

МЕТОДИ

УДК 616.153.96-074

МОДИФІКАЦІЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОГО МЕТОДУ ВИЗНАЧЕННЯ КАРБОНІЛЬНИХ ГРУП ПРОТЕЇНІВ

О. В. ЗАЙЦЕВА, С. Г. ШАНДРЕНКО

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: Olgga__89@mail.ru

На основі детального дослідження спектрів оптичного поглинання гідразонів протеїнів модифіковано спектрофотометричний метод визначення вмісту карбонільних груп протеїнів. Суть модифікації полягає у тому, що визначення вмісту гідразонового адукту проводиться по оптичному поглинанню не на одній довжині хвилі (370 нм), а на трьох (320, 370 та 420 нм). Дві додаткові довжини хвилі необхідні для лінійної апроксимації оптичного спектра «фону». Запропоновано формулу, яка дозволяє розрахувати інтенсивність гідразонового піку поглинання і значно зменшити похибку визначення вмісту протеїнових СО-груп.

Ключові слова: протеїни, карбонільні групи, 2,4-динітрофенілгідрозон.

Внаслідок окисно-відновних реакцій в живих організмах відбувається генерація активних форм кисню (АФК: $O_2^{\cdot-}$, O_2^1 , $\cdot OH$, RO_2 , OH_2 , H_2O_2 та ін.), які беруть участь у фізіологічних та патологічних процесах [1, 2]. Однією з найреактивніших форм є гідроксильний радикал ($\cdot OH$), який спричинює пероксидне окислення ліпідів (ПОЛ), окисну модифікацію протеїнів (ОМП), деструкцію нуклеїнових кислот і вуглеводів, що у свою чергу, призводить до структурних і метаболічних порушень [2, 3].

Залежно від інтенсивності генерації АФК ступінь ОМП може бути різним: від поодиноких пошкоджень амінокислотних залишків до агрегації та фрагментації протеїнових молекул. Досить детально вивчено модифікацію протеїнів за дії АФК з утворенням додаткових карбонільних груп у бічних ланцюгах амінокислот [4–7].

Вміст СО-груп може бути показником оксидативного стресу при таких патологічних станах, як старіння, діабет і його ускладнення, атеросклероз, остеоартрози, нефропатії, септичні стани, колагенози, опіки, катаракта, гепатити, онкозахворювання, кардіоваскулярні, легеневі, нейродегенеративні захворювання і хвороби Альцгеймера, Паркінсона тощо [8]. Саме тому, визначення вмісту СО-груп протеїнів є важливим для діагностики [9].

Найпоширеніший метод визначення продуктів окислення протеїнів базується

на ковалентному зв'язуванні протеїнових СО-груп (утворених внаслідок ОМП) із 2,4-динітрофенілгідразиним (ДНФГ) [10]. Кількість гідразонового адукту ДНФГ-СО (рис. 1) визначається спектрофотометрично за поглинанням при $\lambda = 370$ нм та розраховується по молярному коефіцієнту поглинання $22\ 000\ M^{-1}cm^{-1}$ [11].

Однак, під час застосування цього методу у нас виникли певні труднощі. Наприклад, зразок розчину протеїну, що був оброблений ДНФГ, мав менше значення поглинання при 370 нм, ніж контрольний зразок без обробки ДНФГ. Тому виникла необхідність ретельного дослідження спектрів поглинання розчинів на різних етапах проведення методу. Крім того,

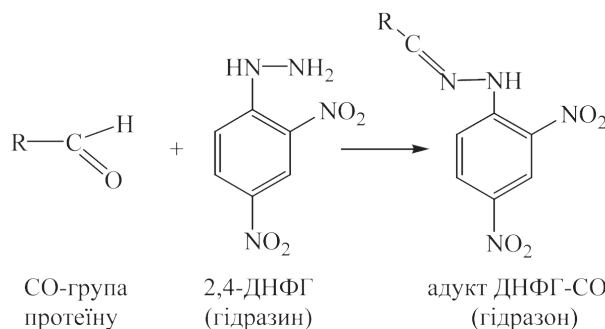


Рис. 1. Утворення 2,4-динітрофенілгідрозону за взаємодії 2,4-ДНФГ із СО-групами протеїну

виникли сумніви, що смуга у спектрі поглинання з максимумом на 370 нм характеризує тільки гідразоновий адукт ДНФГ-СО. З'ясування цього питання важливо тому, що у разі несуттєвих відмінностей оптичного спектра ДНФГ та ДНФГ-СО особливу увагу необхідно приділяти процедурі видалення надлишку незв'язаного ДНФГ.

Мета роботи полягала у дослідженні адекватності існуючого спектрофотометричного методу визначення протеїнових СО-груп та модифікації цього методу для зменшення похибки вимірювання.

Матеріали і методи

У роботі використовували реактиви: 2,4-ДНФГ, етилацетат, сечовину, формальдегід (Альфарус, Україна), соляну кислоту, трихлороцтову кислоту, етанол, БСА, пероксид водню, сульфат заліза.

До 200 мкл протеїну (100 г/л) додавали 1 мл 2,5 мМ розчину 2,4-ДНФГ, розчиненого в 2,5 М НСІ; до контролю додавали 1 мл 2,5 М НСІ. Всі проби інкубували 1 год при кімнатній температурі у темряві, потім додавали 1 мл 20%-го розчину охолодженої ТХО, витримували 10 хв у холодильнику та центрифугували. Для екстракції ліпідів та видалення залишків ДНФГ, що не прореагував, осад промивали 2 мл суміші етанол : етилацетат (1 : 1), висушували для видалення залишків розчинника та розчиняли у 2 мл попередньо нагрітого розчину 10 М сечовини.

Для одержання гідразону до 500 мкл 120 мкМ формальдегіду (ФА) додавали 100 мкл 120 мкМ 2,4-ДНФГ (у НСІ) та 300 мкл 10 М сечовини. Далі до 200 мкл БСА (100 г/л) додавали 100 мкл суміші 1,5%-го розчину H_2O_2 та 100 мМ розчину $FeSO_4$ (10 : 1), витримували протягом доби при 37 °С. Одержаний розчин БСА (БСА-СО) містив СО-групи на рівні 2 нмоль/мг, які визначили спектрофотометричним методом.

Абсорбцію зразків вимірювали в діапазоні від 250 до 600 нм за допомогою автоматичного мікроспектрофотометру μ Quant («Biotek», США).

Для розрахунку концентрації карбонільних продуктів окислення на 1 мг протеїну використовували формулу:

$$C(\text{нмоль/мг}) = \frac{(\text{Abs}_{370 \text{ нм}} \cdot X \cdot 10^6 / \varepsilon_{370 \text{ нм}} \cdot \ell) / C_{\text{протеїну}}(\text{г/л})}{1} \quad (1)$$

де C – концентрація карбонільних груп у пробі (нмоль/мг); $\text{Abs}_{370 \text{ нм}}$ – абсорбція зразка

при 370 нм; $\varepsilon_{370 \text{ нм}}$ – 22 000 $M^{-1}cm^{-1}$ – коефіцієнт молярного поглинання при 370 нм; ℓ – довжина оптичного шляху, см; X – фактор розведення; $C_{\text{протеїну}}$ – концентрація протеїну в пробі [12].

Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики з використанням t -критерію Стьюдента у програмі Excel.

Результати та обговорення

Внаслідок окислення протеїнів можуть утворюватися додаткові альдегідні та кетоніві групи амінокислотних залишків, які здатні взаємодіяти з ДНФГ. З даних літератури відомо, що для аліфатичних альдегіддинітрофенілгідразонів нейтрального характеру максимум абсорбції лежить у діапазоні від 260 до 558 нм, тоді як для гідразонів основного характеру – у діапазоні від 258 до 264 нм та від 428 до 520 нм. Для аліфатичних кетондинітрофенілгідразонів нейтрального характеру максимум поглинання знаходиться між 363–367 нм, основного характеру – між 430–434 та 524–535 нм [13].

На рис. 2. наведено спектр поглинання розчинів: ДНФГ (А); ДНФГ-СО, що утворився за реакції ДНФГ з ФА (Б); похідного ДНФГ-СО-БСА (В) – продукту взаємодії ДНФГ з БСА-СО, що є розчином БСА, який попередньо оброблений H_2O_2 та $FeSO_4$ для індукції СО-груп. Максимум спектрів поглинання реєстрували у діапазоні від 352 до 376 нм. Характерних піків на інших значеннях довжини хвилі не спостерігали.

Якщо порівняти одержані спектри гідразонів (рис. 2, Б, В) зі спектром ДНФГ (рис. 2, А), видно, що різниця їх максимумів поглинання складає відповідно 6 та 24 нм,

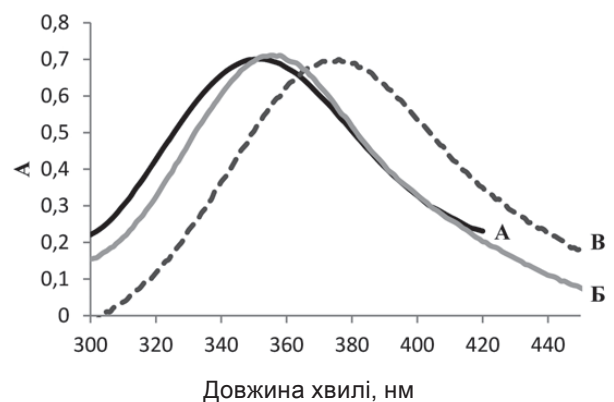


Рис. 2. Спектри поглинання: А – ДНФГ (125 мкМ) у сечовині; Б – ДНФГ + ФА; В – ДНФГ + розчин БСА-СО

а напівширина смуг поглинання дорівнює 60–66 нм, що набагато більше від різниці максимумів. Таким чином, різниця між спектрами поглинання ДНФГ та його адуку з СО-групами (ДНФГ-СО) не дозволяє окремо визначити гідрозони на фоні вільного гідрозину. Задача методу полягає саме у визначенні кількості ковалентно зв'язаного ДНФГ із протеїнами. Тому важливою умовою цього методу є відмивання протеїнів від вільного ДНФГ до того стану, поки його концентрація не буде набагато меншою від очікуваного вмісту СО-груп.

Для визначення кількості ДНФГ, який вимивається із проби, відбирали надосадову рідину після кожної стадії відмивання та вимірювали абсорбцію. Було з'ясовано, що після першого відмивання видаляється 75% ДНФГ, після другого – 12%, після третього – 8% (рис. 3).

Після кожної із зазначених процедур у пробі залишається деяка кількість незв'язаного гідрозину, а саме: після 1-го відмивання вміст ДНФГ у зразку БСА в нашому досліді складає приблизно 1,6 нмоль/мг протеїну, після 2- та 3-го – 0,3 та 0,2 нмоль/мг відповідно. Кількість незв'язаного ДНФГ, навіть після 3-ї процедури, несуттєво менша за очікуваний вміст СО-груп зразка протеїну, що досліджується.

Для того, щоб зменшити похибку вимірювання концентрації протеїнових СО-груп необхідно ретельно відбирати надосадову рідину та добре ресуспендувати осад. Для контролю кількості гідрозину, який залишається у пробі, після кожного відмивання вимірювати поглинання надосадової рідини.

Було досліджено діапазон змін абсорбції у розчині БСА (20 г/л), який використовували як контрольний зразок цього методу, тобто без додавання ДНФГ (рис. 4). Наведений спектр є «фоном» (базовою лінією) до смуги поглинання гідрозонів ДНФГ-СО. У восьми паралельних зразках при 370 нм спостерігали поглинання у діапазоні від 0,041 до 0,064 опт. од., середнє значення коливання складає $0,05 \pm 0,01$. Похибка поглинання «фону» по величині є не меншою за інтенсивність поглинання гідрозонів ДНФГ-СО, наприклад, у зразках сироватки крові інтактних щурів. Саме тому можливі «абсурдні» результати, коли оптичне поглинання контрольного зразка протеїнів (без ДНФГ, 370 нм) перевищує цей показник для обробленого ДНФГ зразка.

Внаслідок взаємодії ДНФГ із розчином БСА-СО одержано характерний спектр поглинання гідрозонів (рис. 5) із максимумом при 376 нм та напівшириною 66 нм. Цей спектр

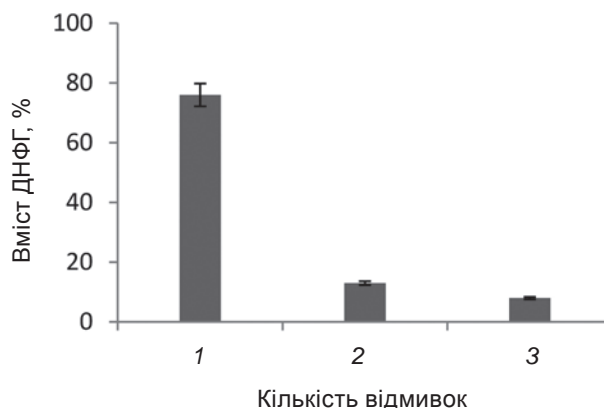


Рис. 3. Вміст ДНФГ у надосадовій рідині після відмивання протеїнового осаду сумішшю етанол : етилацетат (1 : 1)

можна розділити на дві частини: «фонове» поглинання, що апроксимується лінією (АВ), та інтенсивність смуги поглинання ДНФГ-СО – відрізок (СО). Наведені результати шести паралельних зразків вказують на наявність коливань «фонові» інтенсивності (ОД). Видно, що «фонове» поглинання при 376 нм змінюється у діапазоні від 0,01 до 0,03. Ці зміни впливають і на кінцевий результат визначення вмісту протеїнових СО-груп відомим методом, де вимірювання відбувається на одній довжині хвилі [9].

Пропонуємо модифікацію цього спектрофотометричного методу за рахунок відокремлення інтенсивності «фонового» поглинання від гідрозонів. Модифікація полягає у реєстрації поглинання на трьох довжинах хвилі замість однієї. Дві додаткові

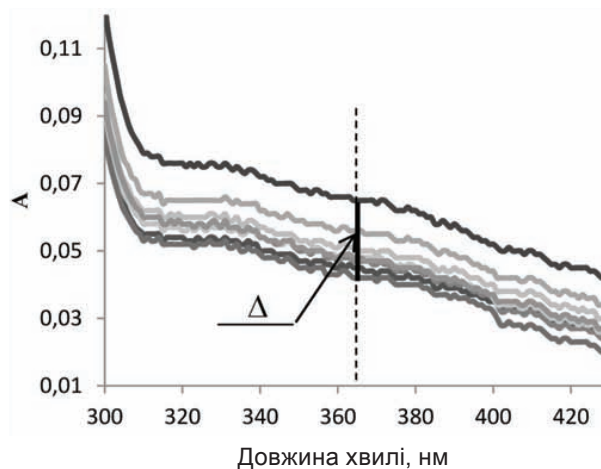


Рис. 4. Спектр поглинання контрольного розчину БСА (без додавання ДНФГ)

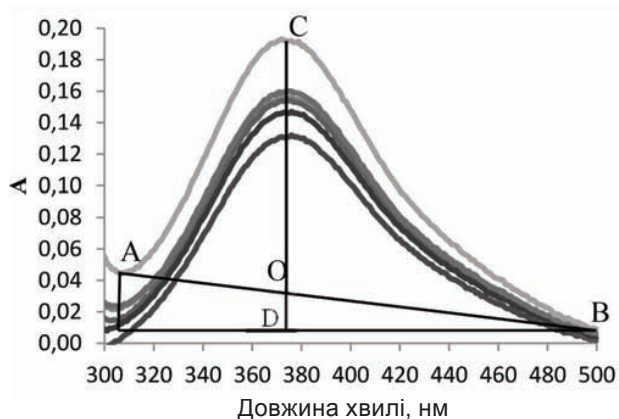


Рис. 5. Спектр поглинання розчину ДНФГ-СО-БСА

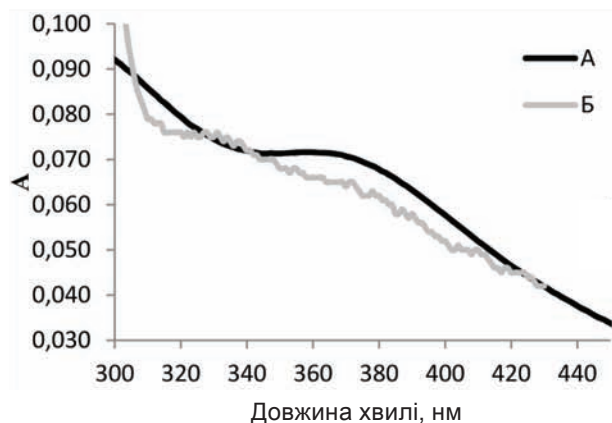


Рис. 6. Спектр поглинання: ДНФГ-модифікованої сироватки крові інтактного щура (А); контрольний зразок без реагента ДНФГ(Б)

точки вибираються для лінійної апроксимації «фонового» спектра, третя точка – максимум смуги поглинання гідразону. «Істинну» інтенсивність поглинання гідразонів (відрізок (OC) на рис. 5) пропонуємо розраховувати за наступною формулою:

$$\Delta D = (D_2 - D_3) - \frac{(D_1 - D_3)(\lambda_3 - \lambda_2)}{(\lambda_3 - \lambda_1)}, \quad (2)$$

де D_1, D_2, D_3 – абсорбція при $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$. Довжину хвилі вибирають з експериментального спектра поглинання гідразону. У даному випадку $\lambda_1 - 308$ нм, $\lambda_2 - 376$ нм, $\lambda_3 - 500$ нм.

Результати розрахунку інтенсивності поглинання за трьома точками наведено у таблиці. Як видно, вміст протеїнових СО-груп у досліджуваному зразку БСА-СО становив: за класичним методом – $2,4 \pm 0,3$ нмоль/мг, за модифікованим – $2,2 \pm 0,1$ нмоль/мг, що дозволило знизити похибку в 3 рази.

На рис. 6 представлено спектр поглинання модифікованої ДНФГ сироватки крові інтактних щурів (А) та контрольного зразка без додавання ДНФГ (Б). Привертає увагу співвідношення між «фоном» та смугою погли-

нання ДНФГ-СО – інтенсивність поглинання гідразонового адукту (0,01 опт. од.) набагато менша від величини «фону» (0,064 опт. од.). Тому вихідна методика вимірювання за однією довжиною хвилі може мати суттєву похибку. У цьому разі для лінійної апроксимації «фонові лінії» вибрали довжину хвилі з такими значеннями: 420, 370 та 330 нм. Концентрація СО-груп, яку розраховали по формулі (2), дорівнювала $1,8 \pm 0,1$ нмоль/мг.

Таким чином, на основі детального дослідження спектрів абсорбції протеїнових гідразонів модифіковано спектрофотометричний метод визначення карбонільних груп протеїнів, суть якого полягає у тому, що розрахунок інтенсивності поглинання смуги гідразону відбувається за результатами визначення поглинання на трьох довжинах хвилі (320, 370 та 420 нм), замість однієї (370 нм). Дві додаткові точки використовують для лінійної апроксимації спектра «фону» та розрахунку «істинної» інтенсивності смуги гідразону. Запропонована модифікація дозволяє покращити специфічність методу, підвищити точність та зменшити похибку визначення протеїнових СО-груп.

Приклад розрахунку інтенсивності поглинання смуги ДНФГ-СО-БСА

Довжина хвилі, нм	Абсорбція, опт. од.					
	1	2	3	4	5	6
308	0,005	0,024	0,017	0,014	0,025	0,045
376	0,132	0,156	0,154	0,147	0,160	0,192
500	0,002	0,006	0,003	0,004	0,006	0,009
Розрахунок ΔD	0,128	0,139	0,143	0,137	0,143	0,161

**МОДИФИКАЦИЯ
СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО
МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ
КАРБОНИЛЬНЫХ ГРУПП
ПРОТЕИНОВ**

О. В. Зайцева, С. Г. Шандренко

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: Olga__89@mail.ru

На основе детального исследования спектров оптического поглощения гидразонов протеинов модифицировано спектрофотометрический метод определения содержания карбонильных групп протеинов. Суть модификации состоит в том, что определение содержания гидразонового аддукта проводится по оптическому поглощению не на одной длине волны (370 нм), а при трех (320, 370 и 420 нм). Две дополнительные длины волн необходимы для линейной аппроксимации оптического спектра «фона». Предложенная формула позволяет рассчитать интенсивность гидразонового пика поглощения и значительно уменьшить погрешность определения содержания протеиновых СО-групп.

Ключевые слова: протеины, карбонильные группы, 2,4-динитрофенилгидразон.

**MODIFICATION OF
SPECTROPHOTOMETRIC METHOD
OF DETERMINATION OF PROTEIN
CARBONYL GROUPS**

O. V. Zaytseva, S. G. Shandrenko

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: Olga__89@mail.ru

S u m m a r y

Basing on detailed study of optical absorption spectra of protein-hydrazones a modification of the spectrophotometric method determination of the protein carbonyl groups has been proposed. For the hydrazone adduct determination we proposed to measure the optical absorption at three

wavelengths (320, 370 and 420 nm) instead of only one (at 370 nm). Two additional wavelengths are used for the linear approximation of the background optical spectrum. This modification improves the specificity and reduces the error when determining the content of CO groups in proteins.

Key words: proteins, carbonyl groups, 2,4-dinitrophenylhydrazone.

1. *Зенков Н. К., Меншикова Е. Б.* // Усп. совр. биол. — 1993. — **113**, № 3. — С. 286–296.
2. *Шатовал Г. С., Громова В. Ф.* // Укр. біохім. журн. — 2003. — **75**, № 2. — С. 5–13.
3. *Yu V. P.* // *Physiol. Rev.* — 1994. — **74**, N 1. — P. 139–162.
4. *Dean R. T., Hunt J. V., Grant A. J. et al.* // *Free Rad. Biol. Med.* — 1991. — **11**, N 12. — P. 161–165.
5. *Дубинина Е. Е.* // *Вопр. мед. хим.* — 2001. — **47**, № 6. — С. 561–581.
6. *Shacter E. Y.* // *Drug Metab. Rev.* — 2000. — **32**, N 3,4. — P. 307–326.
7. *Луцак В. І., Багнокова Т. В., Луцак О. В.* // Укр. біохім. журн. — 2004. — **76**, № 3. — С. 136–141.
8. *Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D. et al.* // *Italy. Clinica Chimica.* — 2003. — **329**. — P. 23–38.
9. *Губский Ю. И., Беленичев И. Ф., Левицкий Е. Л.* // *Пробл. токсикол.* — 2005. — № 3. — С. 20–27.
10. *Луцак В. І.* // Укр. біохім. журн. — 2007. — **72**, № 8. — С. 995–1017.
11. *Levine R., Garland D., Oliver C. et al.* // *Methods Enzymol.* — 1990. — N 186. — P. 464–478.
12. *Bradford M. M.* // *Anal. Biochem.* — 1976. — **72**. — P. 248–254.
13. *Jones L., Holmes J., Seligman R.* // *Analyt. Chem.* — 1956. — **28**. — P. 191–198.

Получено 26.04.2012