

УДК 543.422.7::577.112.825'34'387.4

© Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТРИПТОФАНА В БЕЛКАХ НА ВОЗМОЖНОСТЬ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОТОХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ С *n*-ДИМЕТИЛАМИНОБЕНЗАЛЬДЕГИДОМ

*Е.А. Никитенко, В.Г. Зайцев, О.В. Островский**

Волгоградский государственный медицинский университет, кафедра
теоретической и клинической биохимии, 400131, Волгоград, пл. Павших борцов, 1;
тел.: +7 (8442) 38-53-63; эл. почта: ol_ostr@mail.ru

Приведен анализ взаимодействия 10-ти белков с различным содержанием Trp с *n*-диметиламинобензальдегидом (ПДАБА). Полученные данные показали наличие прямой корреляции между оптической плотностью продуктов реакции ПДАБА с белками от содержания в них Trp (коэффициент корреляции Спирмена $R=0,936$; $p<0,001$). Установленная зависимость позволила смоделировать взаимодействие ПДАБА с 10 наиболее важными глобулинами крови человека и оценить их вклад в результаты анализа сыворотки крови. Это дало возможность обосновать перспективы применения исследованного метода для количественного определения глобулинов в сыворотке крови.

Ключевые слова: белки, иммуноглобулины, триптофан, *n*-диметиламинобензальдегид.

ВВЕДЕНИЕ. В клинике достаточно широко применяется определение белковых фракций сыворотки крови. Относительно недавно Susuki Y. предложил простой и доступный метод определения глобулинов, основанный на фотохимической реакции с *n*-диметиламинобензальдегидом (ПДАБА). Автор указанной работы исследовал взаимодействие ПДАБА только с альбумином, иммуноглобулином, трансферрином и белками IV фракции Кона [1].

Сыворотка крови многокомпонентна. Поэтому для корректной оценки применимости метода ПДАБА необходимо учитывать его специфичность к различным глобулинам. Но непосредственно исследовать взаимодействие белков с ПДАБА достаточно трудно: некоторые компоненты сыворотки выделить в достаточном количестве очень сложно, а их коммерческие препараты дороги или недоступны. Известно, что ПДАБА избирательно взаимодействует с остатками Trp в белковой молекуле [2]. В настоящей работе мы попытались решить вопрос о специфичности обсуждаемого метода, выявив закономерность зависимости ОП продуктов реакции ПДАБА с белками от содержания в них Trp. Если такая зависимость существует, то будет возможным предсказать результаты анализа белков, для которых препараты высокой чистоты недоступны или дороги.

МЕТОДИКА. В работе были использованы *n*-диметиламинобензальдегид (ПДАБА), HCl, NaCl фирмы "Реахим" (Россия); липоксигеназа сои, рибонуклеаза панкреатическая бычья фирмы "Serva" (Германия); иммуноглобулин человеческий нормальный фирмы "Биомед" (Россия); трипсин бычий фирмы "Spofa a.s." (Чехия); церулоплазмин человеческий нормальный фирмы "Микроген" (Россия); гексокиназа бычья фирмы "Sigma" (США); альбумин бычий сывороточный фирмы "Диа-М" (Россия); гемоглобин бычий фирмы "ICN Biomedicals" (США); пероксидаза хрена фирмы "Reanal" (Венгрия); супероксиддисмутаза бычья эритроцитарная фирмы "Roche Applied Science" (Швейцария). Все растворы белков готовили на основе изотонического раствора NaCl.

*Адресат для переписки

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА ФОТОХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Концентрацию глобулярных белков в растворах определяли фотохимическим методом, описанным в [1]. Анализ проводили следующим образом. К 2 мл 1% (масса/объем) раствора ПДАБА в 8,4 М HCl добавляли 0,48 мл H₂O и 0,03 мл исследуемой пробы. Реакционную смесь инкубировали 45 минут при комнатной температуре и при освещении люминесцентными лампами со световым потоком 3000 люмен. Оптическую плотность (ОП) окрашенного продукта измеряли при длине волны 635 нм.

Относительное содержание остатков Trp в молекулах белков рассчитывали, используя данные по первичной структуре из UniProt Knowledgebase сервера ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.org/sprot/>). Данные по референтным пределам концентраций белков в сыворотке крови человека взяты из работы [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Для выявления характера и степени зависимости интенсивности окраски реакционной смеси от относительного содержания Trp мы проанализировали результаты взаимодействия ПДАБА с глобулярными белками различной природы. Исследуемые образцы представляли собой растворы белков с концентрациями от 3,67 до 36,67 г/л. По результатам анализа были построены калибровочные графики (рис. 1). С использованием метода линейной регрессии были рассчитаны значения коэффициента чувствительности S , численно равного величине тангенса угла наклона калибровочной прямой (табл. 1). Результаты одностороннего t-теста показали, что в случае исследованных белков величина коэффициента b достоверно не отличима от 0 ($p=0,254$). Таким образом, зависимость оптической плотности продуктов реакции от концентрации белка может быть выражена формулой:

$$A_{635} = S \times C, \quad (1)$$

где A_{635} – оптическая плотность реакционной смеси при длине волны 635 нм, S – коэффициент чувствительности для каждого белка, C – концентрация белка в образце, г/л.

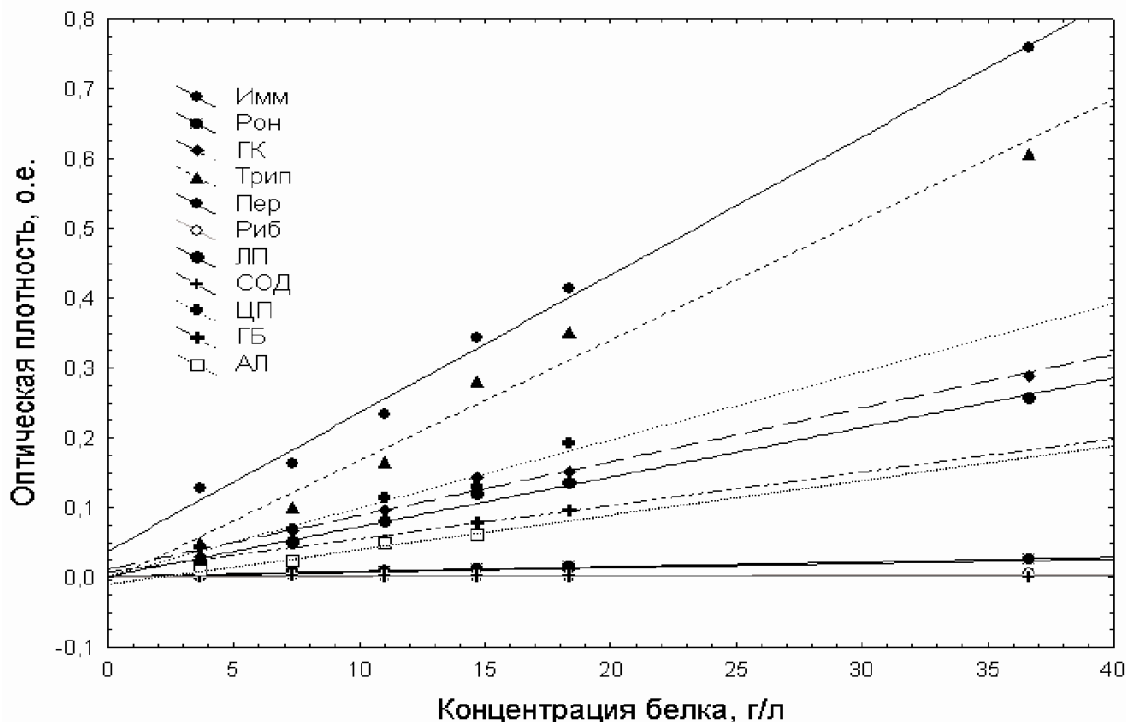


Рисунок 1.

Калибровочные графики для определения глобулярных белков фотохимическим методом с ПДАБА. Условные обозначения: АЛ – альбумин, ГБ – гемоглобин, ГК – гексокиназа, Имму – иммуноглобулин, ЛП – липоксигеназа, Пер – пероксидаза, Риб – рибонуклеаза, Рон – ронидаза, СОД – супероксиддисмутаза, Трип – трипсин, ЦП – церулоплазмин.

Таблица 1. Относительное содержание Тгр (в %) и коэффициенты уравнений линейной регрессии калибровочных прямых белков исследованных методом с ПДАБА.

Белок	Молярное содержание Тгр, %	Коэффициенты уравнения регрессии, $A_{635}=a \times C + b$	
		a	b
Иммуноглобулин	2,6	0,0198	0,0379
Трипсин	2,15	0,0173	-0,0051
Церулоплазмин	1,7	0,0098	0,002
Липоксигеназа	1,6	0,0071	0,0016
Гемоглобин	1,04	0,0048	0,0077
Гексокиназа	0,54	0,0077	0,0117
Альбумин	0,34	0,005	-0,0095
Пероксидаза	0,33	0,0006	0,0011
Рибонуклеаза	0	0,0001	-0,0003
СОД	0	$-3,934 \cdot 10^{-5}$	0,0029

Примечание: * - A_{635} – оптическая плотность реакционной смеси при длине волны 635 нм; С – концентрация белка в образце, г/л

Для оценки степени взаимосвязи между коэффициентом чувствительности S и относительным молярным содержанием Тгр в молекулах исследованных белков рассчитывали ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Полученный результат ($R=0,936$; $p<0,001$) свидетельствует о наличии статистически достоверной сильной положительной связи между величинами. Для выявления характера зависимости коэффициента чувствительности от относительного содержания Тгр была построена диаграмма рассеяния (рис. 2). Ее анализ показал, что указанная зависимость с хорошей степенью согласия описывается уравнением:

$$S = (0,0068 \pm 0,0010) \times [\text{Тгр, \%}] + (0,0002 \pm 0,0013), \quad (2)$$

где S – коэффициент чувствительности определения концентрации белка; [Тгр, %] – молярное содержание Тгр в молекуле белка. Величины коэффициентов приведены с указанием ошибки.

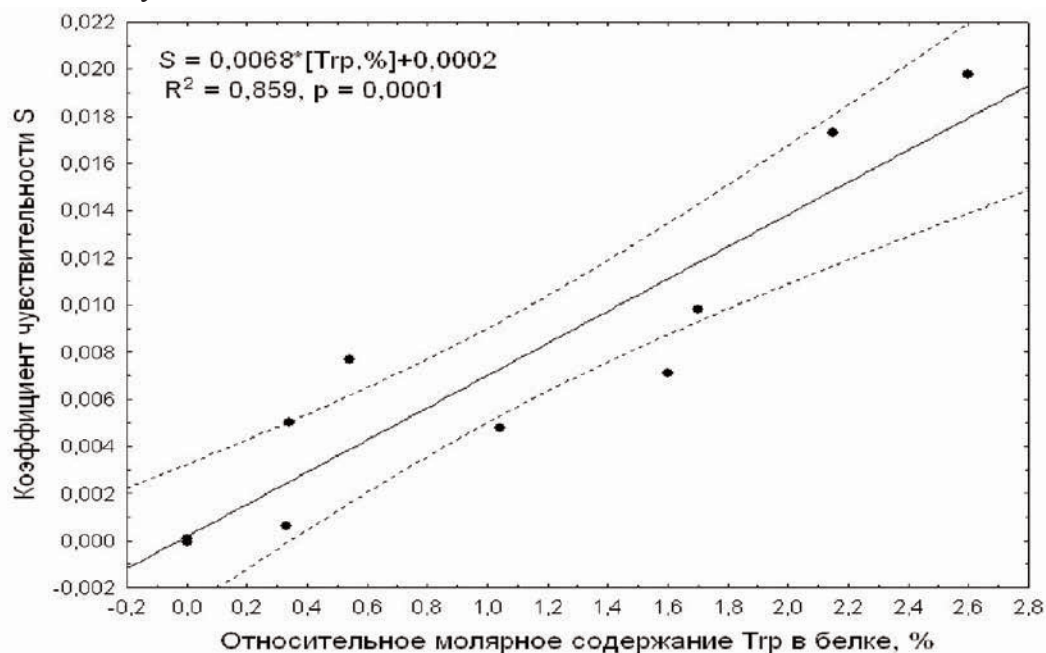


Рисунок 2.

Диаграмма рассеяния и регрессионная прямая для зависимости коэффициента чувствительности S определения белков фотохимическим способом с ПДАБА и относительным содержанием Тгр в исследованных белках. Регрессионная прямая приведена с указанием 95%-ного доверительного интервала.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА ФОТОХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Высокая корреляция между относительным содержанием Тгр и коэффициентом чувствительности S может позволить спрогнозировать возможность взаимодействия различных белков с ПДАБА при условии, что нам известно содержание Тгр в этих белках. Такой прогноз важен для оценки способности белков сыворотки крови вступать в реакцию с ПДАБА. В этом случае, зная содержание белков в сыворотке крови, можно предсказать их вероятный вклад в ОП продуктов взаимодействия ПДАБА и сыворотки.

Для прогноза мы отобрали белки, содержащиеся в сыворотке крови в концентрации выше 0,2 г/л и с известным содержанием Тгр (табл. 2). Алгоритм прогноза выглядел следующим образом. Вначале с использованием уравнения (2) мы рассчитали величину прогнозируемого коэффициента чувствительности и границы его 95% доверительного интервала. Затем, с помощью полученных значений и уравнения (1) мы получили прогнозируемые границы ОП продуктов реакции каждого белка с ПДАБА. Все рассчитанные показатели приведены в таблице 3. Мы также рассчитали прогнозируемые величины для иммуноглобулинов и сравнили их с экспериментальными данными. Результат такого сравнения показал очень хорошее согласие между экспериментальными и расчетными величинами ОП для всех концентраций (данные не приводятся).

Таблица 2. Концентрация белков сыворотки крови в норме и молярное содержание Тгр (в %).

Белок	Концентрация в сыворотке крови человека, г/л	Молярное содержание Тгр, %
Иммуноглобулины	6,55-24,23	2,6
α_2 -макроглобулин	1,5-4,2	0,76
Трансферрин	2,15-3,8	1,18
Гаптоглобин	0,4-2,4	1,97
α_1 -антитрипсин	0,78-2,00	0,51
Компонент комплемента C ₃	0,83-1,93	1,04
α_1 -кислый гликопротеин	0,55-1,4	1,64
Компонент комплемента C ₄	0,1-0,675	1,15
Преальбумин	0,1-0,4	1,57
Компонент комплемента C ₉	0,033-0,25	0,74

Таблица 3. Значения величины прогнозируемого коэффициента чувствительности и прогнозируемой оптической плотности.

Белок	Прогнозируемый коэффициент чувствительности*	Прогнозируемая оптическая плотность
Иммуноглобулины	0,0282 (0,0228-0,0335)	0,149-0,813
α_2 -макроглобулин	0,0054 (0,00001-0,0107)	0,000-0,045
Трансферрин	0,0082 (0,0029-0,0136)	0,006-0,052
Гаптоглобин	0,0136 (0,0083-0,0190)	0,003-0,046
α_1 -антитрипсин	0,0037 (-0,0017-0,0090)	-0,001-0,018
Белок комплемента C ₃	0,0073 (0,0019-0,0126)	0,002-0,024
α_1 -кислый гликопротеин	0,0114 (0,0060-0,0167)	0,003-0,023
Белок комплемента C ₄	0,0080 (0,0027-0,0134)	0,000-0,009
Преальбумин	0,0109 (0,0055-0,0163)	0,001-0,007
Белок комплемента C ₉	0,0052 (-0,0001-0,0106)	0,000-0,003

Примечание: * - В скобках приведены значения 95%-ного доверительного интервала.

Анализ данных по вероятной ОП продуктов реакции белков сыворотки крови с ПДАБА показывает, что около 78% суммарной ОП для цельной сыворотки обеспечивается фракцией иммуноглобулинов. Оставшаяся четверть определяется некоторыми другими глобулярными белками. Это позволяет полагать, что фотохимический метод с ПДАБА имеет перспективы использования в медицинской лабораторной практике для определения глобулинов сыворотки крови с более высокой чувствительностью к иммуноглобулинам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Полученные нами данные продемонстрировали наличие достоверной положительной корреляции между содержанием Trp в белках и ОП продуктов фотохимической реакции соответствующих белков с ПДАБА. Наличие этой взаимосвязи позволило спрогнозировать вклад белков сыворотки крови в образование продуктов реакции с ПДАБА и обосновать перспективность применения описанного метода для количественного определения глобулинов сыворотки крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Suzuki Y. (2000) Anal. Sci., **16**, 145-149.
2. Shorato N., Okuyama G. (1956) J. Pharmac. Soc. Japan, **6**, 620-624.
3. Туц Н.У. (ред.) (1997) Энциклопедия клинических лабораторных тестов. Москва.: Лабинформ.

Поступила: 11. 09. 2006.

INFLUENCE OF TRYPTOPHAN CONTENT IN PROTEINS ON THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF THIS PROTEINS USING PHOTOCHEMICAL *p*-DIMETHYLAMINO BENZALDEHYDE

E.A. Nikitenko, V.G. Zaitsev, O.V. Ostrovskij

Department of Basic and Clinical Biochemistry, Volgograd State Medical University, pl. Pavshikh Bortzov, 1, Volgograd, 400131 Russia; tel.: +7(8442) 38-53-63; e-mail: ol_ostr@mail.ru

The interaction of proteins containing various number of Trp residues with *p*-dimethylaminobenzaldehyde (pDABA) was studied. A positive correlation between tryptophan content in proteins and absorbance of protein-pDABA reaction products was found (Spearman's correlation coefficient $R=0,936$; $p<0,001$). Using the observed correlation we were able to predict a possible range for the absorbance of reaction products for each serum globulin and estimate the contribution of different globulins in the pDABA serum assay. We propose that the described method can be used for the determination of the globulin content in blood serum.

Key words: proteins, immunoglobulins, *p*-dymethylaminobenzaldehyde, tryptophan.