

К возможности определения белка в преломляющих средах глазного яблока крупного рогатого скота

В.М. Холод, доктор биологических наук, профессор кафедры химии;
В.П. Баран, кандидат биологических наук, доцент кафедры химии;
А.В. Бизунов, старший преподаватель кафедры химии (bizunov.andrei@yandex.by).

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» (210026, Республика Беларусь, Витебск, 1-я ул. Доватора 7/11 chemistrysavm@yandex.by).

Проведено экспериментальное сравнение основных методов количественного определения общего белка в таких преломляющих средах глазного яблока крупного рогатого скота, как хрусталик, стекловидное тело, внутриглазная жидкость.

Наилучшие результаты показывает метод Бредфорда. Он отличается высокой чувствительностью, воспроизводимостью и позволяет определять концентрацию общего белка при его низком содержании.

Спектрофотометрический метод уступает по селективности и чувствительности методу Бредфорда, но может быть использован при исследовании белка в стекловидном теле и внутриглазной жидкости.

Биуретовый метод наименее чувствителен и может быть использован только при исследовании общего белка в безъядерной части хрусталика, отличающейся высоким содержанием белка, сопоставимым с его содержанием в сыворотке крови.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, глазное яблоко, стекловидное тело, внутриглазная жидкость, хрусталик, общий белок.

To the possibility of protein determining in refractive media of cattle eye-bulb

V.M. Kholod, Grand PhD in Biological Sciences, Professor of Department of chemistry;
V.P. Baran, PhD in Biological Science, Assistant professor of Department of chemistry;
A.V. Bizunov, senior lecture of Department of chemistry (bizunov.andrei@yandex.by).

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine (210026, Republic of Belarus, Vitebsk, 1 st. Dovator 7/11).

An experimental comparison of the main methods of quantitative determination of total protein in such refractive media of the eyeball of cattle as the crystalline lens, vitreous body, intraocular fluid was carried out.

The Bradford method shows the best results. It is characterized by high sensitivity, reproductivity and allows determining the total protein at its low content.

The spectrophotometric method is inferior in selectivity and sensitivity to the Bradford method, but it can be used in the study of protein in the vitreous and intraocular fluid.

The biuretic method is the least sensitive and can be used only in the study of total protein in the nuclear-free part of the lens, characterized by a high protein content comparable to its content in blood serum.

Key words: cattle, eye-bulb, vitreous, intraocular fluid, lens, total protein.

Сокращения: ВГЖ — внутриглазная жидкость, КРС — крупный рогатый скот, СТ — стекловидное тело.

Введение

Определение содержания белка в органах и тканях животных — метод, который используют при диагностике различных патологий, функциональной характеристике органов и тканей и при изучении патогенеза заболеваний. Это широко распространенный тест, как в экспериментальной, так и в клинической биохимии. Наиболее часто объектом анализа служит сыворотка крови, а метод определения выбирают самый распространенный — биуретовый: простой в выполнении, не требующий сложных реактивов, легко поддающийся

автоматизации — он нашел широкое применение в биохимических исследованиях. Однако данный метод характеризуется относительно низкой чувствительностью. При исследовании биологических жидкостей с низким содержанием белка биуретовый метод становится малоэффективным или вообще не пригодным для точных количественных определений. Поэтому наряду с биуретовым методом определения белка используют ряд других, более чувствительных: спектрофотометрический, метод Лоури, метод Бредфорда. В основе этих методов лежат особенности химической структуры, состава и свойств белков, которые функционально связаны с их количественным содержанием.

Каждый из указанных методов имеет свои достоинства и недостатки, поэтому в конкретном случае используют наиболее адекватный, в зависимости от объекта исследования, содержания белка в биомате-

риале, физико-химических свойств и особенностей структуры белковой молекулы.

Данные, полученные при изучении биохимического состава тканей глазного яблока у человека, показали низкое содержание общего белка в ряде структур (ВГЖ, СТ). У КРС целенаправленные исследования биохимии белкового обмена отдельных структур глазного яблока практически не проводились.

Цель исследования

Провести экспериментальное сравнение основных методов количественного определения общего белка в некоторых преломляющих средах глаза КРС.

Материалы и методы

Для выбора методики определения общего белка в хрусталике, СТ и ВГЖ были проведены предварительные исследования содержания белка в указанных преломляющих средах глаза классическим биуретовым методом, описанным для сыворотки крови [1...3]. Согласно полученным результатам, содержание белка в гомогенатах цельного хрусталика находилось в интервале от 145 г/л до 168 г/л, что примерно в два раза выше, чем его содержание в сыворотке крови. Попытки количественного определения белка биуретовым методом в СТ и ВГЖ не дали положительных результатов, так как значения оптической плотности гомогенатов указанных структурных элементов глазного яблока находились на грани разрешающей способности данного метода. Поэтому были использованы методы определения белка с более высокой разрешающей способностью: спектрофотометрический метод в варианте Варбурга и Кристиана [4, 5] и метод Бредфорда [6...8].

Для исследований был использован биоматериал от 10 животных (быки в возрасте около года) у которых после убоя извлекалось глазное яблоко. В дальнейшем с помощью шприца брали образцы ВГЖ, а после удаления хирургическим путем роговицы и хрусталика — СТ. Каждый образец подвергали гомогенизации и центрифугированию при 3800 мин⁻¹ на лабораторной центрифуге СМ-12.

Для определения содержания общего белка в СТ по методу Бредфорда из 10 образцов после гомогенизации и центрифугирования отбирали 100 мкл надосадочной жидкости, добавляли 5 мл реактива Бредфорда. Оптическую плотность измеряли в кюветках с длиной оптического пути 1 см при длине волны 595 нм. Концентрацию общего белка в образцах определяли с помощью калибровочного графика, построенного по бычьему сывороточному альбумину.

Так как при использовании спектрофотометрического метода частично определяются и нуклеиновые кислоты, по причине близости максимумов поглощения электромагнитного излучения в ультрафиолетовой области (максимум поглощения для белка

около 280 нм, а для нуклеиновых кислот 260 нм), то чтобы исключить влияние содержания нуклеиновых кислот, оптическую плотность определяли по методу Варбурга и Кристиана, при двух значениях длин волн в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 10 мм. Содержание белка рассчитывали по формуле Калькара: $C_{\text{белка}} (\text{г/л}) = 1,55D_{280} - 0,76D_{260}$, где D_{280} — оптическая плотность при длине волны 280 нм, а D_{260} — оптическая плотность при длине волны 260 нм.

Хрусталик извлекали из глазного яблока с последующим его разделением на ядро и безъядерную часть. К полученному биологическому материалу добавляли 1,5 мл ТРИС-буфера (рН=7,3) с последующей гомогенизацией и центрифугированием в течении 15 мин.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований содержания общего белка в преломляющих средах глазного яблока биуретовым методом, методом Бредфорда и спектрофотометрическим методом представлены в таблицах 1...4.

Из представленных в таблице 1 данных видно, что при использовании биуретового метода даже при высоком содержании белка в безъядерной части хрусталика оптическая плотность принимала значения от 0,104 до 0,296, что говорит о низкой чувствительности метода.

Сопоставление данных биуретового и спектрофотометрического методов говорит о более значительной чувствительности последнего, что делает его более перспективным при определении белка в биологических жидкостях с низким его содержанием. Так, при использовании биуретового метода содержание белка 25,609 г/л соответствовала оптическая плотность 0,058, в то время как спектрофотометрическое определение в биологической жидкости с содержанием белка 1,836 г/л (то есть приблизительно в 14 раз более низким) соответствовало практически такое же значение оптической плотности — 0,059. Однако спектрофотометрический метод основан на определении двух компонентов — белка и нуклеиновых кислот при двух длинах волн, что снижает точность определения.

Из данных таблицы 4, можно сделать вывод, что метод Бредфорда дает лучшие результаты при количественном определении белка в преломляющих средах глазного яблока в сравнении с вышеуказанными методами. Данный метод обладает наиболее высокой чувствительностью и уже при низком содержании белка показатели оптической плотности принимают довольно высокие значения. Так, при использовании метода Бредфорда содержанию общего белка 0,972 г/л соответствует значению оптической плотности 0,680 (см. табл. 4). При использовании биуретового метода содержанию белка 42,997 г/л (в 44 раза выше) соответствует значение оптической плотности всего лишь 0,1, а концентрации 13,189 г/л —

1. Определение концентрации общего белка биуретовым методом
Determination of total protein concentration by biuretic method

№ п/п	D ₅₄₀ (ядро)	С белка, г/л	M±m	D ₅₄₀ (безъядерная часть)	С белка, г/л	M±m
1	0,076	33,061	28,756± 14,54	0,154	65,353	79,305± 25,90
2	0,100	42,997		0,163	69,079	
3	0,100	42,997		0,152	64,525	
4	0,048	21,469		0,177	74,875	
5	0,059	26,023		0,296	124,141	
6	0,036	16,501		0,269	112,963	
7	0,022	10,705		0,148	62,869	
8	0,058	25,609		0,254	106,753	
9	0,028	13,189		0,160	67,837	
10	0,129	55,003		0,104	44,653	

2. Спектрофотометрическое определение общего белка в стекловидном теле
Spectrophotometric total protein determination in the vitreous body

№	D ₂₈₀	D ₂₆₀	С белка, г/л	M±m
1	0,080	0,115	1,545	1,466±0,51
2	0,087	0,128	1,572	
3	0,099	0,168	0,962	
4	0,094	0,112	2,671	
5	0,064	0,094	1,162	
6	0,076	0,115	1,255	
7	0,087	0,128	1,572	
8	0,080	0,134	0,842	
9	0,086	0,130	1,425	
10	0,083	0,118	1,652	

3. Спектрофотометрическое определение общего белка в внутриглазной жидкости
Spectrophotometric total protein determination in intraocular fluid

№	D ₂₈₀	D ₂₆₀	С белка, г/л	M±m
1	0,050	0,054	1,627	2,031±0,81
2	0,059	0,066	1,836	
3	0,087	0,112	2,164	
4	0,052	0,066	1,328	
5	0,050	0,063	1,294	
6	0,079	0,106	1,806	
7	0,057	0,072	1,469	
8	0,122	0,155	3,110	
9	0,157	0,205	3,798	
10	0,131	0,206	1,876	

4. Определение концентрации общего белка в стекловидном теле и внутриглазной жидкости методом Бредфорда
Determination of the total protein concentration in the vitreous and intraocular fluid by the Bradford method

Стекловидное тело				Внутриглазная жидкость		
№ п/п	D ₅₉₅	С белка, г/л	M±m	D ₅₉₅	С белка, г/л	M±m
1	0,680	0,972	0,969±0,25	0,207	0,544	0,821± 0,45
2	0,488	0,798		0,238	0,572	
3	0,628	0,925		0,294	0,623	
4	1,403	1,626		0,410	0,728	
5	0,387	0,707		0,312	0,639	
6	0,582	0,883		0,241	0,575	
7	0,667	0,960		0,477	0,788	
8	0,588	0,889		0,920	1,189	
9	0,728	1,016		1,808	1,993	
10	0,610	0,909		0,222	0,558	

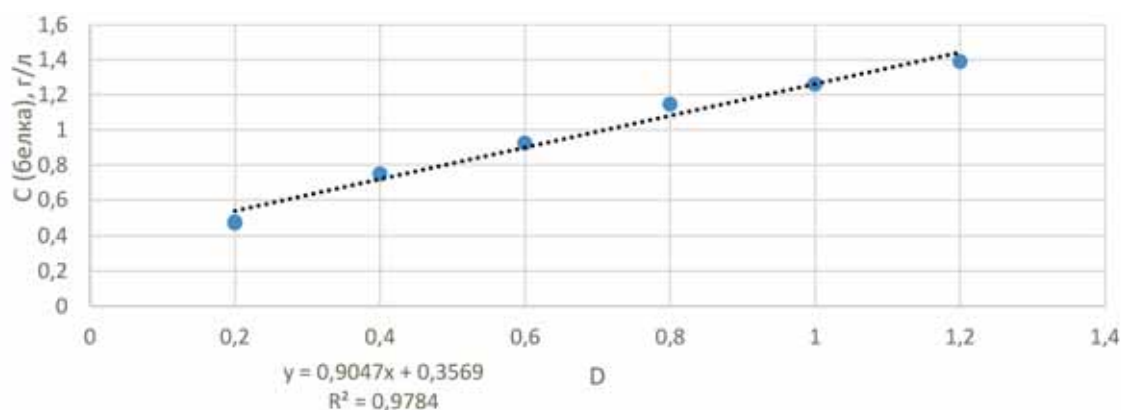


Рис. График зависимости оптической плотности раствора бычьего сывороточного альбумина от концентрации белка (метод Бредфорда)
Graph of the dependence of the of the bovine serum albumin solution optical density on the protein concentration (the Bradford method)

0,028 единиц оптической плотности (см. табл. 1), что уже находится ниже значений, принятых для точных количественных измерений.

Метод Бредфорда дает достаточно хорошо выраженную линейную зависимость между содержанием белка и оптической плотностью не при любых значениях этих функционально связанных показателей. Поэтому было определено наличие этой зависимости в исследуемом диапазоне концентраций. Как видно из графика (рис.), в нашем случае эта зависимость выражена довольно четко.

Заключение

Наилучшие результаты при исследовании белка в преломляющих средах глазного яблока крупного рогатого скота показывает метод Бредфорда. Он отличается высокой чувствительностью, воспроизводимостью и позволяет определять концентрацию общего белка при его низком содержании, в частности при исследовании белкового обмена в тканях глазного яблока.

Спектрофотометрический метод уступает по селективности и чувствительности методу Бредфорда, но может быть использован при исследовании белка в СТ и ВГЖ.

Биуретовый метод наименее чувствителен и может быть использован только при исследовании общего белка в безъядерной части хрусталика, отличающейся высоким содержанием белка, сопоставимым с его содержанием в сыворотке крови.

Конфликт интересов

Авторы статьи не имеют финансовых или личных отношений с другими лицами или организациями, которые могли бы повлиять на достоверность или содержание этой работы.

Прозрачность финансовой деятельности

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Библиография

1. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / [В.В. Меньшиков и др.]; под ред. В. В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — 364 с.
2. Холод, В.М. Справочник по ветеринарной биохимии / В.М. Холод, Г.Ф. Ермолаев. — Минск: Ураджай, 1988. — 168 с.
3. Практическая химия белка: пер. с англ. / под ред. А. Дарбре. — М.: Мир, 1989. — 623 с.
4. Фармакопеея РФ. ОФС.1.2.3.0012.15 [Электронный ресурс] URL: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-3-0012-15-opredelenie-belka> (дата обращения 23.01.2023)
5. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.* — 1976. — Vol. 72. — pp. 248-254.
6. Compton, S.J. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay / S.J. Compton, C.G. Jones // *Anal. Biochem.* — 1985. — Vol. 151. — pp. 369-374.
7. Kruger, N.J. The Bradford method for protein quantitation, In *Methods of Enzymology. Basic protein and peptide protocols* / N.J. Kruger. — Humana Press Inc. Totowa, N.J. — 1994. — Vol. 32. — pp. 9-15.

References

1. *Laboratornye metody issledovaniya v klinike: spravochnik* [Laboratory research methods in the clinic: handbook] [V. V. Men'shikov et al], Pod red. V.V. Men'shikova, Moscow, Medicina, 1987, 364 p.
2. Holod V.M., Ermolaev G.F., *Spravochnik po veterinarnoj biohimii* [Handbook of veterinary biochemistry], Minsk, Uradzhaj, 1988, 168 p.
3. *Prakticheskaya himiya belka* [Practical protein chemistry], Pod red. A. Darbre. Moscow, Mir, 1989, 623 p.
4. *Farmakopeya RF. [Pharmacopoeia of the Russian Federation]* OFS.1.2.3.0012.15. [Elektronnyj resurs] URL: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-3-0012-15-opredelenie-belka> (date of acces: 23.01.2023)
5. Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 1976, Vol. 72, pp. 248-254.
6. Compton S.J., Jones C.G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay, *Anal. Biochem.*, 1985, Vol. 151, pp. 369-374.
7. Kruger N.J. *The Bradford method for protein quantitation*. In *Methods of Enzymology. Basic protein and peptide protocols*. Ed. J. M. Walker, Humana Press Inc. Totowa, N.J., 1994. Vol. 32, pp. 9-15.