

Академия медицинских наук СССР
Редколлегия журнала "Вопросы
медицинской химии"

УДК 577.157.2 + 615.462

А.С.Аврунин

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ МЕТОДА ДИСКЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ
ГЕЛЕ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА.

Москва, 1985 г.

Электрофоретическое исследование белков сыворотки крови в настоящее время является одним из основных методов лабораторного обследования больных (1). При этом всё шире используется метод дискэлектрофореза в полиакриламидном геле, который обладает высокой разрешающей способностью.

В работах Т.Ф.Пироговой отмечается, что при проверке воспроизводимости метода дискэлектрофореза в преальбуминовой зоне наибольшая ошибка составляла до 45%, во фракциях альбуминов и трансферринов — до 3%, фракций постальбуминовой и посттрансферриновой зон — до 11% (2). Аналогичные результаты получены при определении содержания белков наиболее распространённым в клинической практике методом — методом электрофореза на бумаге. Так В.С.Асатиани пишет о том, что величина ошибки при определении альбуминов — 5%, а глобулинов до 15% (3). Таким образом, для электрофореза белков сыворотки крови характерна значительная ошибка, которая снижает его диагностическую ценность, особенно при обследовании больных в динамике.

В данной работе определялась воспроизводимость дискэлектрофореза в полиакриламидном геле при использовании в качестве красителей амидочёрного 10 Б и кумасси бриллиантового голубого R-250 с целью выбора оптимального красителя, снижающего ошибку метода.

Примечание: Работа выполнена в Ленинградском ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательском институте травматологии и ортопедии им. Р.Р.Вредена (Директор з.д.н.РСФСР, проф. В.М.Демьянов).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Для сравнительного анализа у 121 донора проведено 191 исследование белкового состава сыворотки крови методом дискэлектрофореза в полиакриламидном геле, причём дискэлектрофореграммы 101 сыворотки крови окрашивали амидочёрным 10 Б, а дискэлектрофореграммы 90 сывороток крови — кумасси бриллиантовым голубым R-250.

Составы красящих растворов:

1. Амидочёрный 10 Б — 0,3 г, уксусная кислота ледяная — 10 мл, воды дистиллированной до 100 мл.

2. Кумасси бриллиантовый голубой R-250 — 0,1 г, спирт этиловый — 30 мл, кислота трихлоруксусная — 30 г, воды дистиллированной до 100 мл.

Электрофоретическое разделение белков сыворотки крови в полиакриламидном геле проводили по методу *Ozstein* и *Davis*, описанному Маурер в типовом аппарате фирмы "Реанал" — "Модель-71" (4). На время электрофоретического разделения камеру для электрофореза помещали в холодильник — температура +4°C. 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. Дискэлектрофореграммы окрашивали в течение 45 мин. амидочёрным 10 Б и кумасси бриллиантовым голубым R-250.

Для удаления избытка красителя гель помещали в 7% раствор уксусной кислоты, который периодически меняли до полной

отмывки дискэлектрофореграмм. Денситометрию дискэлектрофореграмм проводили на микрофотометре МФ-4. Полученные данные записывали на самописце Н-37. При анализе денситограмм подвижность трансферрина принимали за единицу, и для их расшифровки пользовались данными, представленными в работе *Pastewka et al.* (5).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

В данном исследовании анализировались два основных параметра воспроизводимости — синхронность выявления отдельных фракций в параллельных пробах и идентичность численных величин содержания белков в соответствующих фракциях в параллельных пробах.

Как видно из таблицы I, воспроизводимость синхронности выявления отдельных фракций несколько ниже при окраске кумасси бриллиантовым голубым R-250 (в среднем 57%) и выше при окраске амидочёрным IO Б (в среднем 72%). В связи с тем, что чувствительность кумасси бриллиантового голубого R-250 более высокая, чем амидочёрного IO Б, резонно предположить, что имеется связь между типом красителя, воспроизводимостью синхронности выявления отдельных фракций и содержанием в них белка. Однако, этой зависимости выявить не удалось. Как при окраске амидочёрным IO Б, так и при окраске кумасси бриллиантовым голубым R-250, выявлена положительная сильная связь между концентрацией белка во фракциях и воспроизводимостью выявления отдельных фракций в параллельных пробах. Для первого красителя коэффициент корреляции составил 0,558, для второго — 0,551.

Как видно из таблицы I, величина ошибки при определении содержания отдельных фракций при окраске амидочёрным IO Б колеблется от 4% до 59% (в среднем 22%), при окраске кумасси бриллиантовым голубым R-250 от 3% до 29% (в среднем 16%). Следовательно, использование кумасси бриллиантового голубого R-250 увеличивает воспроизводимость метода за счёт снижения ошибки.

В результате наших исследований показано, что имеется обратная зависимость между концентрацией белка во фракции и величиной ошибки метода, т.е. чем выше содержание белка во фракции, тем меньше ошибка метода для данной фракции. Однако установлено, что при окраске амидочёрным IO Б корреляционная связь менее выражена (коэффициент корреляции $-0,594$), чем при окраске кумасси бриллиантовым голубым R-250 (коэффициент корреляции $-0,756$).

В процессе исследования установлены величины ошибки метода для большинства выявляемых фракций как при окраске кумасси бриллиантовым голубым R-250, так и при окраске амидочёрным IO Б. Необходимо подчеркнуть, что независимо от применяемого красителя величины ошибок остаются достаточно большими. Как отмечает Маурер, ошибки метода дискэлектрофореза связаны с плохой воспроизводимостью фракционирования белка. Ошибки обусловлены нестандартностью температурного режима в геле, нестандартностью pH, нестандартностью образования полиакриламидного геля (4). По результатам нашего исследования при окраске кумасси бриллиантовым голубым R-250 величина ошибки метода в большей степени коррелирует с кон-

Таблица I

ВЕЛИЧИНА ОШИБКИ И ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ МЕТОДОМ
ДИСКЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ.

№ п/п	Наименование зоны и фракции	Амидочёрный IO B n=101			Кумасси бриллиантовый голу- бой R-250 n=90		
		Частота выявле- ния в %	Воспро- изводи- мость выяв- ления в %	Средняя ошибка при оп- ределе- нии бел- ка во фракции в %	Частота выявле- ния в %	Воспро- изводи- мость выяв- ления в %	Средняя ошибка при оп- ределе- нии бел- ка во фракции в %
1	2	3	4	5	6	7	8
1.	Преальбумины	-	-	-	70	79	13
2.	2,70	-	-	-	70	79	32
3.	2,47	100	96	17	100	100	17
4.	Альбумины	100	100	5	100	100	3
5.	Постальбумины	100	100	9	100	100	7
6.	1,51	36	78	19	14	46	21
7.	1,48	33	70	24	19	29	14
8.	1,40	25	56	34	2	0	-
9.	1,37	28	50	27	13	17	-
10.	1,28	64	79	23	68	70	17
11.	1,20	28	68	20	29	65	18
12.	Трансферрин	100	100	11	100	100	9
13.	1,14	22	27	33	14	46	24
14.	1,07	17	76	29	10	77	10
15.	0,95	-	-	-	-	-	-

Таблица I (продолжение)

I	2	3	4	5	6	7	8
16.	Посттрансферрины	100	100	12	100	100	10
17.	0,86	24	63	29	13	50	29
18.	0,76	61	87	18	64	81	11
19.	0,66	35	63	26	43	69	17
20.	Быстрые иммуноглобу- лины	100	100	4	100	100	4
21.	0,59	66	91	15	50	84	11
22.	0,53	16	75	34	22	70	16
23.	0,47	17	65	19	2	50	-
24.	0,42	16	63	15	10	22	-
25.	0,35	14	64	26	7	0	-
26.	0,31	12	42	14	3	77	-
27.	0,25	12	50	28	9	50	19
28.	0,23	10	80	20	3	67	-
29.	0,21	11	64	18	8	43	-
30.	0,18	8	50	24	8	14	-
31.	0,16	14	64	33	4	50	-
32.	0,13	9	33	59	2	0	-
33.	0,12	9	56	34	4	25	-
34.	Старт	100	100	14	100	100	16
35.	0,10	87	88	22	53	65	22
36.	0,04	87	88	22	53	65	19

центрацией белка во фракции, чем при окраске амидочёрным IО Б. Кумасси бриллиантовый голубой R-250 в три раза более чувствительный, чем амидочёрный IО Б (6), и следовательно лучше выявляет незначительные количества белка, которые вследствие плохого фракционирования оказались вне зоны фракции.

В настоящее время метод дискэлектрофореза в полиакриламидном геле пригоден в основном для проведения группового обследования больных и выявления среднегрупповых изменений протеинограммы, что имеет значение только для патогенеза заболевания. Полученные в настоящей работе данные можно использовать в клинической практике при динамическом наблюдении для определения значимости полученных различий. Высокая ошибка метода для большинства фракций делает первостепенной задачей разработку путей повышения его воспроизводимости.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Диспротеинемия / Вапцеров И., Иоктов М., Савов С. - София: Мед. и физк., 1978. -335 с.
2. Пирогова Т.Ф. - Теория и практика применения метода диск-электрофореза в полиакриламидном геле в клиничко-биологических исследованиях. - Автореф. докт. дисс., Рига, 1975.
3. Асатиани В.С. - Биохимический анализ. Часть III, Цодна, Тбилиси, 1959. -382 с.
4. Маурер Г. -Дискэлектрофорез, "Мир", 1971. -247 с.
5. *Pastewka J.V., Nees A.T., Peacock H.C. - Electrophoretic patterns of normal human serum by disc electrophoresis in polyacrylamide gel. - Clin.Chim.Acta, 1966, 14, 219-226.*
6. Вееке Бент - в кн.: Руководство по практическому иммуноэлектрофорезу, "Мир", 1977, с. II-42

РЕФЕРАТ

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ МЕТОДА ДИСКЭЛЕКТРОФЕРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА.

А.С.Аврунин

Электрофоретическое исследование белков сыворотки крови в настоящее время является одним из основных методов лабораторного обследования больных. При этом всё шире используется метод дискэлектрофореза в полиакриламидном геле, который обладает высокой разрешающей способностью.

В данной работе определялась воспроизводимость дискэлектрофореза в полиакриламидной геле при использовании в качестве красителей амидочёрного IO Б и кумасси бриллиантового голубого R-250 с целью выбора оптимального красителя снижающего ошибку метода.

Анализировались два основных параметра воспроизводимости – синхронность выявления отдельных фракций в параллельных пробах и идентичность численных величин содержания белков в соответствующих фракциях в параллельных пробах.

Для сравнительного анализа у I2I донора проведено I9I исследование белкового состава сыворотки крови мето-

дом дискэлектрофореза в полиакриламидном геле, причём дискэлектрофореграммы ICI сыворотки крови окрашивали амидочёрным IO Б, а дискэлектрофореграммы 90 сывороток крови - кумасси бриллиантовым голубым R-250.

Установлено, что синхронность выявления отдельных фракций несколько ниже при окраске кумасси бриллиантовым голубым R-250 (в среднем 57%) и выше при окраске амидочёрным IO Б (в среднем 72%).

Величина ошибки метода при определении содержания отдельных фракций при окраске амидочёрным IO Б колеблется от 4% до 59% (в среднем 22%), при окраске кумасси бриллиантовым голубым R-250 от 3% до 29% (в среднем 16%).

Таким образом, в процессе исследования установлены величины ошибки метода для большинства выявляемых белковых фракций в сыворотке крови как при окраске кумасси бриллиантовым голубым R-250, так и при окраске амидочёрным IO Б. Независимо от применяемого красителя величины ошибок метода остаются достаточно большими, а синхронность выявления отдельных фракций особенно при окраске кумасси бриллиантовым голубым R-250 недостаточно высокая.

В работе ставится вопрос о необходимости дальнейшей разработки путей повышения воспроизводимости метода.

Депонированная рукопись

УДК 577.157.2+615.462

Воспроизводимость метода дискэлектрофореза в полиакриламидном геле при исследовании сыворотки крови человека. Аврунин А.С. (Редколегия журнала "Вопросы медицинской химии" АМН СССР Москва, 1985, 9 с. с ил., библиогр.: с. 9 (6 назв.) Рукопись депонирована в ВИНТИ от 11.12.85 № 8523-1385)

В работе определялась воспроизводимость метода дискэлектрофореза в полиакриламидном геле при использовании в качестве красителей амидочёрного IO Б и кумасси бриллиантового голубого Р-250 с целью выбора оптимального красителя, снижающего ошибку метода.

Установлено, что независимо от применяемого красителя величины ошибок остаются достаточно большими, при окраске амидочёрным IO Б от 4% до 59% (в среднем 22%), при окраске кумасси бриллиантовым голубым Р-250 от 3% до 29% (в среднем 16%). В работе ставится вопрос о необходимости дальнейшей разработки путей повышения воспроизводимости метода.