

**ЗАСТОСУВАННЯ ОРГАНІЧНИХ БАРВНИКІВ  
ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ БІЛКОВИХ ФРАКЦІЙ РІДИН ОРГАНІЗМУ,  
РОЗДІЛЕНИХ МЕТОДАМИ ЗОНАЛЬНОГО ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ  
НА ТВЕРДИХ НОСІЯХ**

Черкаський національний університет імені Богдана Хмельницького  
Україна, 18031, м. Черкаси, бульвар Шевченка, 81

*Вивчали ефективність використання органічних барвників для ідентифікації білкових фракцій сироватки крові, розділених методом електрофорезу на твердих носіях. Встановлено, що при розділенні білкових фракцій сироватки крові методом диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі найдоцільніше використовувати такі барвники як Бромфеноловий синій та Кумасі R-250.*

*Изучали эффективность использования органических красителей для идентификации белковых фракций сыворотки крови, разделённых методом электрофореза на твёрдых носителях. Установили, что при разделении белковых фракций сыворотки крови методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле наиболее целесообразно использовать такие красители как Бромфеноловый синий и Кумаси R-250.*

*The efficiency of the use of the organic paints for the identification of the protein fractions of the blood serum divided by the electrophoresis method on hard carriers was found out. It was established that painted mixtures such as Bromphenol blue and Kumasi R-250 are used when it is necessary to divide protein fractions of the blood serum by disk-electrophoresis method in polyacrilamid gel.*

**Ключові слова:** білки, сироватка крові, диск-електрофорез, забарвлення електрофореграм.

Методи електрофорезу на твердих носіях широко використовують у клінічних та наукових дослідженнях для вивчення компонентного складу білків рідин і тканин організму [1; 2; 5; 12]. Ці методи є у достатній мірі інформативними, оскільки дають змогу оцінювати функціональний стан організму за особливостями міграції білкових фракцій та на основі пофракційного перерозподілу окремих індивідуальних білків, що входять до їх складу. Це, у значній мірі, може сприяти вдосконаленню діагностики цілого ряду захворювань, які супроводжуються порушенням білкового спектру рідин і тканин організму. Оскільки білки є не лише основою структури організму, але і основою його обміну та показником резистентності при дії різних пошкоджуючих факторів фізичної, хімічної чи бактеріологічної природи, вивчення зміни кількісного вмісту та пофракційного перерозподілу специфічних білків сироватки крові може складати значний інтерес.

Відомо, що в наукових і клінічних лабораторіях використовують зональний електрофорез на різних носіях, що дає змогу розділити білки рідин організму на цілий ряд фракцій у вигляді окремо локалізованих дуг репрезитації.

Найчастіше у вигляді носіїв використовують фільтрувальний папір, плівки ацетату целюлози, різні гелі (агарові, крохмальні, поліакриламідні). Кожен з цих носіїв має свої особливості, які у значній мірі впливають на процес перерозподілу білкових фракцій рідин і тканин організму. Так, при використанні фільтрувального паперу, завдяки його високій пористості, яка значно перевищує розмір молекул, що розділяють, швидкість міграції білкових фракцій майже така ж як і у розчині. Це до певної міри стосується і плівок ацетату целюлози та агарових гелів, хоч пористість їх дещо нижча, ніж у паперу. При використанні у вигляді носія крохмальних гелів (КГ) та гелів поліакриламідів (ПААГ) важлива роль належить молекулярно-ситовому ефекту: швидкість міграції окремих білкових фракцій залежить не лише від нетто-заряду йону, але і від величини пор гелю, форми і розміру білкових молекул. Важливе значення має також відношення між матрицею гелю і йонами, що рухаються.

Характерним для сучасних методів електрофорезу є диференційований підбір носіїв залежно від мети дослідження: папір, поліакриламідні гелі, плівки ацетату целюлози використовують з клініко-діагностичною метою при розділенні білків рідин організму (сироватка крові, спінальна і синовіальна рідини); крохмальні гелі, агар і агарозу – при проведенні імуноелектрофорезу.

Крім носіїв, при розділенні компонентів рідин організму важливе значення має також застосування буферних систем, із відповідним значенням рН, умови проведення електрофорезу, нанесення проб досліджуваного матеріалу та ін.

Незаперечним є те, що важливим і відповідальним етапом роботи при розділенні білкових фракцій методом електрофорезу є ідентифікація отриманих фракцій, оскільки цей процес у значній мірі впливає на їх візуальну і кількісну оцінку. Всі сучасні методи забарвлення електрофореграм базуються на здатності органічних барвників вибірково зв'язуватися з окремими білковими фракціями у співвідношеннях, пропорційних кількісному вмісту в них білка. Важливою вимогою до барвників є їх висока специфічність, чутливість, легке відмивання фону та видалення надлишку після зв'язування з відповідною білковою фракцією. Відомо, що тверді носії, які використовують при електрофорезі, мають різний ступінь спорідненості до певних барвників, що значно ускладнює порівняльну характеристику кількісної оцінки одних і тих же показників, отриманих різними авторами.

Згідно з даними літератури [1; 4; 5; 10; 16], для ідентифікації білкових фракцій рідин і тканин організму, розділених методами зонального електрофорезу на твердих носіях, використовують велику кількість органічних барвників таких як: Бромфеноловий синій, Кислотний червоний, Амідо-чорний 10Б, Кумасі R-25 і G-250, Понсо S, Метилловий зелений, Азокармін, Кислотний фуксин та інші (Табл. 1.).

Крім того, є дані стосовно доцільності використання Нігрозину, Ліссаміну, Проціону RS [1], Оранжевого С, Бромкрезолового зеленого [2] та ін.

Переважає більшість цих барвників містить забарвлений аніон, який може зв'язувати катіонні групи білків (при рН нижчих значення їх ізоелектричної точки (pI)). Частина цих барвників має чітко виражену хімічну природу (Бромфеноловий синій, Бромкрезоловий зелений), інші (Амідо-чорний 10В, Азокармін) складаються з суміші окремих барвників і можуть різнитися компонентним складом залежно від джерела отримання.

Головним барвником, що використовувався для ідентифікації білкових фракцій, розділених методом електрофорезу на різних носіях, до останнього часу був Бромфеноловий синій. Цей барвник широко використовують для ідентифікації білкових фракцій розділених методом електрофорезу на плівках ацетату целюлози (ПАЦ), агарових (АГ) і поліакриламідних (ПААГ) гелях, оскільки він має високу спорідненість до білкових фракцій, легко видаляється з ділянок носія, які не містять білків, що важливо при кількісній оцінці результатів електрофорезу. Бромфеноловий синій використовують також і як індикатор міграції білкових фракцій (додають до складу електродного буферу для візуальної оцінки швидкості руху їх під час електрофорезу). Важливим є те, що у зв'язаній з білками формі цей барвник у меншій мірі знебарвлюється, ніж у вільному стані, що запобігає значним втратам білків із дуг преципітації під час фіксації і відмивання зразків [3].

Такі барвники, як Кумасі R-250 і G-650, використовують при електрофорезі на поліакриламідному гелі та при електрофокусуванні білків. Ці барвники високочутливі і дають змогу виявити менше одного мкг білка у розділених зразках [1; 2; 7].

Ряд барвників характеризуються високою вибірковістю до окремих білкових фракцій. Так, Нігрозин має високу спорідненість до альбумінової фракції, Кумасі R-250 до пре- та постальбумінових фракцій [1; 11; 12].

В літературі є дані [4], що для забарвлення білкових фракцій, розділених на різних носіях, можна використовувати синтетичний триметиновий барвник – тетракалієву сіль біс-[1-(4-сульфобеніл)-3-карбоксіпіразолон-5] триметоксаніну, що має тривіальну назву ПК-144. Цей барвник має високу спорідненість до білків, що важливо при пофракційному розділенні рідин із незначним їх вмістом (сеча, спінальна і синовіальна рідини). Чутливим методом ідентифікації є обробка електрофореграм йонами металів (Ag, Au), які зв'язуються з окремими фракціями, що дає змогу виявити їх локалізацію.

У літературі [2; 5; 6; 7; 8] наявні чисельні дані стосовно особливостей обробки електрофореграм після розділення білкових фракцій: електрофореграми обробляють денатуруючими реагентами (йони  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (W%) = 99,9), ТХО та інші). Денатуровані білки краще поглинають барвники і при знебарвленні фону та відмиванні надлишку барвника не відбувається втрат білків із забарвлених ділянок. Часто забарвлення і фіксацію білкових фракцій проводять одночасно. За цих умов денатуруючі реагенти ( $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , насичений  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ , ТХО,  $\text{CH}_3\text{OH}$  та ін.) включають до складу барвника.

Для забарвлення електрофореграм на різних носіях часто використовують багатокомпонентні суміші, які крім барвників, містять реагенти, що забезпечують не лише фіксацію білків у складі фракцій, але і підвищують спорідненість до них певного барвника (Табл. 1.).

Розчини для відмивання електрофореграм від надлишку барвника також мають різний склад, що залежить від компонентів фарбуючого розчину, виду носія, умов проведення електрофорезу, концентрації досліджуваних компонентів тощо. Деякі автори [5] пропонують специфічну обробку носіїв перед кількісною оцінкою результатів електрофорезу. Зокрема, з метою просвітлення забарвлених ділянок фореграм, які не містять білка, використовують  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (абс.) або 10-15% розчин гліцерину. Інколи гліцерин додають до складу фарбуючої суміші, що дає змогу ефективніше проводити сканування електрофореграм.

В літературі [9] наявні дані стосовно того, що забарвлення білкових фракцій і наступне знебарвлення фону електрофореграм можна значно скоротити, якщо скористатися електрофорезом, оскільки зазвичай, барвники несуть електричний заряд того чи іншого знаку. Під впливом електричного поля йони барвника проникають у носій до встановлення рівноваги між кількістю його, що адсорбується білковими фракціями, та вмістом у розчині, а при знебарвленні виходять із носія у розчин для відмивання.

Згідно з даними ряду авторів [1; 5; 6] тривалість забарвлення електрофореграм і відмивання фону у значній мірі залежить від виду носія та компонентного складу барвника. Так, при забарвленні Амідо-чорним 10В тривалість забарвлення може складати від 2-3 хв. до 16 год. Кумасі блакитний G-250 при розчиненні у воді чи ТХО забарвлює білкові фракції, розділені на різних носіях, протягом 2-5 хв., а кумасі R-250 значно повільніше, однак утворює стійкіший комплекс, що запобігає втратам білкових фракцій при відмиванні забарвленого фону.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Враховуючи вище вказане, ми поставили за мету узагальнити дані літератури стосовно особливостей використання окремих органічних барвників для ідентифікації білкових фракцій сироватки крові, розділених методом електрофорезу на твердих носіях, та провести експериментальне дослідження для з'ясування ефективності використання таких барвників як: Бромфеноловий синій, Амідо-чорний 10В, Понсо S і Кумасі блакитний R-250 при розділенні білків сироватки крові методом диск-електрофорезу на ПААГ.

Вибір барвників зумовлений тим, що їх найчастіше використовують при зональному електрофорезі на різних носіях, вони є у достатній мірі чутливими і високоспецифічними. Це стосується, в першу чергу, Кумасі блакитного R-250, для якого характерна висока спорідненість до окремих білкових фракцій порівняно з іншими барвниками [2; 10; 11].

Використання нами у вигляді носія гелю поліаріламідну (ПААГ) зумовлене тим, що, як вказувалося раніше, він має цілий ряд переваг порівняно з іншими носіями. У вигляді біоматеріалу використовували сироватку крові практично здорових людей (донорів) віком 22-25 років. Фракціонування білків сироватки крові проводили методом диск-

електрофорезу (за Ornstein і Davis), описаному Г. Маурером [12], з використанням приладу фірми “Реанал”, модель - 71 (ВНР). Розділення білків проводили у дисконтинуальній буферній системі, в якій носій (гель) з електродним буфером різняться за рядом параметрів (складом, концентрацією, іонною силою та значенням рН).

Застосування дисконтинуальних буферних систем забезпечує чітке розділення білкових фракцій внаслідок електрохімічного ефекту концентрування компонентів зразка та утворення чітко вираженої стартової зони, в якій концентрація зразка визначається регуляційною залежністю за Кольраушем. Для розділення білків використовували лужну буферну систему (ТРИС-НСІ-гліцинова, рН...8,3). Концентруючий гель готували на ТРИС-НСІ буфері (рН...6,7). Сепаруючий гель, відповідно, на цьому ж буфері (рН...8,9).

Для зменшення випаровування і запобігання підвищенню температури буферних розчинів у кюветних відділеннях та зміни рН, камери для електрофорезу поміщали в холодильник при температурі 4 °С. Перші 15 хв. сила струму (J) складала 2 мА на одну гелеву трубку з наступним підвищенням до 4-5 мА. Кожна дослідна проба містила 0,5 мкг білка. Розділення проводили протягом 1,5 год. Візуальну оцінку швидкості міграції білкових фракцій проводили за допомогою індикаторного барвника - 0,1% водного розчину Бромфенолового синього. Камери для електрофорезу відключали від джерела живлення, коли смужка індикаторного барвника досягала відстані 3-5 мм від анодного кінця гелю. Після цього гелі видаляли із скляних трубок у кристалізатори з фіксуєчим розчином за допомогою струменю води, який пропускали між гелем і стінками трубок та переносили в окремі пронумеровані пробірки з фарбуючим розчином. Тривалість забарвлення гелів окремими барвниками визначали згідно з рекомендаціями, наведеними в літературі [5; 12; 13].

Для видалення надлишку барвника гелі відмивали, за методикою описаною Г.Маурером, відповідними розчинами (див. Табл.1.), які періодично змінювали, до повного знебарвлення фону. У цьому ж розчині гелі зберігаються тривалий час без зміни вмісту білкових фракцій, зв'язаних з барвником, оскільки спорідненість його до білка вища, ніж до вільного гелю.

Кількісну оцінку отриманих фракцій проводили двома методами із застосуванням денситометрії та елюювання.

Прозорість ПААГ після відмивання фону дає змогу використовувати пряму денситометрію, яку проводили на мікрофотометрі МФ-4, обладнаному самописцем Н-37. Розшифровування денситограм здійснювали враховуючи відносну рухливість трансферину, яку приймали за одиницю [12]. Цей метод кількісної оцінки простий і надійний, хоч має і ряд недоліків, головним з яких є те, що площа піків, які утворюються при скануванні гелів залежить від відстані, яку проходить промінь у тому чи іншому місці циліндричного гелю. Тому денситометрія не дає змоги дати точну кількісну оцінку результатів. Надійнішим у цьому плані є метод елюювання забарвлених білкових фракцій з їх наступною фотоелектроколориметрією, який пропонують ряд авторів [2; 12; 14].

Суть методу полягає в тому, що із електрофореграм вирізають окремі забарвлені фракції і поміщають їх в пронумеровані пробірки. Із частини гелю, що знаходиться нижче межі індикаторного барвника, вирізають частину гелю, яка не містить білка (контроль). У всі пробірки додають елююючий розчин (0,01 н – 0,1 н NaOH, 0,1 н NaHCO<sub>3</sub>), тривалість елюювання складає від 24 до 48 год. Максимум екстинкції елюатів знаходиться в межах  $\lambda = 590-620$  нм для КФК-2. Інтенсивність забарвлення елюатів, як правило, стійка протягом тривалого часу та пропорційна кількості білка. Лінійна залежність зберігається в межах 2-125 мкг білка у фракціях.

Для прискорення елюції можна використовувати гомогенізацію окремих ділянок гелю та екстрагування 0,1 н NaOH з наступним центрифугуванням. За цих умов процес елюювання скорочується до 2-3 годин, що дає змогу уникнути втрати білків із забарвлених ділянок гелю.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У Табл. 1 наведено коротку характеристику органічних барвників, які, згідно з даними літератури, використовують для забарвлення електрофореграм, отриманих на різних носіях.

Таблиця 1

Барвник	Варіанти компонентного складу (А, Б, В)	Вид носія	Фіксатор	Трива-лість забарвл.	Суміш для відмивання	Автори
Бром-феноловий синій	А. 0,1% р-н в C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH, нас. Hg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Папір, ПАЦ, ПААГ	Барвник фіксатор	10 хв.	H <sub>2</sub> O	[5; 6]
	Б. 0,1г, 50 мл CH <sub>3</sub> COOH, 50г ZnSO <sub>4</sub> в 1 л H <sub>2</sub> O	ПААГ, АГ, КГ	Барвник фіксатор	16 год.	2% CH <sub>3</sub> COOH, 2% CH <sub>3</sub> COONa	[5; 6; 13; 15]
	В. 0,1г в 1 л 10% CH <sub>3</sub> COOH	ПААГ	Барвник фіксатор	20 хв.	7% CH <sub>3</sub> COOH	[5; 6; 15]
	Г. 0,5г, 10г Hg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> до 1 л 0,5% CH <sub>3</sub> COOH	Папір	Барвник фіксатор	10-15 хв.	0,5% CH <sub>3</sub> COOH	[15]
Амідо-чорний 10Б	А. 10 г у 1 л 7% CH <sub>3</sub> COOH	ПААГ	Барвник фіксатор	20 хв.	7% CH <sub>3</sub> COOH	[15]
	Б. 0,5г у суміші CH <sub>3</sub> OH, H <sub>2</sub> O, CH <sub>3</sub> COOH (5:5:1)	КГ, ПААГ, папір	Барвник фіксатор	2-3 хв.	суміш CH <sub>3</sub> OH, H <sub>2</sub> O, CH <sub>3</sub> COOH (5:5:1)	[1; 5; 16]
	В. 1,0г у 1 л 7% CH <sub>3</sub> COOH	Папір, ПААГ, КГ, АГ	10% ТХО	20 хв.	7% CH <sub>3</sub> COOH	[6; 7; 8; 10; 12; 15]
	Г. 1г, 27 мл CH <sub>3</sub> COOH, 6,12 г CH <sub>3</sub> COONa 100 мл гліцерину у 1 л H <sub>2</sub> O	КГ, АГ, ПАЦ	Барвник фіксатор	2-3 год.	2% CH <sub>3</sub> COOH і 15% гліцерин	[15]
Метиловий зелений	Д. 0,1г, 900 мл CH <sub>3</sub> OH, 100 мл CH <sub>3</sub> COOH	ПААГ, ПАЦ	10 хв. у 10% CH <sub>3</sub> COOH	60 хв.	Суміш CH <sub>3</sub> OH і CH <sub>3</sub> COOH (9:1)	[7; 8; 15]
	0,1 г у 1 л H <sub>2</sub> O	АГ, ПААГ	7% CH <sub>3</sub> COOH	20 хв.	7% CH <sub>3</sub> COOH	[17]

Понсо S	А. 0,2 г у 3% ТХО до 100 мл	АГ, ПАЦ, ПААГ	3% ТХО	60 хв.	5% CH <sub>3</sub> COOH	[7; 8]
	Б. 0,5 г в 10% сульфосаліцилової кислоти	ПААГ, ПАЦ, АГ	Барвник фіксатор	5-10 хв.	10% сульфосаліци-лова кислота	[4; 12]
Кислот-ний фуксин	2 г у суміші CH <sub>3</sub> OH, H <sub>2</sub> O і CH <sub>3</sub> COOH (5:4:1)	АГ	10% CH <sub>3</sub> COOH	15 хв.	10% CH <sub>3</sub> COOH	[7; 8]
Кумасі блакит-ний R-250	А. 0,1 г, 30 мл C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH, 30 г ТХО і до 100 мл H <sub>2</sub> O.	ПААГ	Барвник фіксатор	20 хв.	7% CH <sub>3</sub> COOH	[10; 11; 12]
	Б. 0,25% у суміші CH <sub>3</sub> OH, CH <sub>3</sub> COOH і H <sub>2</sub> O (5:1:5)	ПААГ, КГ, АГ	Барвник фіксатор	30 хв.	суміш CH <sub>3</sub> OH, CH <sub>3</sub> COOH і H <sub>2</sub> O (5:1:5)	[15]
ПК-144 (синтетичний триметиний барвник)	1 г, 3 г сульфосаліцилової к-ти, 3 г ТХО в 1 л H <sub>2</sub> O	ПААГ, ПАЦ	Барвник фіксатор	5-10 хв.	5-7% CH <sub>3</sub> COOH	[4; 12]

Як видно з даних Табл. 1 для ідентифікації білкових фракцій рідин організму, розділених методом електрофорезу на твердих носіях, використовують велику кількість органічних барвників. Всього згідно з даними, наведеними в роботах вітчизняних та зарубіжних авторів, з цією метою використовують більше 30 органічних барвників. Барвники, як правило, входять до складу фарбуючих розчинів, які містять певні складові компоненти, що забезпечують фіксацію білкових фракцій і стабілізацію барвника. Крім того, різні автори використовують специфічні багатоконпонентні фарбуючі суміші, на основі одного й того ж барвника, які можуть мати різну чутливість до окремих білкових фракцій. Одні з цих барвників є універсальними і можуть бути використані для забарвлення білкових фракцій, розділених на різних носіях, а для інших характерна висока вибірковість і специфічність лише до окремих носіїв.

Так, водні розчини Бромфенолового синього з додаванням CH<sub>3</sub>COOH (W(%)=99,9) використовують для забарвлення електрофореграм, розділених на папері, ПААГ, АГ.

Додавання до розчину Бромфенолового синього ZnSO<sub>4</sub> і CH<sub>3</sub>COOH (W(%) = 99,9) застосовують для забарвлення білкових фракцій, розділених методом електрофорезу на плівках ацетату целюлози. Незважаючи на значну тривалість забарвлення (12 год.) застосування цього барвника дає змогу отримати стійкі комплекси з біолігандами, що робить можливим тривале зберігання забарвлених препаратів.

Амідо-чорний 10Б і тотожний йому Синьо-чорний барвник використовують для забарвлення АГ і ПААГ та при імуноелектрофорезі. Цей барвник є значно чутливішим порівняно з іншими.

Ряд барвників, які містять токсичні сполуки (Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>OH) мають обмежене застосування, хоч згідно з даними літератури є у достатній мірі ефективними.

На основі аналізу даних літератури, а також попередніх власних досліджень, нами було відібрано барвники, компонентний склад яких давав

змогу з максимальною ефективністю проводити кількісну оцінку електрофореграм. Так, розчин Амідо-чорного 10Б ми готували на основі варіанту Б (див. Табл. 1.), однак у деякій модифікації (0,5 г в 1 л 10% CH<sub>3</sub>COOH), оскільки при використанні запропонованого авторами компонентного складу фарбуючої суміші значну проблему складало знебарвлення фону: практично не вдалося отримати абсолютно безбарвний фон, що ускладнювало кількісну оцінку отриманих результатів методом денситометрії. Для відмивання барвника, не зв'язаного з білками, застосовували 7% CH<sub>3</sub>COOH. Бромфеноловий синій використовували згідно з компонентним складом варіанту В (див. Табл. 1.), Понсо S і Кумасі R-250 – відповідно варіант А (див. Табл. 1.).

Як вказувалося раніше, важливе значення при розділенні білків методом зонального електрофорезу має вид носія. Використання у вигляді носія ПААГ дає змогу розділити білки сироватки крові на ряд фракцій, кількість яких залежить від багатьох факторів. В першу чергу, це стосується умов проведення електрофорезу (рН буферного розчину, кількості нанесеного зразка, сили струму та ін.). Крім того, на думку ряду авторів, важливе значення можуть мати генетичні характеристики індивідумів та наявність певних видів метаболічних розладів [1; 2].

При застосуванні цього виду носія, як правило, отримують 12-25 фракцій [17]. Інші автори [18] вказують на можливість розділення білків сироватки крові на 25-30 фракцій.

В умовах нашого експерименту після електрофоретичного розділення на електрофореграмах було ідентифіковано 15-17 білкових фракцій, які згідно з таблицею відносної електрофоретичної рухливості, для зручності їх кількісної оцінки, було розділено на 7 зон:

Таблиця 2

№ п/п	Зони, виділені на фореграмах	Відносна електрофоретична рухливість
1.	Преальбуміни	2,7 – 2,35
2.	Альбумін	2,0 – 1,86
3.	Постальбуміни	1,7 – 1,23
4.	Трансферин	1,0 – 0,9
5.	Посттрансферини	0,86 – 0,66
6.	Швидкі глобуліни	0,56 – 0,16
7.	Повільні глобуліни	0,09 – 0,03

Кожна з цих зон містить певну кількість білкових фракцій, що відповідають електрофоретичній рухливості альбуміну, α<sub>1</sub>-, α<sub>2</sub>-, β<sub>1</sub>-, β<sub>2</sub>- і γ-глобулінів, які складають білковий спектр сироватки крові. Ці фракції, в свою чергу, є гетерогенними і містять характерні для них індивідуальні білки. Так, преальбумінова фракція містить, так звані, парапротейни, вміст яких зазнає закономірних змін при різних видах патології, а також частину α<sub>1</sub>- і α<sub>2</sub>-ліпопротеїнів. Постальбумінова фракція містить орозомукоїд, α<sub>1</sub>-антитрипсин, гемопексин та ін. Гетерогенними є й інші фракції, до складу яких входять трансферин, гаптоглобін, β-ліпопротеїни, імуноглобуліни та інші білки.

Враховуючи це, висока розділяюча здатність ПААГ, зумовлена його властивостями, має важливе значення при діагностиці ряду захворювань, які супроводжуються різноплановими змінами кількісного вмісту та якісного складу індивідуальних білків, що входять до складу окремих білкових фракцій, які можуть називатися неоднозначних, різнонаправлених змін.

Для співставлення ефективності використання органічних барвників, при розділенні білкових фракцій рідин організму, нами було проведено експериментальне дослідження, у якому з'ясувалася частота виявлення окремих білкових фракцій залежно від виду барвника, що застосовується для їх ідентифікації. Отримані результати узагальнені у Табл. 3.

Таблиця 3

№ п/п	Зони відносної електрофоретичної рухливості білків сироватки крові	Частота виявлення окремих білкових фракцій (%)			
		Бромфеноловий синій	Понсо S	Амідо-чорний 10Б	Кумасі R-250
1.	Преальбуміни (фінішна зона)	–	35,7 ± 1,24	–	74,0 ± 0,32
2.	Альбумін	100	100	100	100
3.	Постальбумін	48,0 ± 1,26	36,4 ± 1,23	26,4 ± 1,34	42,0 ± 0,93
4.	Трансферин	100	100	100	100
5.	Посттрансферини	43,0 ± 2,43	34,0 ± 1,76	40,7 ± 0,94	37,4 ± 1,23
6.	Швидкі глобуліни	100	100	100	100
7.	Повільні глобуліни (стартова зона,)	84,6 ± 1,24	58,7 ± 2,76	66,3 ± 0,94	57,3 ± 1,42

Як видно з даних таблиці, при забарвленні дослідних зразків Бромфеноловим синім і Амідо-чорним 10Б не виявляється преальбумінова фракція, в той час як застосування Кумасі R-250 і Понсо S дають змогу отримати у цій зоні кілька дуг преципітації з відносною електрофоретичною рухливістю 2,7 – 2,35. Частота виявлення цих фракцій складає відповідно 74% і 35,7%.

Фракція альбуміну ідентифікується при застосуванні всіх барвників, частота виявлення її складає 100%, однак спорідненість окремих барвників до цієї фракції різна, про що свідчить кількісна оцінка електрофореграм (Табл. 4.). Найвищу спорідненість до цієї фракції виявлено для Кумасі R-250, достатньо високу для Бромфенолового синього і дещо нижчу для решти барвників.

Постальбумінові фракції, з відносною електрофоретичною рухливістю 1,7 – 1,23, було виявлено при забарвленні ПААГ Бромфеноловим синім, Понсо S, Амідо-чорним 10Б і Кумасі R-250, частота виявлення їх відповідно 48,0; 36,4; 26,4 і 33,6%. Разом з тим Амідо-чорний 10Б і Понсо S дають слабок забарвлення цих фракцій, що не дає змоги провести їх кількісну оцінку методом елюювання.

Що стосується решти білків, то трансферин, посттрансферини, швидкі і повільні глобуліни були ідентифіковані за допомогою всіх барвників, які

використовували для забарвлення. Суттєва різниця стосується частоти виявлення окремих фракцій посттрансферину, швидких і повільних глобулінових фракцій при забарвленні Бромфеноловим синім і Амідо-чорним 10Б, що мають високу спорідненість до них. Це дещо суперечить літературним даним стосовно вищої чутливості до цих фракцій Кумасі R-250, порівняно з іншими барвниками [11]. В умовах нашого експерименту чутливість методу при застосуванні цього барвника дещо нижча, що можна пояснити перекриттям окремих фракцій, внаслідок виявлення слідових кількостей білка на їх межі, що ускладнює ідентифікацію кожної з них. Свідченням цього є виявлення преальбумінової фракції, яку не вдається ідентифікувати за допомогою решти барвників. Висока спорідненість Кумасі R-250 до пре- і постальбумінових фракцій вказує на доцільність використання його для ідентифікації цих фракцій при діагностиці захворювань, що супроводжуються значним перерозподілом індивідуальних білків, які входять до їх складу ( $\alpha_1$ - і  $\alpha_2$ -ліпопротеїни,  $\alpha_1$ -орозомукоїд,  $\alpha_1$ -антитрипсин та ін.).

На визначення вмісту окремих білкових фракцій сироватки крові, розділених електрофорезом на ПААГ, важливе значення має метод їх кількісної оцінки. Так, при застосуванні елюювання преальбумінова фракція виявляється у слідових кількостях, що не дає змоги провести визначення їх кількісного вмісту за допомогою фотоелектроколориметрії. Крім того, при застосуванні цього методу важко виокремити індивідуальні білки, що входять до складу окремих білкових фракцій. У цьому плані надійнішим є пряме денситометрування гелів, незважаючи на його деякі недоліки, на яких наголошувалося раніше.

Для кількісної порівняльної характеристики ефективності використання органічних барвників нами було відібрано фракції, виявлені як при денситометрії, так і при елюції: альбумінову, постальбумінову (містить основну кількість  $\alpha_1$ - і  $\alpha_2$ -глобулінів), трансферінову і посттрансферінову, де локалізована основна кількість  $\beta$ -глобулінів, та фракцію  $\gamma$ -глобулінів.

Дані стосовно кількісного вмісту окремих білкових фракцій сироватки крові, розділених методом диск-електрофорезу в ПААГ, при забарвленні різними органічними барвниками, представлені в Табл. 4.

Таблиця 4

Барвники	Стат. показник	Альбуміни	Глобуліни				
			$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta_1$	$\beta_2$	$\gamma$
Бромфеноловий синій	Mc ± m	<b>56,73 ± 1,23</b>	4,23 ± 0,28	11,5 ± 0,36	9,25 ± 0,76	3,85 ± 0,24	14,72 ± 1,34
Амідо-чорний 10Б	Mc ± m	54,42 ± 1,42	3,84 ± 0,32	10,4 ± 0,43	8,90 ± 1,24	3,90 ± 0,92	12,4 ± 0,64
Понсо S	Mc ± m	53,24 ± 1,43	4,72 ± 0,93	8,73 ± 0,37	8,61 ± 0,76	3,64 ± 1,24	12,3 ± 0,84
Кумасі R-250	Mc ± m	59,87 ± 0,37	4,64 ± 0,12	9,3 ± 1,2	8,43 ± 0,74	3,27 ± 0,43	11,83 ± 0,62

Як видно з даних таблиці, найвищі значення кількісного вмісту альбуміну (59,87%) отримані при використанні для забарвлення гелів барвника Кумасі R-250, дещо нижчі значення отримані при використанні інших барвників.

При кількісній оцінці глобулінових фракцій виявлено, що вищі абсолютні значення вмісту їх отримано при забарвленні Бромфеноловим синім і Амідо-чорним 10Б. При використанні таких барвників, як Понсо S і Кумасі R-250 абсолютні значення кількісного вмісту цих фракцій дещо нижчі, однак різниця не є суттєвою і лежить в межах похибки методу.

Таким чином, на основі проведених досліджень можна зробити висновки:

1. Для забарвлення електрофореграм, отриманих методом диск-електрофорезу в ПААГ, можна використовувати усі досліджувані нами барвники, однак чутливість методу вища при застосуванні Бромфенолового синього і Кумасі R-250.
2. Вид барвника суттєво впливає на кількісну оцінку електрофореграм. Різниця інтенсивності забарвлення окремих фракцій очевидно пов'язана з різним ступенем спорідненості барвників до окремих індивідуальних білків, які входять до складу білкових фракцій.
3. Для забарвлення електрофореграм доцільним є використання багатокомпонентних розчинів, які містять барвники, фіксатори та просвітлювачі.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Ларский Э.Г. Современные методы электрофореза (обзор литературы) // Лаб. дело. – 1990. - № 9. - С. 4-11.
2. Троицкий Г.В. Электрофорез белков. – Харьков: Изд-во Харьк. ун-та, 1962. – С. 201-234.
3. Monere C. Clin. Wochenschr, 1956. – 34. – С. 100-110.
4. Миронов О.Л., Билобров В.М. и др. Применение триметинового красителя для окрашивания белков после электрофореза на ацетате целлюлозы. // Лаб. дело. – 1990. - № 6. - С. 9-11.
5. Биохимические методы исследования в клинике. Справочник. Под ред. Покровского А.А. – М.: Медицина, 1989. – С. 65-74.
6. Практикум по биохимии. Под ред. Меньшиковой Н.П., Северина С.Е. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1999. – С. 120-135.
7. Davis R.H., Copenhaver J.H., Carver M.J. Quantitation of stained proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem., 1974. - 615. - p. 58-61.
8. Ornstein L. Disc electrophoresis I. Background and theory. Ann. N.J. Acad. Sci. 1964. - 321. - p. 121-127.
9. Корытов М.В., Калачёва Е.А. Прибор для электрофоретического окрашивания и обесцвечивания плоских ПААГ. // Лаб. дело. – 1986. - № 4. - С. 231-232.
10. Аврунин А.С., Четверикова Т.Д. К вопросу о целесообразности использования амидо-чёрного 10В и кумасси R-250 бриллиантового голубого для окраски диск-электрофореграм сыворотки крови. // Лаб. дело. – 1986. - № 2. - С. 100-101.
11. Вееке Б. В кн.: Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу. – М., 1997. – С. 11-42.
12. Маурер Г. Диск-электрофорез: теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле. – М.: Мир, 1986. – С. 140-156.
13. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия (пособие для врачей-лаборантов). – Минск: Беларусь, 1996. – С. 5-12.
14. Wong P., Barbean A., Rosse A. // Analyt. Biochem. – 1985 – Vol. 150. - № 2 p. 288-293.
15. Біологічна хімія. Практикум. Виноградова Р.П., Кучеренко Н.Е., Литвиненко А.Р. та ін. – К.: Вища школа, 1997. – С. 134-157.
16. Васильева Е.Д. Электрофорез белков в ацетилкромхальном геле. // Лаб. дело. – 1968. - № 4. - С. 236-238.
17. Reisfeld R.A., Lewis U.J., Williams D.E. Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. Nature, 1962. - 281. - p. 195-198.
18. Pastewska J.V. Neers A.T. et al Clin. Chim-Acta. - 1996. - vol. 14. - p. 219-226.