

Спрощений та удосконалений варіант методики дифузного висолювання білків

М. В. Зеленський

Лабораторія біофізики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця
Академії наук УРСР, Київ

В зв'язку з підвищеним інтересом до методичних прийомів дифузного висолювання білків у клінічних лабораторіях і істотним спрощенням процедури приготування стабільних суспензій висолених білків, виникла необхідність опублікувати удосконалений варіант методики, апробований за останні два роки. Цей варіант може бути основою для будь-якого іншого методичного прийому дифузного висолювання (звичайно, з варіаціями в деталях), який ураховує індивідуальні особливості фізико-хімічних властивостей білків і полікомпонентних білкових середовищ.

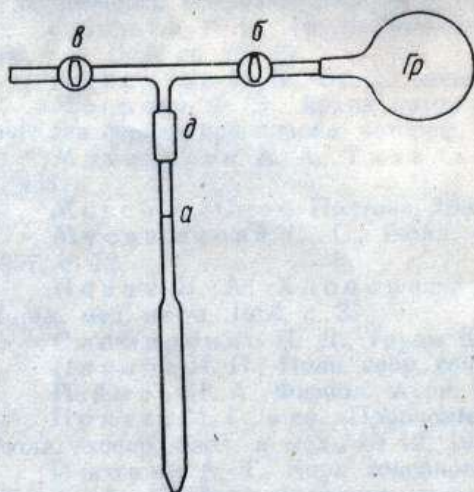


Рис. 1. Схема піпетки для розливу висолюючих сумішей в пластмасові стакани.

Гр — гумова груша, «б» і «в» — краєві, «д» — перехідна гумова трубка, «а» — вимірвальна риска на звуженій частині піпетки.

Пропонований варіант методики можна застосувати для одержання кривих висолювання білків таких середовищ, як сироватка крові, лімфа, спинномозкова рідина, сік підшлункової залози, формені елементи крові, гемоглобін, обезжирені водні екстракти з гомогенатів тканини тварин, рослин і т. д., якщо концентрація білків у розчині не перевищує 200 мг%. Полікомпонентні середовища краще висолювати, якщо сумарна концентрація білків наближається до граничної, ураховуючи малу концентрацію деяких компонентів. Чутливість методики турбідиметрії настільки висока, що можна зробити аналіз спинномозкової рідини без її згущення.

Обладнання лабораторії дуже просте, якщо не враховувати фотоколориметр, наприклад, типу ФЕК-М. В кімнаті, де провадять розлив висолюючих середовищ, нашаровування розчину білків на поверхню висолюючої «підкладки» і фотометрію, необхідно уникати впливу пари води і летучих кислот. Не можна також протягом

тривалого часу допускати, щоб температура повітря була нижчою від 14—16° С. Особливу увагу треба приділяти боротьбі з пилом. На відміну від попередніх варіантів методики, ми тепер виключаємо необхідність у спеціальній вентиляції кімнати.

Висолюючі суміші зберігають у пляшках будь-якої місткості. Бажаємо мати пляшки білі, прозорі. Вони дуже зручні в умовах встановлення меніску розчину в піпетці ємністю 9,5 мл (рис. 1). Пляшки закупорюють гумовими або поліетиленовими пробками. Розрахунок суміші висолювача і розріджувача висолюючих «підкладок» для аналізу сироваток крові людини наведено в таблиці.

Висолювач — це насичений розчин сірчаноокислого амонію, підлугований ідким натрієм. Кожний літр амонію змішують з 7 мл 50%-ного (або густоти 1,525) добре очищеного тривалим відстоюванням або центрифугуванням у закритих пробірках (при цьому використовують пальці гумових рукавичок) ідкого натрію. Сіль застосовують марки ЧДА або ХЧ. Висолювач очищають тривалим відстоюванням у бутелі, обов'язково закупореній еластичною гумовою пробкою.

Розливання висолювача і розріджувача

Концентрація висолювача (в % насичення)	Об'єм розріджувача (в мл)	Об'єм висолювача (в мл)	Концентрація висолювача (в % насичення)	Об'єм розріджувача (в мл)	Об'єм висолювача (в мл)
0	950	0	48	470	480
2	930	20	50	450	500
4	910	40	52	430	520
6	890	60	54	410	540
8	870	80	56	390	560
10	850	100	58	370	580
12	830	120	60	350	600
14	810	140	62	330	620
16	790	160	64	310	640
18	770	180	66	290	660
20	750	200	68	270	680
22	730	220	70	250	700
24	710	240	72	230	720
26	690	260	74	210	740
28	670	280	76	190	760
30	650	300	78	170	780
32	630	320	80	150	800
34	610	340	82	130	820
36	590	360	84	110	840
38	570	380	86	90	860
40	550	400	88	70	880
42	530	420	90	50	900
44	510	440	92	30	920
46	490	460	95	0	950

Примітка. Концентрація висолювача відповідає величині, яка відзначається, коли висолуючу «підкладку» (9,5 мл) змішують з 0,5 мл розчину білків на воді.

Розріджувач являє собою насичений розчин хлориду натрію марки ХЧ (обов'язково). Його очищають так само, як і висолювач, тривалим відстоюванням. Обидва розчини перед складанням серії сумішей (див. таблицю) перевіряють на оптичну чистоту. В синьому світлі фотоколориметра екстинкція висолювача і розріджувача має бути меншою за екстинкцію дистильованої води.

На кожній пляшці наклеюють етикетку з позначенням концентрації висолювача, відповідно до таблиці, наприклад: 0; 4; 10; 12; 14; 16; 18 і т. д. 86; 88; 90, а при аналізі білків сироватки крові собаки навіть 92 і 95%.

Висолювач і розріджувач сифонують за допомогою чистої гумової трубки, відмірюють необхідний об'єм у мірному циліндрі і старанно перемішують у пляшці. Остання умова дуже важлива, оскільки вона зумовлює точність розрахункової концентрації висолювача (згідно з етикеткою) після додавання розчину висолуючого білка. Невиконання цього неминуче призводить до випадання точок з кривої висолування.

Перед розливанням висолуючих сумішей послідовно відповідно до таблиці відмічають стандартні пластмасові стакани восковим олівцем. Потім у такий же послідовності треба вводити по 9,5 мл висолуючої суміші. Для цього застосовують піпетку, яку показано на рис. 1, або автомат, придатний для такої роботи.

Піпетку калібрують на 9,5 мл з відміткою у вузькій частині («а»). Обидва крапи («б» і «в») мають бути щільно пригнані та обов'язково наглянсовані каучуковим мастилом. Зберігають піпетку наповненою слабким розчином аміачної води. Перед розливанням відкривають кран «в» і зливають воду в будь-яку склянку. Потім кран «в» закривають, відкривають кран «б», витискують повітря з гумової груші і закривають його. Вставляють піпетку конусним кінцем у пляшку з висолуючою сумішшю (в порядку збільшення концентрації висолювача) так, щоб конусний кінець її був занурений у розчин, обережно відкривають кран «б» і за допомогою вакуума, повільно, засмоктують його приблизно на 2 см, а потім відкривають кран повністю і швидко наповнюють піпетку до рисочки «а». Якщо це зробити не вдається, краще перейти рисочку і, закривши кран «б», довести меніск розчину до рисочки за допомогою крапа «в».

В результаті тривалого зберігання суміші можна помітити утворення на дні пляшки пилу з дуже малих кристалів солі. Тому в усіх випадках і, особливо тоді, коли в пляшці залишається незначна кількість розчину, слід відсмоктувати суміш з верхніх шарів і ні в якому разі поблизу дна.

Висолюючу суміш зливають на дно стакана без розбризкування. Дуже небажане попадання крапель на стінку стакана. Висушування їх призводить до утворення кристалів солі, які дуже повільно розчиняються в висолювачі при змішуванні перед процедурою фотометрії. Це явище зумовлює розкиданість точок на кривій висолювання.

Застосування способу розливання попередньо підготованих висолюючих сумішей виключає потребу щоразу робити розрахунки. При цьому відпадає необхідність перемішувати висолювач з розчинником у кожному стакані і старанно стежити за процесом перемішування.

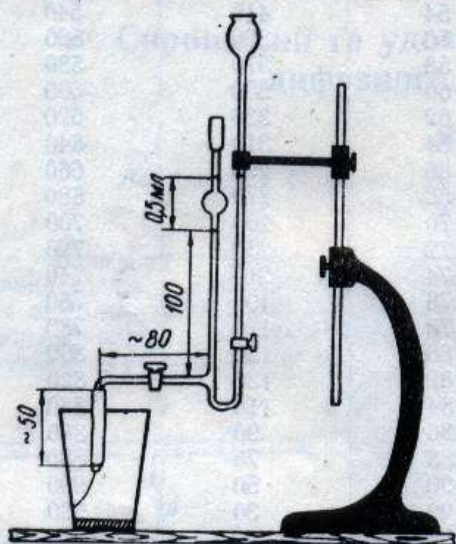


Рис. 2. Схема мікробюретки для нашарування розчину білків на поверхню «підкладки» (показано також штатив і пластмасовий стакан в розрізі). Розміри наведені орієнтовні, за винятком об'єму мірної кулі з капілярними відростками.

Процедуру нашарування розчину білків на поверхню висолюючої стандартної суміші можна здійснювати паралельно з розливанням, що значно прискорює процес приготування суспензій висоливих білків. Перемішування таких сумішей у стаканах зовсім виключається. Стандартизація умов висолювання білків значно ослаблює «суб'єктивний фактор», що залежить від навичок препаратора або лаборанта. Криві висолювання, одержані різними експериментаторами від однієї сироватки крові, збігаються з різницею в 1—2%. Тут доречно нагадати важливу умову боротьби з пилом. Необхідно завжди контролювати суспензії на забрудненість. Чиста суспензія в синьому світлі має рівномірний ясний конус Тиндалля. Забруднена суспензія відсвічує зірками. Кожна «зірка» — це пилинка, яка яскраво сяє. В полі зору одна — три «зірки» мало впливають на результати аналізу. Дуже небажана наявність крупних часток пилу й особливо нитковидної форми. В цих випадках треба зачекати, поки відсвічуюча частка вийде з поля зору, і тільки тоді провести вимір мутності. Про небезпеку появи «колоїдного» бруду див. монографію (Зеленський, 1959).

Завжди треба контролювати, чи не забруднені оптичні скельця кювети, яку також зберігають наповненою слабкою аміачною во-

дою. Треба уникати частого протирання оптичного скла кювети, бо це призводить до помутніння його поверхні, і внаслідок цього до зміни нульової екстинкції.

При фотометрії непофарбованих або слабо пофарбованих середовищ досить мати одну кювету і порівнювати поглинання світла з відповідним показником повітря. Для аналізу кольорових середовищ, таких, як гемоглобін крові, потрібна «компенсуюча кювета» в правому боксі ФЕК-М, до того треба обов'язково користуватися «шторкою», без якої в таких випадках стабілізація «нуля» на приладі неможлива.

Нашарування розчину білків на поверхню висолюючих сумішей здійснюють за допомогою мікробюретки через найтоншу голку шприца. Швидкість зливання 0,5 мл розчину білків має бути рівномірною. Час нашарування 0,5 мл розчину білків, якщо враховувати високу щільність «підкладки», можна зменшити до 25 сек. Це також сприяє скороченню часу підготовки мутних середовищ. Фото мікробюретки можна побачити в нашій монографії (1959). Тепер нами була застосована мікробюретка з капілярної трубки (див. схему на рис. 2). Її перевагою є зменшення об'єму розчину білків, для нашарування: замість 40 мл досить 30 мл розчину білків, а об'єм сироватки крові зменшується з 0,8 до 0,6 мл.

Розчинник білків стандартний і відповідає 10% (від насичення) висолювача — рН 10. В ряді випадків треба змінювати йонну силу розчинника і пам'ятати, що концентрація його висолювача в деякій мірі змінює розрахункову (табличну) величину. Для 10%-ного розчинника загальна концентрація розчину, який фотометрують, збільшується тільки на 0,5%.

Розчин білків сироватки крові для нашарування готують так: 26,4 мл дистильованої води змішують з 3 мл висолювача (рН 10) у пластмасовому стакані, потім додають 0,6 мл сироватки крові і старанно перемішують, запобігаючи утворенню піни.

Висолювач (рН 10) являє собою суміш 1 л висолювача (рН 8,2) і 44 мл 50%-ного розчину їдкого натрію, обов'язково добре очищеного. Висолювач (рН 10) зберігають у закупореній колбі, оскільки в ньому є багато вільного аміаку. Для закупорки

застосовують гумову пробку. Вдихати повітря з колби не можна. 10%-ний розчин (від насичення) висолювача (рН 10) у воді небезпечний для дихання.

В умовах клініки часто буває потреба швидко визначити концентрацію білків сироватки крові, альбумінів, глобулінів, гамма-глобулінів та інших глобулінів середньої і високої висолюваності. В таких випадках досить вибрати з кривої висолювання ряд окремих точок і обчислити приріст концентрації білків між ними. Кількість точок і вибір їх за шкалою концентрації висолювача (горизонтальна вісь кривої висолювання) залежить від умов аналізу. При строго стандартному режимі висолювання білків спостерігаються не лише кількісні зміни (вертикальна вісь системи координат), а й якісні, тобто змінення зони висолюваності. Останній фактор має велике практичне значення для вивчення динаміки фізико-хімічних змін властивості білка.

Крива висолювання відбиває функцію-

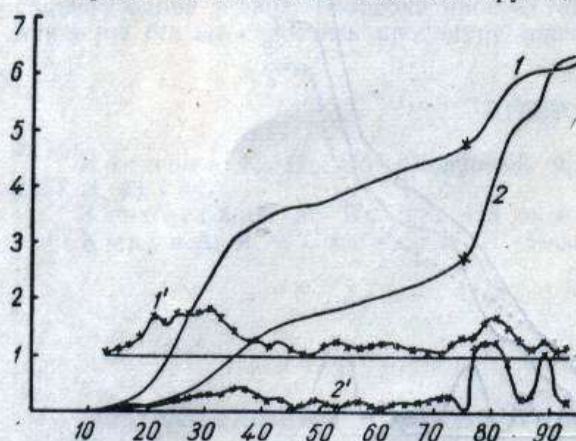


Рис. 3. Криві висолювання білків сироватки крові собаки:

1 — тварини віком близько 7 років, 2 — віком близько одного року. Перші похідні відповідно 1' і 2'. На вертикалі — % білків, на горизонталі — % висолювача.

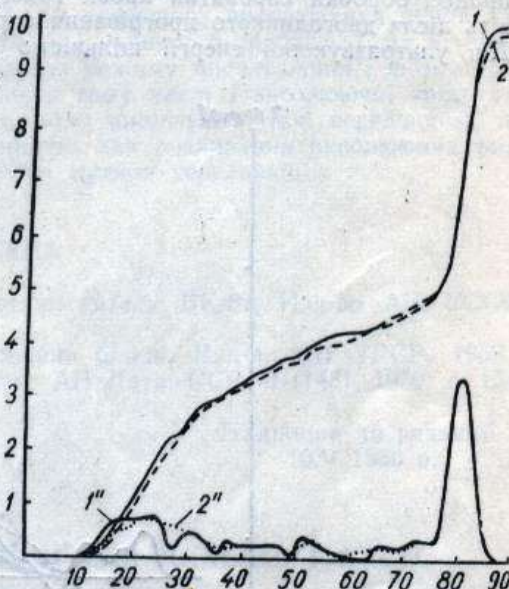


Рис. 4. Крива висолювання:

1 — білків сироватки крові хворої людини, 2 — після опромінювання 10^5 р. Перші похідні, відповідно, 1'' і 2''.

нальну залежність концентрації білків від концентрації висолювача в суміші. Тому «зона висолювання» є основною фізико-хімічною характеристикою білка, який піддають аналізу. Перша похідна від кривої висолювання відображає швидкість (темпер) росту концентрації білків (у 2%-ному інтервалі концентрації висолювача). Вона менш точна, ніж крива висолювання. Її будують після інтерполяції кривої висолювання.

Розшифрування значення варіації кривої висолювання і першої похідної від неї в залежності від динаміки білкового обміну в організмі, по суті, тільки починається. Треба буде докладати значних зусиль для виявлення взаємозв'язку між дуже тонкими фізико-хімічними процесами обміну і формою кривої висолювання. Для цього вже створені методичні можливості шляхом вивчення кривої висолювання в динаміці раціонально підбраного комплексу навантажень на організм. Крім того, цей комплекс доповнюється вивченням впливу умов зовнішнього середовища на висолюваність білків поза організмом. Зміна іонного складу «підкладки» (суміші висолювача і розріджувача), вплив на білки середовища активними реактивами, які специфічно або неспецифічно взаємодіють з тим чи іншим компонентом, залежно від умов аналізу, значно збагачують наші уявлення про індивідуальні особливості кожного організму. Треба відзначити, що залежно від поставленого завдання експериментатор має широкі можливості варіювати трудоемкість методичних прийомів дифузного висолювання.

Форма кривої висолювання білків крові істотно змінюється залежно від виду тварини, її віку і характеру білкового обміну організму. Наскільки значні бувають ці відмінності в нормі можна бачити, якщо порівняти криві висолювання білків сироватки крові собаки старого і молодого віку (див. рис. 3).

Кількісні зміни зручно визначати на основі кривої висолювання, а якісні варіації згідно з першою похідною від неї. Перша похідна характерна так званими «піками». Піки бувають симетричні і несиметричні, плоскі й гострі, відділені один від одного і перекриті.

Форма піка та його розміщення вздовж шкали концентрацій висолювача точно характеризують властивість білкового середовища «висолюватись», особливо, в дина-

міщі змін його фізико-хімічних параметрів. Будь-який процес, що супроводжується зменшенням величини питомого заряду білка, зумовлює зміщення зони висолювання «ліворуч». В залежності від сили і характеру впливу на білок це зміщення зони висолювання також варіює. Особливо значні бувають зміщення зони висолювання білків, які зазнають глибокої денатурації. Як приклад можна навести альбумін сироватки крові бика і одержуваний з нього препарат БК-8. За даними К. І. Коткової (1957), БК-8 за електрорухомістю незначно відрізняється від сироваткового альбуміну, а виходячи з кривої висолювання зона висолювання БК-8 зміщується «ліворуч» більш ніж на 50%, що свідчить про надзвичайно глибоку денатурацію альбуміну в процесі обробки сироватки крові. Такого зміщення зони «ліворуч» ми не бачили навіть після двогодинного прогрівання сироватки крові при 56–60° С (Зеленський, 1957). Дія ультразвукової енергії щільністю 10 вт/см^2 на білки сироватки крові протягом

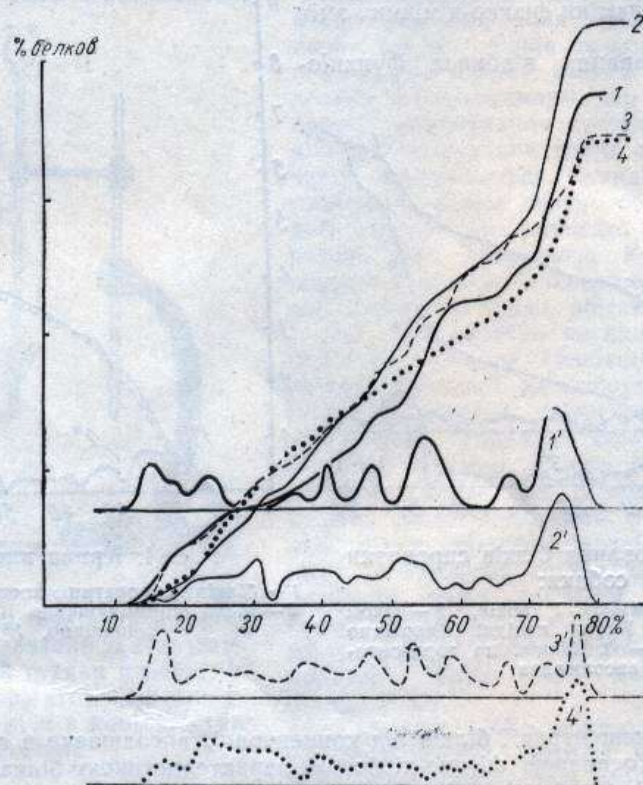


Рис. 5. Криві висолювання білків сироватки крові шурів — 1, 2, 3 і 4. Перші похідні, відповідно, 1', 2', 3' і 4'.

20 хв. значно змінює властивості білків, особливо грубодисперсних гамма-глобулінів (Крауя і Скардс, 1959), але результат такої дії поступається описаному вище.

Зміщення зони висолювання «праворуч» буває в результаті збільшення питомого заряду білка, тобто є наслідком посилення його гідрофільності. Подібне явище можна показати, іонізуючи деякі білки (наприклад, гамма-глобуліни) за допомогою великих доз рентгенівської енергії (див. рис. 4).

Ще простіше продемонструвати це, змінюючи реакцію середовища висолювача і розчинника білків. Зараз ми маємо підстави вважати, що і в організмі питомі заряди білків чутливо варіюють. Це фіксується спектром висолювання білків, якщо строго додержувати стандартного режиму дифузного висолювання. Отже, по кривій висолювання можна стежити за фізико-хімічними змінами білкового обміну в організмі.

Ми вже відзначили (1959), що видові особливості собаки помітно відбиваються на кривій висолювання гемоглобінів крові (як кількісно, так і якісно) і відзначаються різними зонами висолювання та властивістю їх дисоціювати у водносоловому середовищі збільшеної іонної сили. Тому, по кривій висолювання білків сироватки крові ми можемо встановити, чи відбувався гемоліз (штучний або функціональний). Для цього досить встановити приріст мутності між концентрацією висолювача 92–95%. В 10%-ному розчині висолювача (рН 10) гемоглобіни крові собаки дуже легко дисоціюють на дрібні частки із збільшеним питомим зарядом.

Зона висолювання альбумінів сироватки крові собаки за пороговою точкою збігається із зоною висолювання альбумінів сироватки крові людини, але критичні точ-