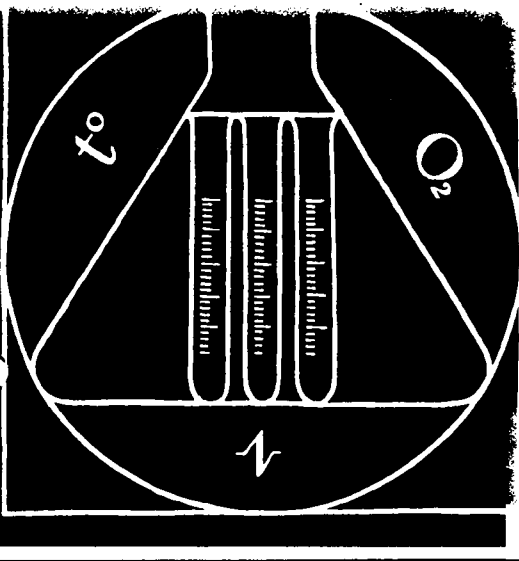


ЛАБОРАТОРНОЕ ДЕЛО 2



Москва
Медицина. 1986

Передовые

Коагулология

Цитология

Гематология

Биохимия

Иммунология

Микробиология

Организация лабораторной службы

В помощь практическому работнику

А. С. Аврунин, Т. Д. Четверикова

К ВОПРОСУ О ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АМИДО ЧЕРНОГО 10В И КУМАССИ БРИЛЛИАНТОВОГО ГОЛУБОГО R-250 ДЛЯ ОКРАСКИ ДИСКЭЛЕКТРОФОРЕГРАММ СЫВО- РОТКИ КРОВИ

Ленинградский НИИ травматологии и ортопедии им. Р. Р. Вредена

В настоящее время метод диск-электрофореза белков сыворотки крови в полиакриламидном геле (ПААГ) все шире внедряется в практическое здравоохранение. Однако в таких исследованиях применяются различные красители, что затрудняет сравнительный анализ полученных результатов. Чаше других используются амидо черный 10В и кумасси бриллиантовый голубой R-250 и в связи с этим нами проведено исследование, имеющее целью установить, зависят ли частота выявления и содержание отдельных белковых фракций от вида применяемого красителя.

Провели 233 исследования сыворотки крови у 177 доноров методом диск-электрофореза в ПААГ; в 130 случаях в качестве красителя использовали амидо черный 10В, в 103 — кумасси бриллиантовый голубой R-250.

Электрофоретическое разделение белков сыворотки крови в ПААГ проводили по методу Ornstein и Davis, описанному Г. Маурер [3], в типовом аппарате фирмы «Реанал» — «Модель-71» (ВНР). На время электрофоретического разделения камеру для электрофореза помещали в холодильник при температуре 4 °С. Первые 15 мин сила тока 2 мА на гель, затем 5 мА. Каждая исследуемая проба сыворотки содержала $2 \cdot 10^{-4}$ г белка. В качестве индикаторного красителя использовали бромфеноловый синий. Электрофорез заканчивали тогда, когда полоса индикаторного красителя находилась на расстоянии 3—5 мм от конца геля. Диск-электрофореграммы окрашивали в течение 45 мин амидо черным 10В или кумасси бриллиантовым голубым R-250.

Результаты исследования сывороток крови доноров методом диск-электрофореза в ПААГ при окраске амидо черным 10В и кумасси бриллиантовым голубым R-250

Зоны и фракции (ед. отн. подвижности)	Окраска амидо черным 10В (n = 130)			Окраска кумасси бриллиантовым голубым R-250 (n = 103)		
	частота выявления, %	содержание фракции, г/л	среднее квадратическое отклонение	частота выявления, %	содержание фракции, г/л	среднее квадратическое отклонение
Преальбуминовая	—	—	—	68,9	2,11	0,42
2,70	—	—	—	70,9	0,47	0,26
2,47	99,2	0,82	0,23	100,0	1,65	0,42
Альбуминовая	100,0	18,36	1,81	100,0	17,01	1,66
Постальбуминовая	100,0	9,94	2,03	100,0	13,54	2,47
1,51	38,5	1,78	0,88	15,5	3,01	0,98
1,48	41,5	1,78	0,55	18,4	2,12	0,57
1,40	36,9	1,27	0,45	3,9	1,50	0,55
1,37	34,6	1,09	0,53	10,7	1,55	0,50
1,28	67,7	1,33	0,36	68,0	2,13	0,60
1,20	27,7	1,00	0,44	28,2	1,75	0,50
Трансферриновая	100,0	9,17	1,52	100,0	10,41	2,57
1,14	22,3	1,20	0,68	13,6	2,36	0,81
1,07	16,2	1,38	0,48	10,7	1,92	0,41
0,95	2,3	1,89	1,33	0,9	—	—
Посттрансферриновая	100,0	4,52	1,29	100,0	6,15	1,35
0,86	36,9	1,03	0,60	12,6	1,80	0,70
0,76	66,2	2,19	0,83	60,2	3,30	1,01
0,66	33,1	1,15	0,39	40,8	2,30	0,98
Быстрые глобулины	100,0	22,21	2,62	100,0	18,39	2,55
0,59	70,0	2,60	0,87	45,6	2,98	0,50
0,53	15,4	1,86	0,88	22,3	2,51	0,46
0,47	18,5	1,98	1,26	2,9	1,50	0,70
0,42	20,8	2,21	1,22	9,7	2,22	0,74
0,35	13,8	2,00	0,64	5,8	2,09	0,65
0,32	10,8	1,67	0,71	2,9	1,58	0,39
0,25	13,8	1,96	0,87	7,8	1,60	0,33
0,23	13,1	1,58	0,35	2,9	1,30	0,27
0,21	9,2	1,47	0,50	5,8	1,83	0,74
0,18	7,7	1,55	0,58	6,8	1,49	0,83
0,16	11,5	1,64	0,62	3,9	0,98	0,26
0,13	11,5	1,27	0,38	2,9	1,06	0,12
0,12	10,0	1,50	0,82	4,8	0,92	0,24
Стартовая	100,0	6,32	1,49	100,0	6,17	1,49
0,10	86,9	2,72	0,86	51,5	2,51	0,69
0,04	86,9	3,56	1,03	51,5	3,39	1,06

Примечание: Подчеркнуты значения, достоверно более высокие по сравнению с аналогичными показателями при другом методе окраски ($p < 0,05$).

Состав красящих растворов. (1)

Амидо черный 10В—0,3 г, ледяная уксусная кислота — 10 мл, вода дистиллированная — до 100 мл. (2) Кумасси бриллиантовый голубой R-250—0,1 г, 96 % спирт этиловый — 30 мл, кислота трихлоруксусная — 30 г, вода дистиллированная — до 100 мл.

Для удаления избытка красителя гель помещали в 7 % раствор уксусной кислоты, который периодически меняли до полной отмывки фореграмм. Денситометрию диск-электрофореграмм проводили на микрофотометре МФ-4. Полученные данные записывали на самописце Н-37. Денситограмму расшифровывали, исходя из относи-

тельной подвижности трансферрина, которую принимали за единицу. Пользовались таблицей относительной подвижности фракций, представленной в работе Г. Маурер [3].

Полученные в данном исследовании денситограммы разделены на 7 зон. Границы зон проведены на участках, в которых наиболее редко происходит наложение фракций. Выделены следующие зоны: преальбуминовая (2,70—2,35), альбуминовая (1,86), постальбуминовая (1,51—1,20), трансферриновая (1,14—0,95), посттрансферриновая (0,86—0,62), быстрых глобулинов (0,59—0,12), стартовая (0,10—0,04).

При сопоставлении полученных данных установлено, что частота выявления фракций зависит от применяемого красителя. Как видно из таблицы, частота выявления фракций с относительной подвижностью 1,51, 1,48, 1,40, 1,37, 0,86, 0,59, 0,47, 0,42, 0,35, 0,32, 0,25, 0,13, 0,12, 0,10, 0,04 при окраске амидо черным 10В статистически значимо выше, чем при окраске кумасси бриллиантовым голубым R-250 ($p < 0,05$). Фракция в зоне преальбуминов с относительной подвижностью 2,70, наоборот, выявляется только при окраске кумасси бриллиантовым голубым R-250 и не выявляется при окраске амидо черным 10В. На частоту выявления остальных фракций тип красителя существенного влияния не оказывает.

При сопоставлении данных о содержании отдельных фракций белков, полученных при окраске диск-электрофореграмм амидо черным 10В и кумасси бриллиантовым голубым R-250, установлены существенные различия. Как видно из таблицы, содержание альбумина (1,86) и быстрых глобулинов (0,59—0,12), а также фракции с подвижностью 0,16 статистически значимо выше при окраске амидо черным 10В, чем при окраске кумасси бриллиантовым голубым R-250. При использовании в качестве красителя кумасси бриллиантового голубого R-250 более высокое содержание белка выявляется суммарно в зоне постальбуминов (1,51—1,20) и у части фракций, входящих в эту зону (1,51, 1,48, 1,37, 1,28, 1,20), а также в зоне трансферрина (1,14—0,95), у части фракций в этой зоне (1,14, 1,07), зоне посттрансферринов (0,86—0,62) и у всех фракций в этой зоне, а в зоне быстрых глобули-

нов только у фракций с подвижностью 0,59 и 0,53. Содержание белка в остальных фракциях и в зоне старта не имеет статистически значимых различий в зависимости от метода окраски, хотя можно отметить, что в зоне быстрых глобулинов при окраске амидо черным 10В содержание большинства фракций несколько выше.

По-видимому, эти различия связаны с особенностями химической структуры белков, которые входят в состав этих фракций. В одних белках больше структур, связывающих амидо черный 10В, а в других — структур, связывающих кумасси бриллиантовый голубой R-250.

В литературе имеются указания на то, что при диск-электрофорезе в ПААГ количество белковых фракций является величиной переменной, колеблющейся в довольно широких пределах. В своих исследованиях В. П. Тихонов [6] выявлял от 12 до 25 фракций, Г. И. Бугаева и Л. В. Багрянов [1] — от 13 до 20 фракций, Е. И. Самсон и О. Ф. Гоцуляк [5] — от 18 до 27 фракций, Э. В. Шмакотина [7] — от 16 до 37 фракций и J. Pastewka и соавт. [8] — от 20 до 30 фракций белков в сыворотке крови. Причины непостоянности результатов, получаемых разными авторами, анализировались в работе J. Pastewka и соавт. [8]. Авторы показали, что частота выявления ряда белковых фракций сыворотки крови зависит от генетических характеристик обследуемого. В первую очередь это относится к фракциям гаптоглобина, выявление которых зависит от типа гаптоглобина. Кроме того, уменьшение числа фракций связано с их наслоением друг на друга. По-видимому, к наслоению отдельных фракций друг на друга приводит некоторое колебание их подвижности [4].

Как видно из результатов нашей работы, определенное влияние на частоту выявления отдельных фракций оказывает и метод окраски диск-электрофореграмм. Известно, что чувствительность при окраске белков кумасси бриллиантовым голубым R-250 примерно втрое выше, чем при окраске амидо черным 10В [2], но при исследовании такой сложной белковой смеси, как сыворотка крови, наблюдается парадоксальный эффект — повышение чувствительности красителя приводит

к снижению разрешающей способности метода диск-электрофореза. По-видимому с помощью кумасси бриллиантового голубого R-250 выявляются следовые количества белка, находящегося на границах фракций. Это приводит к увеличению их ширины, вследствие чего происходит более частое наслоение близко расположенных фракций, в результате их количество уменьшается. Следовательно, при изучении белкового состава сыворотки крови оптимальным красителем является амидо черный 10В. В то же время при изучении белковых фракций в зоне преальбуминов лучше использовать в качестве красителя высокочувствительный кумасси бриллиантовый голубой R-250, так как с помощью этого красителя выявляется преальбуминовая фракция с подвижностью 2,70.

Выводы. 1. Частота выявления белковых фракций на диск-электрофореграмме сыворотки крови в ПААГ зависит от типа красителя: разрешающая способность метода выше при использовании в качестве красителя амидо черного 10В и ниже при использовании кумасси бриллиантового голубого R-250.

2. Кумасси бриллиантовый голубой R-250 более рационально использовать при исследовании зоны преальбуминов.

3. Тип красителя оказывает существенное влияние на показатели, характеризующие концентрацию белка. Амидо черным 10В белки, входящие в зону альбуминов и быстрых глобулинов, красятся более интенсивно. Кумасси бриллиантовым голубым R-250 более интенсивно окрашиваются белки в зонах преальбуминов, постальбуминов, трансферринов, посттрансферринов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бугаева Г. И., Багрянов Л. В. — Лаб. дело, 1979, № 4, с. 210—212.
2. Вееке Б. — В кн.: Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу. М., 1977, с. 11—42.
3. Маурер Г. Диск-электрофорез: Перев. с нем. М., 1971.
4. Пирогова Т. Ф. — Теория и практика применения метода диск-электрофореза в полиакриламидном геле в клинико-биохимических исследованиях. Автореф. дис. докт. мед. наук. Рига, 1975.
5. Самсон Е. И., Гоцуляк О. Ф. — Лаб. дело, 1979, № 4, с. 212—214.
6. Тихонов В. П. — Там же, 1969, № 1, с. 665—669.

7. *Шмакотина Э. В.* — Там же, 1980, № 3, с. 131—133.
8. *Pastewka J. V., Neers A. T., Peacock A. C.* — Clin. chim. Acta, 1966, vol. 14, p. 219—226.

Поступила 15.01.85

THE EFFICACY OF AMIDO BLACK 10 B AND COOMASSIE BRILLIANT BLUE R-250 DYES FOR STAINING THE BLOOD SERUM DISC ELECTROPHOREGRAMS. A. S. *Avrunin, T. D. Chetverikova*

Relationship was studied between the method of disc electrophoregram staining and the frequency of detection of individual protein fractions and their blood serum levels. Blood serum protein composition was analyzed in 177 donors (233 tests) by the polyacrylamide gel (PAAG) disc electrophoresis; 130 disc electrophoregrams were stained with amido black 10 B and 103 ones with Coomassie brilliant blue R-250. The resolving power of the method was found to be higher when the amido black 10 B stain was employed; however, Coomassie brilliant blue R-250 is considered to be preferable in investigations of the prealbumin fractions. The levels of the detected individual protein fractions are related to the type of the stain employed in PAAG disc electrophoresis.