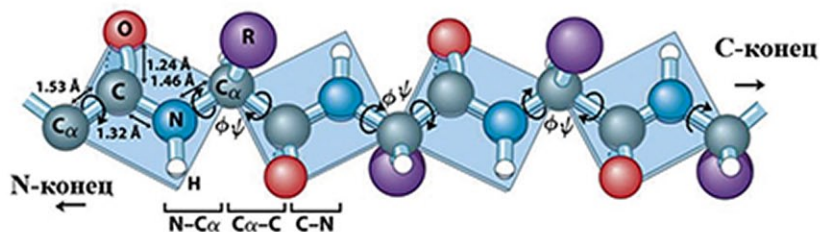


Е.И. Акимова

В.В. Асеев

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К КОЛИЧЕСТВЕННОМУ ОПРЕДЕЛЕНИЮ БЕЛКА



МОСКВА 2016

УДК 577.088 : 577.112

ББК 28.072

Е.И. Акимова, В.В. Асеев. Физико-химические подходы к количественному определению белка: учеб. пособие. М.: Т-во научн. изданий КМК. 2016. 109 с.

Учебное пособие предназначено для студентов, бакалавров, магистрантов, аспирантов, а также для слушателей курсов повышения квалификации, преподавателей вузов и научных сотрудников с целью обучения современным физико-химическим методам практического определения белка. Пособие является дополнительным материалом к лекционному и практическому курсам по биохимии и физико-химическим методам в биологии, читаемых на кафедрах биохимии и молекулярной биологии. В нем представлены теоретические основы по разделу “Белки” и практические методики количественного определения белка. Рассматриваемые методики соответствуют современному уровню физико-химических исследований белка.

Рецензенты:

Заведующий кафедрой биофизики физического факультета
МГУ имени М. В. Ломоносова, профессор

В.А. Твердислов

Профессор биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова

А.М. Рубцов

*Печатается по решению Ученого совета
биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова*

ISBN 978-5-9908165-0-3

© Кафедры биохимии, молекулярной биологии
Биологический факультет МГУ, 2016.

© Акимова Е.И., Асеев В.В., 2016.

© Т-во научн. изданий КМК, издание, 2016.

Содержание

ОГЛАВЛЕНИЕ	3
ПРЕДИСЛОВИЕ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
1. ПРЯМЫЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ	
ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА	24
1.1. Спектрофотометрические методы в УФ-области спектра	24
1.2. Спектрофотометрический метод в далекой УФ-области спектра	32
1.3. Общие указания к расчетам по определению концентрации белка спектрофотометрическими методами	34
1.4. Спектрофотометрический метод для хромофорных (окрашенных) белков на примере гемоглобина	35
2. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА ПО АМИННОМУ АЗОТУ	42
2.1. Метод определения белка по Кьельдалю	42
2.2. Метод определения белка по Барнштейну	55
2.3. Определение белка методом Дюма	56
3. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА ПО ЦВЕТНЫМ РЕАКЦИЯМ	58
3.1. Определение белка по биуретовой реакции	58
3.2. Микробиуретовый метод определения белка	62
3.3. Метод Лоури	64
3.4. Определение белка с бицинхониновой кислотой	67
4. МЕТОДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОРГАНИЧЕСКИХ КРАСИТЕЛЕЙ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА	74
4.1. Определение белка с амидовым черным 10В	75
4.2. Определение белка с амидовым черным после осаждения трихлоруксусной кислотой	78
4.3. Метод определения белка по Брэдфорд с помощью кумасси G-250	78
4.4. Метод определения белка с помощью красителей группы понсо S	82
4.5. Метод определения белка с помощью красителя сульфофиолетового	83
4.6. Метод определения белка с помощью красителя бромфенолового синего	84
4.7. Метод определения белка с пирогаллоловым красным	86

5. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА	89
Ключевые положения	89
5.1. Флуорофоры, модифицирующие белок	91
5.2. Флуорофоры, сорбирующиеся на белке	95
6. СРАВНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА	98
7. ВЫБОР МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	105
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	108

1. ПРЯМЫЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА

Из физических методов количественного определения белков самыми широко распространенными и часто используемыми являются спектрофотометрические методы, основанные на измерении поглощения УФ-света боковыми радикалами ароматических аминокислот.

1.1. Спектрофотометрические методы в УФ-области спектра

Ключевые положения

Свойство атомов и молекул поглощать свет с определенной длиной волны, характерной для данного вещества, широко используется для качественных и количественных исследований его структуры.

Изучение веществ по их способности поглощать свет называется *абсорбционной спектрофотометрией*.

На практике измеряют две физические величины: пропускание T или оптическую плотность A .

Пропускание (T) — это отношение интенсивности света (излучения), прошедшего через раствор (I), к интенсивности света (излучения), падающего на раствор (I_0):

$$T = I/I_0$$

Значения T могут меняться от 0 (поглощается весь свет) до 1 (весь свет проходит). Если T измеряется в процентах, то используют формулу:

$$T = 100 I/I_0$$

Для удобства расчетов часто это выражение логарифмируют. Логарифм T , взятый с обратным знаком, или величину $\lg(I_0/I)$ называют *поглощением или оптической плотностью (экстинкцией)* и обозначают буквой A (D):

$$A = -\lg(I_0/I) = \lg 1/T = -\lg T$$

Величины T и A измеряются непосредственно в эксперименте. В этих величинах выражены шкалы спектрофотометрических приборов.

Как следует из формулы, уменьшение пропускания T от 100% до 0%, соответствует росту оптической плотности A от 0 до ∞ . T и A — безразмерные величины.

В основе количественного абсорбционно-спектроскопического анализа лежит *объединенный закон светопоглощения Бугера-Ламберта-Бера*, связывающий интенсивность потока монохроматического света (излучения), проходящего через слой раствора, с толщиной этого слоя (l) и с концентрацией вещества (C):

$$A = \lg(I_0/I) = -\lg T = k \times l \times C,$$

где l — длина оптического пути,

C — концентрация вещества

Эта формула показывает, что поглощение вещества (оптическая плотность) прямо пропорционально концентрации вещества и толщине поглощающего слоя.

Коэффициент k называют *коэффициентом поглощения*. Абсолютное значение коэффициента k зависит от способа выражения концентрации раствора и толщины поглощающего слоя.

Если концентрация выражена в моль/л, а толщина слоя в см, то коэффициент поглощения называется *молярным коэффициентом светопоглощения (экстинкции) (ϵ)*.

Его легко определить, если взять единичные значения концентрации и толщины слоя. При $C = 1$ моль/л и $l = 1$ см $\epsilon = A$, т. е. молярный коэффициент светопоглощения численно равен оптической плотности раствора с концентрацией 1 моль/л, помещенного в кювету с толщиной слоя 1 см. Его размерность л/(моль·см) или моль⁻¹·л·см⁻¹, часто размерность опускается. Молярный коэффициент поглощения рассчитывается по формуле:

$$\epsilon = A/C \times l$$

Молярный коэффициент поглощения ϵ является постоянной величиной, характерной для данного вещества, то есть является характеристикой растворенного вещества. Он зависит от длины волны абсорбируемого света, температуры раствора, природы растворенного вещества и растворителя и, в определенных пределах, не зависит от концентрации растворенного вещества и толщины поглощающего слоя.

Если молекулярная масса поглощающего вещества неизвестна, то концентрацию выражают в г/100 мл ($C_{\%}$) и тогда постоянную k называют *удельным коэффициентом светопоглощения (экстинкции)* и обозначают $E_{1\text{см}}^{1\%}$ (оптическая плотность 1% раствора при толщине слоя 1 см).

$E_{1\text{см}}^{1\%}$ рассчитывают по формуле:

$$E_{1\text{см}}^{1\%} = \frac{A}{C_{\%} \cdot l}$$

Он связан с молярным коэффициентом экстинкции $\epsilon_{\text{л}}$ или $E_{1\text{см}}^{\text{моль}}$:

$$E_{1\text{см}}^{1\%} \times M/10 = \epsilon_{\lambda}$$

M — молекулярная масса белка

Принцип метода

Оптическая плотность раствора белка в ультрафиолетовой части спектра (а для ряда белков — в видимой) линейно связана с концентрацией белка. В видимом диапазоне спектра способностью поглощать свет обладают окрашенные белки: гемоглобин, цитохромы и др. В ультрафиолетовой области спектра поглощающей способностью обладают в той или иной степени практически все белки.

1. Поглощение света осуществляется не всей молекулой, а определенными ее участками — **хромофорами**.

Хромофоры — это отдельные химические группы в молекуле вещества, поглощающие кванты света в УФ- и видимой областях спектра. Такой группой является, например, карбонильная группа $C=O$, существующая у всех аминокислот. Основными хромофорами в белках являются пептидные группы, ароматические аминокислоты (триптофан, тирозин и в меньшей степени фенилаланин) и цистеин. Все они поглощают в УФ-области спектра.

Большинство белков имеют максимум поглощения при 280 нм, т. е. в УФ-области спектра, главным образом за счет присутствия в их молекулах остатков триптофана и тирозина (рис. 7).

Поглощение триптофана обусловлено его индольным кольцом с системой сопряженных связей.

Поскольку содержание триптофана и тирозина у различных белков изменяется только в узких пределах, пик поглощения при 280 нм

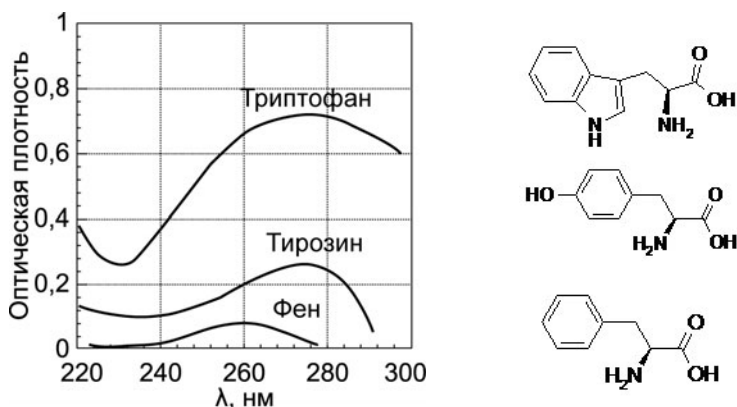


Рис. 7. Спектры поглощения в УФ-области триптофана, тирозина, фенилаланина.

может быть использован как быстрый и довольно чувствительный способ измерения белковой концентрации.

При этом применяют метод, основанный на измерении оптической плотности при 280 и 260 нм.

Нуклеиновые кислоты, которые могут содержаться в исследуемом препарате, поглощают при 280 нм, но более сильно они поглощают при 260 нм, тогда как для белков характерно обратное. В нуклеиновых кислотах основными хромофорами являются пуриновые и пиримидиновые азотистые основания нуклеотидов, поглощающие в диапазоне длин волн 255–270 нм.

Варбург и Христиан экспериментально определили коэффициенты экстинкции различных белков и нуклеиновых кислот при 280 и 260 нм и нашли отношение этих коэффициентов (фактор F, табл. 2); ими предложен дифференциальный метод определения белка в интервале концентраций 50–1000 мкг/мл.

Для того, чтобы найти белковую концентрацию неизвестного образца измеряют оптическую плотность при 280 и 260 нм, рассчитывают их отношение, затем определяют соответствующий фактор по табл. 2 и подставляют в следующее уравнение:

$$\text{Концентрация белка (мг/мл)} = F \times A_{280}/d,$$

где A_{280} — оптическая плотность при 280 нм, d — ширина кюветы

Если количество нуклеиновых кислот не превышает 20%, можно получить точные данные о содержании белка. Присутствие в исследуемых препаратах более чем 20% нуклеиновых кислот дает значи-

Таблица 2.

Определение количества белка по сравнению оптических плотностей при 280 и 260 нм

A_{280}/A_{260}	Нуклеиновая кислота, %	F
1,750	0	1,116
1,520	0,5	1,954
1,360	1	0,994
1,160	2	0,899
1,030	3	0,814
0,939	4	0,743
0,874	5	0,682
0,822	6	0,632
0,784	7	0,585
0,753	8	0,545
0,730	9	0,508
0,705	10	0,478
0,645	14	0,377
0,595	20	0,278

тельную ошибку в измерении количества белка. Поэтому вводится поправка на содержание в препаратах нуклеиновых кислот и нуклеотидов. Такая поправка важна, когда работают с сырыми экстрактами, но становится менее существенной по мере очистки белков и удаления мешающих веществ, особенно на заключительных этапах очистки белков. В этом случае достаточно определить оптическую плотность при 280 нм.

2. Поскольку определению белка данным методом мешает наличие в растворе нуклеотидов, нуклеиновых кислот и некоторых других веществ, поглощающих вблизи данной области, поэтому измерение количества белка в настоящее время производится по следующей формуле, выведенной Калькаротом:

$$\text{Концентрация белка (мг/мл)} = 1,45 A_{280} - 0,74 A_{260},$$

где A — оптическая плотность при 280 и 260 нм, соответственно

3. Так как содержание тирозина и триптофана в белках очень сильно изменяется, коэффициент поглощения, выражаемый обычно как $E_{280}^{0,1\%}$ или $E_{280}^{1\text{мг/мл}}$, также варьирует в значительной степени. У большинства белков величина $E_{280}^{1\text{мг/мл}}$ лежит около 1, однако в целом, она колеблется в интервале 0,4–1,5. Поэтому поглощение, которое обусловлено одним и тем же количеством разных белков, неодинаково.

4. Поглощение при 280 нм дает лишь приблизительное представление об истинном содержании белка; исключения составляют чистые белки. Если точно известен коэффициент экстинкции чистого белка, то величина поглощения при 280 нм позволяет точно определить его содержание.

По существу спектрофотометрический метод является самым точным для определения чистых белков, поскольку в этом случае не требуется производить с ними никаких манипуляций, за исключением соответствующих разбавлений. Растворитель не должен поглощать при 280 нм, а если он поглощает — необходим точный контрольный опыт. Во время измерений белки не подвергаются никаким вредным воздействиям и не разрушаются, поэтому измеренную пробу можно вновь смешать с основным белковым раствором и использовать раствор белка в дальнейшей работе.

Особенно удобно использовать описанный метод для контроля за изменениями концентрации белков в элюате при хроматографическом разделении белковых смесей на колонках и при построении профилей элюции. Для точного определения нужна концентрация белка приблизительно около 0,5 мг/мл.

Этот метод дает хорошие результаты с гетерогенной смесью белков. При работе со смесями белков условно принимают, что 1 единица оптической плотности раствора при 280 нм соответствует суммар-

ной концентрации белков, равной приблизительно, 1 мг/мл. Измерение проводят в кварцевых кюветах с квадратным сечением 1×1 см.

Спектрофотометрический метод наиболее прост и быстр, поскольку все определение сводится к измерению оптической плотности раствора белка при 280 нм. Если поглощение раствора слишком велико, производят его разбавление растворителем в 10 или более раз и измеряют экстинкцию разбавленного раствора белка. При количественных расчетах учитывают произведенное разбавление. Контролем при измерениях всегда служит тот раствор, в котором находится исследуемый белок.

Чувствительность прямых измерений поглощения можно увеличить, перейдя к длине волны 230 нм. Все остатки обладают в этой области молярной экстинкцией, примерно равной 300 (среднее от вклада, даваемого перекрывающимися полосами для боковых цепей и $\pi \rightarrow \pi^*$ — полосы пептидной группы), так, что оптическая плотность раствора белка с концентрацией 1 мг/мл составит $A_{230}=2,5$.

Ход определения:

Оборудование: спектрофотометр, стеклянные пробирки.

Реактивы: бычий сывороточный альбумин (БСА)

Приготовление растворов:

В качестве стандарта обычно используют бычий сывороточный альбумин (БСА). 1%-ный раствор БСА при 280 нм в 1-сантиметровой кювете имеет оптическую плотность $A=6,6$.

Для приготовления этого раствора 20 мг белка растворяют в 2 мл дистиллированной воды и оставляют на 10 мин для полного растворения альбумина. Исходный раствор белка разводят в 5, 10, 15, 20, 25 раз. Растворы перемешивают и измеряют оптическую плотность при 280 и 260 нм против контроля (дистиллированная вода). Концентрацию белка рассчитывают по следующей формуле:

$$\text{Концентрация белка (мг/мл)} = 1,45A_{280} - 0,74A_{260},$$

где A — оптическая плотность при 280 и 260 нм, соответственно

Преимущества данного метода:

1. Метод прост и достаточно точен при работе с очищенными белками.
2. Метод применим при выполнении серийных фотометрических анализов.
3. Метод позволяет достаточно быстро оценить количество белка, например, при элюции белка с хроматографической колонки.
4. При использовании соответствующей аппаратуры (например, спектрофотометра с проточной кюветой) этот метод позволяет проводить непрерывное определение концентрации белка в растворе.