

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ им. А. О. КОВАЛЕВСКОГО

ISSN 0203-4646

ЭКОЛОГИЯ МОРЕЯ

1871



ИНБЮМ

32

1989

УДК 577.1 (07)

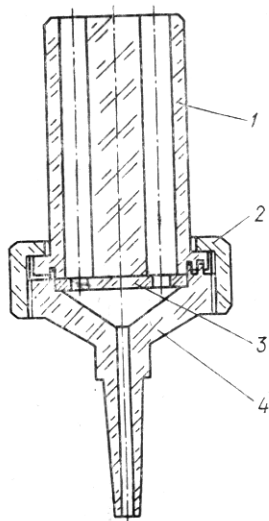
Ю. П. КОПЫТОВ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ БЕЛКА С ПОМОЩЬЮ НИТРОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ

При проведении некоторых гидробиологических, биохимических, геохимических исследований часто возникает необходимость определить концентрацию веществ белкового характера, находящихся в различных растворах: природных водах, биологических жидкостях, экстрактах из различных объектов. Анализ растворов, содержащих относительно высокие количества белка ($5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} = 5 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ и выше), особых затруднений не вызывает, поскольку для этой цели разработаны и давно используются различные общепринятые главным образом спектрофотометрические и колориметрические, методы. Наиболее часто применяется метод Лоури, позволяющий относительно легко определить по цветной реакции содержание белка в пробе в количестве не ниже вышеуказанного. Однако этот метод, широко распространенный в биохимическом анализе, имеет ряд серьезных недостатков, ограничивающих или даже делающих его непригодным при исследовании морской воды и других объектов с низким содержанием протеиновых веществ и высоким солевым фоном. Критический разбор этого, а также некоторых других методов в плане их возможного использования для определения содержания растворенного в морской воде белка дан в работе [1]; там же в качестве альтернативного предлагается спектрофотометрический метод, имеющий ряд существенных недостатков.

В последнее время в биохимических исследованиях все чаще стали использоваться методы, основанные на связывании протеиновых соединений со специфическими красителями, такими, как, например, амидошварц или кумасси ярко синий, широко применяющихся при окрашивании белков на электрофореограммах. Модификации этих методик позволяют вести определение как непосредственно в растворе [4, 5], так и в случае иммобилизации белка на каких-либо носителях-адсорбентах. Последний вариант представляется особенно перспективным, так как дает возможность концентрирования протеинов из сильно разбавленных растворов (например, из морской воды), что, соответственно, приводит к увеличению чувствительности анализа. В качестве таких носителей-адсорбентов предлагается использовать нитроцеллюлозные [3] либо стекловолоконистые [2] фильтры. К существенным недостаткам данных методик следует отнести применение для окрашивания адсорбированного белка сравнительно малочувствительного амидошварца в первой из них и использование малодоступных фильтров из стекловолокна — во второй.

Учитывая эти обстоятельства, была разработана собственная модификация метода, позволяющая, с одной стороны, применять сравнительно недефицитные мембранные нитроцеллюлозные фильтры «СЫН-ПОР» (ЧССР), а с другой — для количественного определения использовать краситель кумасси ярко синий (как R-250, так и G-250), позволяющий анализировать микроколичества адсорбированного белка. Кроме того, была создана фильтрационная воронка специальной конструкции, дающая возможность одновременного анализа шести проб на одном фильтре.



Шестиканальная фильтрационная воронка (объяснение в тексте)

Предел обнаружения — 0,5 мкг белка в пробе при колориметрическом окончании и 0,1 мкг — при денситометрической либо визуальной оценке количества белка на фильтре.

Подготовка фильтров. Принимая во внимание высокую чувствительность метода, необходимо на всех этапах работы полностью исключить возможность какого-либо контакта используемых фильтров с веществами белкового характера. Брать фильтры следует только пластмассовым фотопинцетом. С целью предотвращения попадания белка воздушно-капельным путем хранить их необходимо в тщательно вымытой и закрывающейся посуде, например, в чашках Петри или бюксах. Кроме того, на количественное связывание белка с фильтрами значительное влияние оказывает присутствие детергентов. Поэтому всю посуду и фильтрационную воронку следует мыть теплым содовым раствором с последующим многократным ополаскиванием дистиллированной водой.

В работе используются фильтры «СЫН-ПОР» диаметром 60 мм, имеющие размер пор 0,4 мкм (№ 6) или 0,3 мкм (№ 7). Все они содержат следы органических растворителей, которые необходимо удалить. Для этого партии фильтров (20—25 шт.) помещают в 0,3—0,4 л дистиллированной воды в химическом стакане и ставят его в кипящую водяную баню на 20 мин. Эту операцию после смены воды повторяют 4—5 раз до исчезновения характерного запаха. Затем фильтры сушат сложенными в несколько слоев на листе фильтровальной бумаги. Высушенные фильтры просматривают на просвет с целью выявления мелких дефектов в виде перфораций. На годных к работе мягким простым карандашом отмечается глянцевая сторона.

Непосредственно перед работой фильтры смачиваются в 30%-ной уксусной кислоте. В результате такой обработки происходит активация матрицы, вследствие чего ее адсорбционные характеристики по отношению к белкам значительно улучшаются.

Фильтрационная воронка. Шестиканальная фильтрационная воронка (см. рис.) изготавливается полностью из оргстекла и состоит из корпуса (1) и основания воронки (4) с закрепленным в последнем опорным диском (3), на который помещается фильтр. В корпусе, диаметр которого 70, а длина — 150 мм, по окружности с радиусом 19 мм высверлены 6 равноотстоящих друг от друга каналов диаметром 16 мм, рассчитанных на объем пробы 25 мл. Корпус фиксируется на основании воронки в определенном положении посредством трех штырьков, выполненных из некорродирующего материала и прижимается к нему (и к фильтру) с помощью накладного прижимного кольца (2) с резьбовой нарезкой. В опорном диске, толщина которого 5 мм, против каждого из каналов просверлены расположенные центрально по отношению к ним отверстия диаметром 8 мм.

После изготовления воронки корпус должен быть притерт к опорному диску при смачивании водой без применения абразивов. После этого поверхность диска необходимо сделать матовой (шероховатой) с помощью мелкой наждачной бумаги. Хорошо подготовленная воронка не должна подтекать, а белковые пятна должны иметь четко очерченные границы, что особенно важно при денситометрическом или визуальном окончании анализа. Каналы и соответствующие им отверстия в опорном диске нумеруются от 1 до 6¹.

¹ Выражаю свою глубокую признательность Волкову Н. Г. за разностороннюю помощь в конструировании и изготовлении фильтрационных воронок.

Фильтрация. Мокрый фильтр помещается на опорный диск глянцевой стороной вниз. По его краю осторожно простым мягким карандашом делаются необходимые надписи: номера каналов, проб, дата и т. д. После этого корпус фиксируется в основании воронки и плотно прижимается к фильтру накладным кольцом. Собранный воронка закрепляется в штативе. На носик воронки надевается кусок резиновой трубки с зажимом. В каналы осторожно, по стенкам, заливаются пробы, объем которых зависит от ожидаемой концентрации белка. Для морской воды, содержание белковоподобных соединений в которой лежит в пределах 5—50 мг·л⁻¹, обычно бывает достаточно 25 мл пробы. Линейность адсорбции белка из раствора сохраняется по крайней мере до 20 мг в пробе, в то время как оптимальное его количество находится в диапазоне 1—10 мг на канал.

После того как все пробы залиты в воронку, зажим снимается и начинается фильтрация. Ее продолжительность определяется как характеристиками используемого фильтра, так и объемом проб. Так, для более предпочтительных в работе фильтров «СЫНПОР 6» длительность протекания 25 мл воды составляет 40—60 мин, а для «СЫНПОР 7» в 1,5 раза дольше. Однако при наличии перистальтического насоса с производительностью 150—250 мл·ч⁻¹ время фильтрации можно стабилизировать и сделать независимым от порозности мембран. Для этого только необходимо герметизировать зазоры между опорным диском и основанием воронки каким-либо герметиком (например, резиновым клеем и т. п.).

Фильтрация продолжается до полного отсутствия воды в каналах. После этого воронка разбирается, фильтр извлекается пинцетом и погружается на 30—60 с в 30%-ную уксусную кислоту для фиксации белков. По истечении этого срока можно приступать к окрашиванию материала.

Окраска и отмывка фильтра. Для окраски адсорбированного на фильтре белка можно использовать краситель кумасси ярко синий в двух вариантах: 1) R-250 и 2) G-250. Ниже приводятся прописи составов красителей обоих вариантов. При выборе между ними необходимо принимать во внимание, что вариант 1 имеет несколько более высокую чувствительность, однако вариант 2 более быстр за счет сокращения времени отмывки.

Краситель хранится достаточно долго в холодильнике в виде основного раствора, приготавливаемого путем растворения навески кумасси в метаноле в концентрации: 1) R-250=15 мг·л⁻¹; 2) G-250=5 мг·л⁻¹.

Для приготовления рабочего раствора красителя необходимо непосредственно перед употреблением смешать в пробирке 0,25 мл основного раствора с 10 мл 30%-ной уксусной кислоты, а затем этот реактив перелить в чашку Петри или бюксу и туда же поместить окрашиваемый фильтр. Продолжительность окрашивания 10 мин, в течение которых чашку Петри надо периодически покачивать, а фильтр 1—2 раза перевернуть. Наличие качалки с плавно регулируемой амплитудой значительно упрощает эту процедуру. Рабочий раствор красителя можно хранить закрытым несколько дней вне холодильника до образования в нем хлопьевидного осадка, используя его неоднократно и добавляя в него по мере его истощения 0,05—0,1 мл основного раствора.

После окрашивания фильтр переносят в чистую чашку Петри, промывают водой, затем избыток неспецифически связанного красителя удаляют с помощью 10 мл отмывочного раствора (7,5%-ная уксусная кислота в 40%-ном этаноле), который готовят, смешивая этанол, 30%-ную уксусную кислоту и воду в соотношении 40 : 25 : 35 по объему. Длительность одного цикла отмывки 5 мин при плавном покачивании фильтра. Для этой цели можно использовать качалку, включенную через реле времени, однако во избежание чрезмерной отмывки фильтров ее покачивание должно быть очень слабым. Кроме того, время от вре-

мени необходимо сравнивать качество фильтров, отмытых с использованием качалки с фильтрами, отмытыми вручную. Удаление избытка красителя — процедура, во многом определяющая воспроизводимость результатов, и поэтому очень важно выполнять ее каждый раз одинаково.

Количество циклов отмывки определяется как вариантом используемого красителя, так и номером фильтра. Так, например, для мембран «СЫНПОР-6» в сочетании с красителем G-250 необходимо два отмывочных цикла с заменой отработанного раствора на свежий с $R-250=4$ цикла. Применение для анализа фильтров «СЫНПОР-7» требует увеличения числа отмывочных циклов на 1—2 для обоих вариантов. После полного завершения отмывки на голубоватом фоне фильтра должны отчетливо просматриваться ярко-синие пятна белков. Мембрана промывается несколько раз водой, после чего она готова для определения количества адсорбированных протеинов.

Количественный анализ. Оценка содержания связанного белка может проводиться колориметрически, денситометрически или визуально. В первом случае пятна белков вырезаются с влажного фильтра с помощью просечки диаметром 9,5 мм и помещаются в пробирки. В качестве контроля используются две высечки из центральной области фильтра. В пробирки приливается по 2 мл элюирующего раствора (ацетон: этанол = 7:3) и их содержимое взбалтывается до полного растворения высечек. Колориметрирование всех полученных растворов производится при длине волны 595 нм против воды. Испытуемый раствор помещается только в сухую кювету. По разнице между экстинциями опытных и контрольных проб вычисляется величина поглощения собственно комплекса краситель — белок и по калибровочной кривой либо по пересчетному коэффициенту находится количество белка в пробе.

Значительно быстрее и с большей точностью можно определить содержание белка на фильтре посредством денситометрирования пятен, для чего используют прибор ДО-1, предназначенный для оценки оптической плотности фотоматериалов. Мокрый фильтр помещают на смоченную водой фильтровальную бумагу, покрывают целлофаном. Центральная часть пятен белков денситометрируется с использованием встроенного светофильтра, имеющего максимум пропускания 550 нм. Оптический ноль устанавливается по чистой области в середине мембраны. При этом методе линейная зависимость между показаниями прибора и количеством белка наблюдается вплоть до 4 мкг в пробе, но только для влажного фильтра.

Возможна и визуальная оценка содержания белка на фильтре, которая производится посредством сравнения анализируемого фильтра с фильтром-стандартом, на который иммобилизованы и проявлены описанным выше методом известные количества исследуемого протеина в возрастающем порядке. Наличие нескольких таких фильтров-стандартов, охватывающих широкий диапазон концентраций, позволяет достаточно точно и главное быстро определить содержание белка в пробе. Эти стандарты в высушенном виде и в закрытой посуде могут храниться неопределенно долго без заметного изменения своих цветовых характеристик. Перед использованием для сравнения их необходимо смочить в слабом растворе уксусной кислоты и промыть водой; после применения они вновь высушиваются на фильтровальной бумаге в темном месте.

Калибровка производится по растворам, приготовленным на свежееперегнанной дистиллированной воде и содержащим в 25 мл от 1 до 6 мкг человеческого (или бычьего) сывороточного альбумина, но можно брать и другие концентрации белка как в меньшую, так и в большую сторону.

1. Агатова А. И., Полуяков В. Ф. Спектрофотометрический метод определения белка в морской воде // Методы исследования органического вещества в океане. — М.: Наука, 1980. — С. 86—92.
2. Агатова И. А., Торгунова Н. И. Определение белка, растворенного в морской воде и в поровой воде, из донных осадков // Океанология. — 1983. — 12, вып. 3. — С. 496—500.
3. Дмитриева Е. Ю., Козлов А. В. Количественное определение белка в растворе с помощью мембранных фильтров «СЫНПОР-6» // Методы биохимического анализа растений. — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1978. — С. 36—37.
4. Девени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. — М.: Мир, 1976. — 364 с.
5. Хасон Р., Филлипс Дж. Химический состав бактериальной клетки // Методы общей бактериологии. — М.: Мир, 1984. — С. 283—373.

Ин-т биологии юж. морей

им. А. О. Ковалевского АН УССР, Севастополь

Получено 03.02.88

Yu. P. KOPYTOV

DETERMINATION OF LOW PROTEIN CONCENTRATIONS BY MEANS OF NITROCELLULOSE MEMBRANE FILTERS

Summary

A method for determining low concentrations of the dissolved protein is described as based on the adsorption from solution of protein molecules on nitrocellulose membrane filters „SYNPOР“ with pores 0.3-0.4 μm in diameter. Spots of immobilized proteins are developed by high-sensitive specific dye—kumassy bright blue. The detection limit—0.5 μg of protein in the sample under colorimetric finish of the analysis and 0.1 μg —under densitometric or visual which is sufficient to analyze natural waters. The construction of filtering funnel is given which permits 6 samples to be treated simultaneously in a filter of 60 mm in diameter.