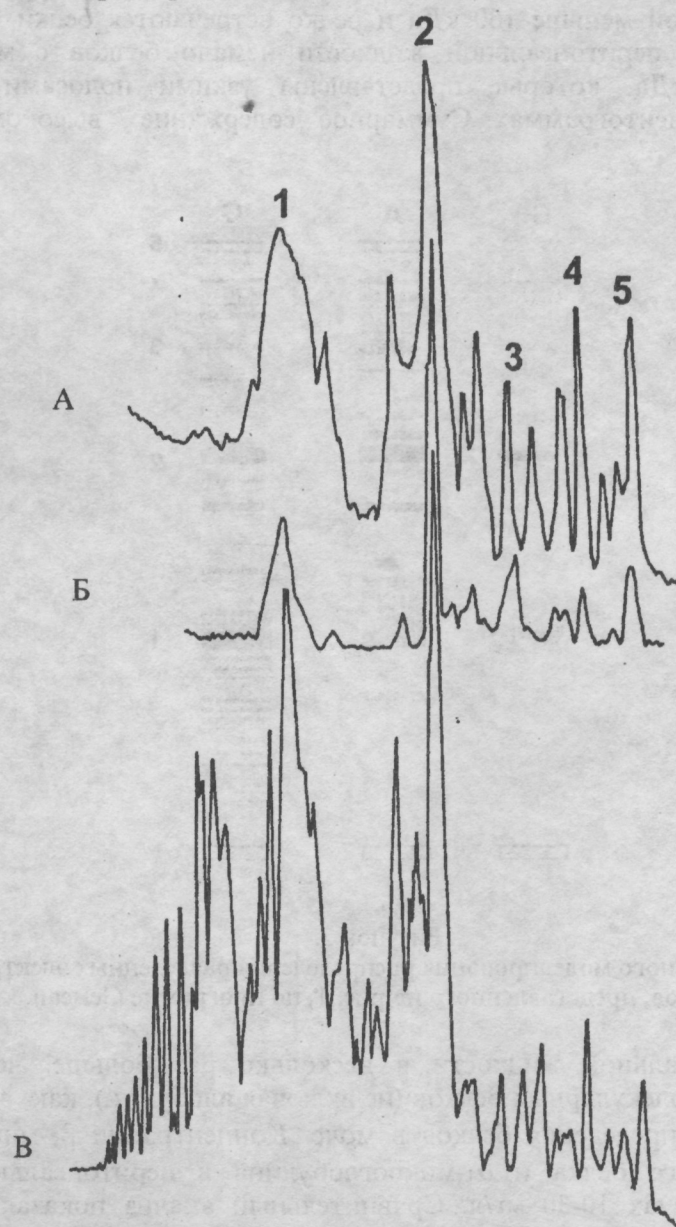


Рисунок 1.

Денситограмма окрашенных серебром полос белков в двух образцах мочи (А - хронический нефрит, смешанная форма протеинурии; Б - пиелонефрит, тубулярная форма протеинурии) и в перитонеальной жидкости (В). 1 -  $\gamma$ -иммуноглобулин, 2 - альбумин, 3 -  $\alpha_1$ -микроглобулин, 4 - ретинолсвязывающий белок, 5 -  $\beta_2$ -микроглобулин.

Корреляция наблюдалась только между концентрациями тех белков, которые появились в моче из плазмы крови, и, следовательно, такая протеинурия связана с нарушением гломерулярной фильтрации и реабсорбции белков. Белок Том-Хорсвола, который секретируется в мочу клетками почечных канальцев, не коррелировал с другими белками мочи. Этот белок обнаруживался в моче пациентов

с пиелонефритом и балканской эндемической нефропатией в 75% случаев, у больных с гломерулонефритом и хроническим нефритом - в 50%, причем он являлся доминирующим белком (после альбумина) для 63% больных с пиелонефритом.

В перитонеальной жидкости белковых полос значительно больше, чем в моче, особенно в высокомолекулярной области. На электрофореграммах и денситограммах отчетливо видны до 40 полос - 15 низкомолекулярных и 25 высокомолекулярных белков. Если в моче даже при гломерулонефрите обычно нет белков с мол. массой меньше 160 кДа и редко встречаются белки с мол. массой 200-250 кДа, то в перитонеальной жидкости немало белков с мол. массой в несколько сотен кДа, которые представлены узкими полосами на электрофореграммах и денситограммах. Суммарное содержание высокомолекулярных

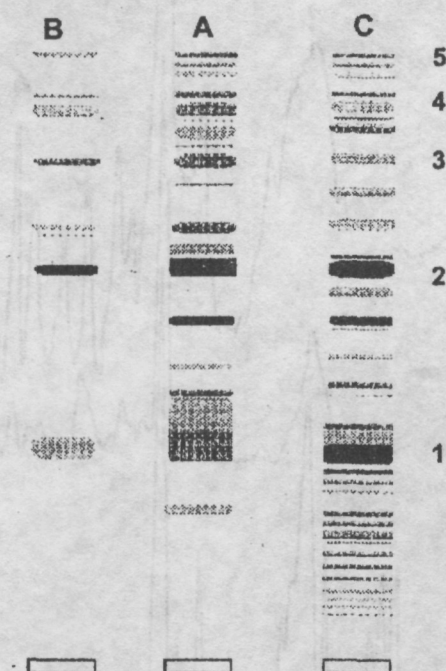


Рисунок 2.

Результат компьютерного моделирования распределения разделенных электрофоретически белков, представленного на рис. 1, по программе Gelscan.

белков в перитонеальной жидкости в несколько раз больше, чем суммарное содержания низкомолекулярных белков (не включая альбумин), как в плазме крови и в отличие от распределения белков в моче. Концентрации  $\beta_2$ -микроглобулина, ретинолсвязывающего белка и  $\alpha_1$ -микроглобулина в перитонеальной жидкости находились в пределах 10-30 мг/л. Сравнительный анализ показал, что во всех образцах перитонической жидкости имелись все белки плазмы крови. Белковые полосы находились в тех же миграционных положениях, что и белки плазмы, и не отличаясь от них по ширине и окраске. Это касалось и  $\alpha_1$ -микроглобулина, который после выделения мигрирует в изолированной форме быстрее, чем в нативном образце, как если бы его мол. масса уменьшилась на 3 кДа в процессе выделения. Относительная интенсивность окрашивания некоторых белков в двух биологических жидкостях различна. Например,  $\alpha_1$ -микроглобулин является доминирующим белком в своей области (25-40 кДа) во всех образцах мочи, но этого нет в перитонеальной жидкости.

Приведенные данные показывают, что окрашивание серебром белков, разделенных электрофоретически, является чувствительным методом комплексного

анализа биологических жидкостей, дающим ценную диагностическую информацию и позволяющим производить количественные и сравнительные оценки содержания индивидуальных белков.

Работа выполнена частично при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект поддержки научных школ № 96-15-98080 и проект поддержки научных исследований № 98-04-48548).

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Gorg A., Postel W., Wesser J., Schiwara N. W., Boesken W.H. (1985) *Sci. Tools.* 32, 5-9.
- 2 Окон Е.Б., Марьянович В., Хранисавлевич Й., Вучелич Д. (1996) *Биохимия.* 61, 2082-2091
- 3 Rajcevic S. S., Trnacevic S., Hranisavljevic J., Vucelic D. (1991) *Kidney Int.*, 40, S52-S56
- 4 Davey P.G., Gosting P. (1982) *Clin. Chem.*, 28, 1330-1333

Поступила 13.01.99 г.

## COMPARATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF PROTEINS IN URINE AND PERITONEAL FLUID FRACTIONED WITH SDS-ELECTROPHORESIS AND STAINED WITH SILVER

E.B.OKON<sup>1</sup>, J. HRANISAVLJEVIC<sup>2</sup>, D. VUCELIC<sup>3</sup>, Y.G. KAMINSKY<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Russia, 142292; FAX: (0967) 790553; E-mail: kaminsky@trik.itb.serpukhov.su

<sup>2</sup>Institute of Common and Physical Chemistry, Belgrade, Yugoslavia 11000

<sup>3</sup>University of Belgrade, Faculty of Physical Chemistry, Belgrade, Yugoslavia 11000

The method for the silver staining of proteins fractionated with SDS electrophoresis is described as a new approach for the complex analysis of biological fluids allowing to obtain the valuable diagnostic information and to determine quantitatively individual proteins in urine and peritoneal fluid, in particular in nephropathologies.

**Keywords:** urinary proteins, silver staining