

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 543.645.6

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА – СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ В ДИАПАЗОНЕ 200–220 НМ И ПО БРЕДФОРД

**И. В. Суховская, Е. В. Борвинская, Л. П. Смирнов, Н. Н. Немова**

*Институт биологии Карельского научного центра РАН*

Приведены данные сравнительного анализа двух методов определения концентрации белка в растворе – прямого спектрофотометрического определения в диапазоне длин волн 200–220 нм и по методу Бредфорд. Показано, что экстинкция при 205 нм является наиболее приемлемой для определения общего содержания белков и пептидов вне зависимости от их аминокислотного состава. Предлагается для оценки концентрации низкомолекулярных соединений пептидной природы использовать их оптическую спектрофотометрию в диапазоне 210–220 нм.

**Ключевые слова:** белки, пептиды, спектрофотометрия, экстинкция, метод Бредфорд, бычий сывороточный альбумин, глутатион.

**I. V. Sukhovskaya, E. V. Borvinskaya, L. P. Smirnov, N. N. Nemova.  
COMPARATIVE ANALYSIS OF THE METHODS FOR DETERMINATION OF  
PROTEIN CONCENTRATION – SPECTROPHOTOMETRY IN THE 200–  
220 NM RANGE AND THE BRADFORD PROTEIN ASSAY**

Results of the comparative analysis of two methods for determination of protein concentration in a solution – direct spectrophotometry at a wavelength of 200–220 nm, and the Bradford protein assay – are reported. It is shown that the extinction coefficient at 205 nm is the most suitable for total protein and peptide determination irrespective of their amino acid composition. To estimate the concentration of low-molecular peptide compounds we suggest using their optical spectrophotometry in the 210–220 nm region.

**Key words:** proteins, peptides, spectrophotometry, extinction coefficient, Bradford protein assay, bovine serum albumin, glutathione.

---

Ключевым моментом большинства исследований в области энзимологии является определение концентрации белка в образце ткани, так как этот показатель необходим для оценки относительной активности различных ферментов, а также косвенно свидетельствует о состоянии белкового метаболизма в целом.

Существует метод прямого спектрофотометрического определения белка, в основе которого лежит проявление в диапазоне длин волн 230–300 нм оптической активности аминокислотами, имеющими в составе молекулы циклические структуры (фенилаланин, триптофан, тирозин, гистидин), а также при образовании дисульфидных связей

между молекулами цистеина. Однако этот метод (определение концентрации белка по экстинкции при 280 нм) обладает значительными ограничениями, обусловленными тем, что его нельзя с равной эффективностью применять для определения разных белков, так как содержание ароматических аминокислот в них широко варьирует. Кроме того, анализ белков осложняет присутствие нуклеиновых кислот, мочевой кислоты и некоторых других соединений, оптически активных в этом диапазоне [Дэвени, Гергей, 1976; Козлов, Слепышева, 2005]. Поэтому прямое спектрофотометрическое определение в вышеуказанных пределах уступает по популярности калориметрическим методам, основанным на измерении интенсивности цветных реакций, развивающихся при взаимодействии белков с тем или иным специфическим реагентом. В настоящее время при определении количества белка в растворе используются, в основном, два калориметрических метода – по Лоури, в котором осуществлена реакция белка с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  в присутствии фосфорномолибденовой кислоты (реактив Фолина) [Lowry et al., 1951], и окраски белка красителем Coomassie G-250, предложенный Мерион Бредфорд [Bradford, 1976]. Диапазон пропорциональной зависимости экстинкции от концентрации белка составляет 10–100 мкг/мл, а по уточненным данным для метода Бредфорд составляет 1–50 мкг/мл [Noble, Bailey, 2009]. Тем не менее метод Бредфорд является доминирующим, поскольку менее «капризен». Но у него есть минусы, один из которых заключается в том, что краситель Кумасси G-250 связывается только с теми белками, которые имеют в своем составе аргинин и в гораздо меньшей степени – лизин, триптофан, тирозин, фенилаланин и гистидин [Compton, Jones, 1985]. Если полипептидная цепь не имеет этих аминокислот, то цветная реакция не развивается. И второй минус – это содержание основного красителя в исходном препарате, которое колеблется в пределах ~60–90 % и может различаться не только у разных производителей, но и зависеть от номера партии, что может привести к ошибкам при определении концентрации белка, если готовить стандартные растворы без учета этого обстоятельства.

Известно, что белки оптически активны не только при 230–300 нм, но и в более коротковолновом диапазоне, что обусловлено химическим строением этих биополимеров [Козлов, Слепышева, 2005], в частности, процесс протонирования пептидной связи оптически акти-

вен при 205 нм [Noble, Bailey, 2009]. Исходя из этого, можно предположить, что диапазон 200–220 нм может быть использован для измерений концентрации белка.

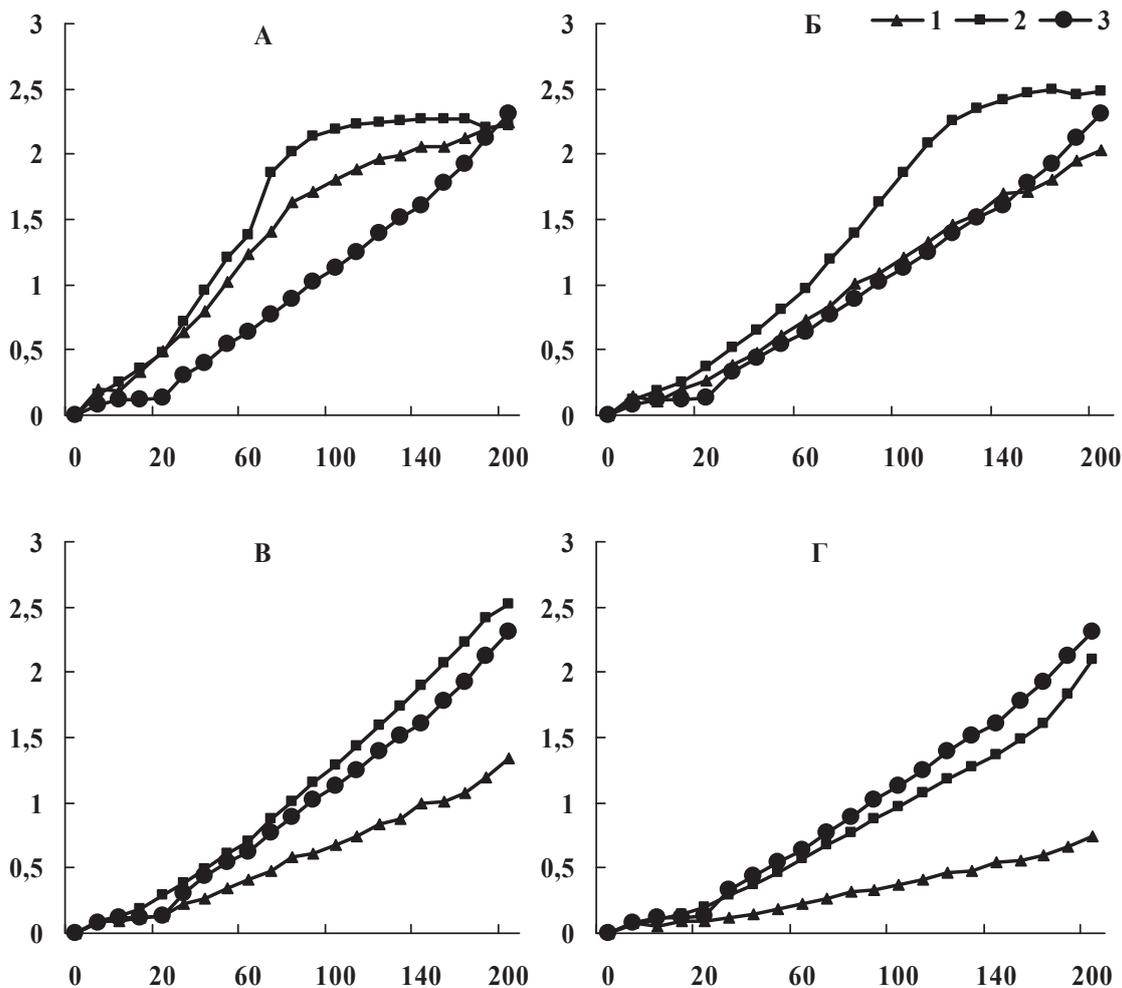
Цель данной работы – изучение возможности использования прямого спектрофотометрического определения концентрации белка по поглощению в области 200–220 нм, в которое входили поиск оптимальных длин волн и концентраций, которые могли бы быть использованы для построения калибровочного графика, выбор параметров спектрофотометрии для работы с неизвестными концентрациями, а также сравнение с калориметрическим методом Бредфорд для обнаружения сходства и различия между этими методами и выявления преимуществ одного метода над другим.

## Материал и методы

Для исследования были использованы восстановленный глутатион (GSH) и бычий сывороточный альбумин (БСА). Растворы полипептидов с концентрацией исследуемого вещества в диапазоне 10–200 мкг/мл готовили на 0,125 М фосфатной буферной системе (рН 6,5). Определение концентрации белков проводили на спектрофотометре СФ-2000 («Спектр», СПб.). Оптическую плотность раствора измеряли в диапазоне 200–220 нм в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см. Полученные данные использовали для построения калибровочных графиков. Результаты прямого спектрофотометрического определения сравнивали с таковыми, полученными методом Бредфорд.

## Результаты и обсуждение

Проведенные нами измерения оптической плотности растворов белка в пределах 10–200 мкг/мл показали активность исследованных полипептидов в диапазоне 200–230 нм, и по их результатам были построены графики. Прирост оптической плотности при 205 нм (рис., А) был наиболее сильным. Диапазон концентраций, при которых изменение экстинкции было пропорциональным, составил 20–70 мкг/мл, при этом показания для GSH и БСА почти совпали и были выше значений для аналогичных концентраций, полученных методом Бредфорд. При увеличении длины волн значения оптической плотности приближаются к таковым, получаемым калориметрическим методом. Так, при 210 нм (рис., Б) обнаружилось совпадение графиков, построенных для GSH и метода Бредфорд, при 215 и 220 нм (рис., В и Г) – для БСА и Бредфорд. Оптическая плотность растворов GSH при 215 и 220 нм была



Измерение концентрации белка методом прямой спектрофотометрии при разных длинах волн и методом Бредфорд (графики построены по усредненным данным из 5 измерений):

А – при 205 нм, Б – при 210 нм, В – при 215 нм, Г – при 220 нм; 1 – глутатион, 2 – БСА, 3 – БСА (по Бредфорд); по оси абсцисс – концентрация белка (мкг/мл); по оси ординат – оптическая плотность раствора

ниже, чем у БСА и Бредфорд. На рисунке видно, что понижение экстинкции связано с увеличением длины волн от 210 до 220 нм. Интересно отметить, что размах пропорциональной зависимости экстинкции от концентрации пептида был выше, чем при 205 нм, и составлял 20–200 мкг/мл, в то время как для БСА не превысил 140 мкг/мл. При 215 и 220 нм показатели оптической плотности растворов БСА совпали с таковыми, полученными методом Бредфорд.

Проведенное нами определение оптической плотности разных концентраций БСА методом Бредфорд на спектрофотометре СФ-2000 показало, что пропорциональная зависимость находилась в диапазоне от 20 до 140 мкг/мл, в отличие от данных других авторов [Bradford, 1976; Noble, Bailey, 2009].

При обсуждении полученных результатов стоит еще раз вернуться к вопросу о необходимости учета некоторых отрицательных моментов при использовании метода Бредфорд.

Кроме тех, о которых уже было сказано, на определение белка этим методом могут оказывать влияние технические и конструктивные особенности спектрофотометров, поскольку, например, при изготовлении серии дифракционных решеток очень трудно добиться их абсолютной идентичности. Но самой серьезной проблемой применения метода для оценки суммарного количества белков в экстрактах из клеток остается, на наш взгляд, взаимодействие Кумасси с боковыми цепями строго определенных аминокислот, входящих в состав белковой молекулы. Белки, не несущие в своем составе аргинина и в меньшей степени – циклических аминокислот, остаются вне поля зрения исследователя. Стоит отметить, что со свободным аргинином краситель не взаимодействует. Отсюда следует, что данные определения общей концентрации белка в экстрактах из животных или растительных тканей, полученные методом Бредфорд, будут заведомо заниженными.

В настоящее время в качестве стандарта при количественной оценке суммарного белкового состава чаще всего используется БСА, что, по нашему мнению, не всегда оправданно. В различных руководствах рекомендуется для получения достоверных результатов использовать при построении калибровочных графиков белки, с которыми предстоит работать, либо близкие по составу [Kruger, 1994; Simonian, Smyth, 2006; Noble, Bailey, 2009].

Как нам представляется, прямое спектрофотометрическое определение концентрации растворенных белков в диапазоне длин волн 200–220 нм лишено этого недостатка, поскольку оценивает оптическую активность самой пептидной связи. При 205 нм наблюдалось совпадение калибровочных графиков, построенных по GSH и БСА. Размах линейной зависимости оптической плотности от концентрации белка был не очень широким (20–70 мкг/мл), тем не менее в этих пределах можно надежно определять все белковые компоненты клеточного экстракта и оценка других показателей в пересчете на белок будет соответствовать реальности. Проведенные нами эксперименты показали, что зависимость экстинкции от концентрации для GSH при 210–220 нм имела наибольший прямолинейный отрезок графика. Это положительный момент, который может быть использован для определения концентрации низкомолекулярных соединений пептидной природы, причем это может быть любая длина волны в указанном диапазоне, которая подбирается в зависимости от спектральных характеристик того или иного спектрофотометра.

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

##### **Суховская Ирина Викторовна**

научный сотрудник, к. б. н.  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910  
эл. почта: suhovska@krc.karelia.ru  
тел.: (8142) 571819

##### **Борвинская Екатерина Витальевна**

стажер-исследователь  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910  
эл. почта: katsu@inbox.ru  
тел.: (8142) 571819

##### **Смирнов Лев Павлович**

ведущий научный сотрудник, д. б. н.  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910  
эл. почта: leo@bio.krc.karelia.ru  
тел.: (81422) 571819

##### **Немова Нина Николаевна**

директор ИБ КарНЦ РАН, зав. лаб. экологической биохимии, д. б. н., проф., чл.-корр. РАН  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910  
эл. почта: nemova@krc.karelia.ru  
тел.: (8142) 783615

Данная работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ «Ведущие научные школы Российской Федерации» 306.2008.4; программы ОБН РАН «Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга» на 2009–2011 гг.; программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие» на 2009–2011 гг.

#### Литература

*Дэвени Т., Гергей Я.* Аминокислоты, пептиды и белки. М.: Мир, 1976. 368 с.

*Козлов А. В., Слепышева В. В.* Определение белка в сыворотке крови // Terra Medica, приложение «Лабораторная диагностика». 2005. № 3 (8). – Режим доступа: [http://www.terramedica.spb.ru/ld3\\_2005/kozlov.htm](http://www.terramedica.spb.ru/ld3_2005/kozlov.htm).

*Bradford M. M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.

*Compton S. J., Jones C. G.* Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay // Anal. Biochem. 1985. Vol. 151. P. 369–374.

*Kruger N. J.* The Bradford method for protein quantitation // Methods of Enzymology. Basic protein and peptide protocols. Ed. J. M. Walker, Humana Press Inc. Totowa, N. J. 1994. Vol. 32. P. 9–15.

*Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. Z., Randall R. J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265–275.

*Noble J. E., Bailey M. J. A.* Quantitation of proteins // Methods in enzymology. 2009. Vol. 463. P. 73–95.

*Simonian M. H., Smyth J. A.* Quantitation of proteins // Protocols in Molecular Biology, supplement 76. Ed. J. Wiley & Sons Inc. 2006. P. 10.1A1–10.1A9.

##### **Suhovskaya, Irina**

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Science  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: suhovska@krc.karelia.ru  
tel.: (8142) 571819

##### **Borvinskaya, Ekaterina**

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Science  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: katsu@inbox.ru  
tel.: (8142) 571819

##### **Smirnov, Lev**

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Science  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: leo@bio.krc.karelia.ru  
tel.: (8142) 571819

##### **Nemova, Nina**

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Science  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: nemova@krc.karelia.ru  
tel.: (8142) 783615