

Ю. А. КЕЧЕК. Л. В. СЕМЕРДЖЯН

НОВЫЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
ОБЩЕГО БЕЛКА И ЕГО ФРАКЦИЙ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ  
ПРИ ПОМОЩИ СТАБИЛЬНОГО СТАНДАРТА МУТНОСТИ

В настоящее время для определения белковых фракций применяются многочисленные методы, из которых основным считается метод электрофореза в различных модификациях [1—9], который был предложен Тизелиусом [1], а затем модифицирован Фильпотом [2], Свенссоном [3] и другими.

Электрофорез дает возможность отделить белки друг от друга, выделить чистые белки, обнаружить новые фракции, установить электрофоретическую подвижность, определить изоэлектрическую точку отдельных белков и, наконец, определить количество различных фракций белков.

Однако некоторые авторы, например, Альберти и Николас [10], Свенссон [3, 11] и др. [12], отмечают, что электрофорезом, особенно при его различных модификациях (на агаровом желе, в различных средах и на бумаге) количество отдельных фракций определяется недостаточно точно. Эти неточности возникают по следующим причинам: Альберти и Николас, а также Свенссон находят, что белковые границы подвергаются диффузии при прохождении тока и, следовательно, не резко выделяются. Далее при движении белковых молекул происходит взаимодействие между белками и ионами буфера.

По данным Кункеля [13] и М. Н. Егоровой [14], по мере продвижения белковых частиц в различных средах, особенно на бумаге, имеет место адсорбция этих частиц по пути от места нанесения до места фиксации.

Кроме того, при электрофорезе на бумаге (который имеет наибольшее распространение), по мнению Кремера и Тизелиуса [15], Мерида и согр. [16], Кон и согр. [17], происходит неравномерное захватывание красителей различными белковыми фракциями. На основании этого многие авторы рекомендуют внесение соответствующих коэффициентов при расчетах.

Все эти моменты вместе взятые, даже при полной стандартизации остальных процедур, могут быть причиной значительных неточностей при количественном определении белковых фракций. Однако это обстоятельство никак не умаляет значения электрофоретического метода для разрешения всех остальных вопросов, из которых главным следует считать установление идентичности различных белков в неизвестных белковых смесях.

Указанные неточности при количественном определении белковых фракций, а также большая трудоемкость электрофоретического метода объясняют попытки многих авторов создать и другие методы фракционирования.

Диер и Фарбер [18, 19] предложили метод фракционирования белков сыворотки крови при помощи трихлоруксусной кислоты, с последующим определением количества отдельных фракций при помощи биуретовой реакции. Вольфсон и сотр. [20], М. А. Рождественская [21] предлагают осадить белковые фракции сульфатом натрия, З. Л. Гуткина, Н. Н. Гаврилова, Г. Д. Каверзин [22]—ацетоном, Кон и сотр. [23]—этиловым спиртом, а затем определить их количества биуретовой реакцией.

Аулл и Маккорд [24] предложили новый турбидиметрический метод количественного определения белковых фракций путем фракционирования белков сыворотки крови однозамещенным фосфорнокислым калием, определяя количество каждой фракции по степени мутности при помощи спектрофотометра. Предложенный ими метод был разработан на основании исследований Бутлера и сотр. [25], Раппопорта и сотр. [26].

Занимаясь в течение ряда лет вопросом количественного определения белков в различных средах [27, 29], мы решили разработать метод количественного определения общего белка и фракций (альбуминов и подфракций глобулинов), придерживаясь принципа фракционирования, предложенного Ауллом и Маккордом [24], сравнивая полученные мутные растворы со стабильным стандартом мутности.

Полученные результаты контролировались следующим образом: количество общего белка проверялось при помощи рефрактометра и путем сравнения с мутными растворами, приготовленными из препаратов чистых белков.

Для проверки правильности фракционирования мы решили взять средние данные количественного содержания фракций (альбуминов и глобулинов) нескольких электрофоретических методов [30, 31, 32, 33], которые колеблются примерно в следующих пределах. Альбумины от 50—60%, глобулины от 12—16%,  $\beta$ -глобулины от 12—16% и  $\gamma$ -глобулины от 10—15%.

На основании изложенного мы сочли возможным считать фракционирование правильным, в том числе если будут получаться воспроизводимые данные в указанных пределах.

Применив в первоначальных исследованиях в точности способ получения мутных растворов Аулла и Маккорда, мы не получили воспроизводимости и, кроме того, полученные данные не соответствовали приведенным выше нормам.

На основании этого мы пришли к заключению, что предложенная авторами [24] методика получения мутных растворов нуждается в видоизменении.

Сохранив концентрацию и pH основного раствора фосфорнокислого калия (для коагулирования общего белка), мы видоизменили

концентрации фосфатов для коагулирования других фракций—сыворотку добавляли в неразведенном виде. Нам удалось получить воспроизводимые результаты, но интервал концентраций фосфатов для коагулирования отдельных фракций получался чрезвычайно ограниченным.

При таком ограниченном интервале (все подфракции глобулинов коагулировались с разницей концентрации в 2—3%) возможен захват соседней фракции.

Дальнейшие исследования показали, что расширения интервала между концентрациями фосфатов для коагулирования подфракций глобулинов возможно достигнуть, изменяя рН коагулирующих растворов. При повышении рН в основном растворе результаты коагулирования общего белка не меняются, но при понижении концентрации фосфата (для коагулирования подфракций глобулинов) повышение рН очень заметно влияет на степень опалесценции, увеличивая ее.

Для определения фракции альбуминов от глобулинов произведено снижение концентрации основного раствора до тех пор, пока 6%ый раствор альбумина полностью переставал давать опалесценцию при его прибавлении к этому раствору, а опалесценция, получаемая при прибавлении сыворотки, зависит исключительно от глобулинов. Руководствуясь тем же принципом, подобраны соответствующие концентрации фосфатов для коагулирования подфракций глобулинов, которые были также проверены электрофоретическим методом. Таким образом, нами были подобраны концентрации фосфатов для коагулирования всех фракций сыворотки крови. После замутнения сыворотки крови последовательно убывающими концентрациями фосфатов, все мутные растворы сравниваются в нефелометре с прокалиброванным стандартом мутности и по высотам столбов определяется количество белка в каждой фракции.

Наши исследования показали, что при нефелометрических определениях получается хорошая воспроизводимость в соответствии с законом Ламберта-Бера, что установлено при помощи модельных опытов с препаратами белков и сывороткой крови.

Содержание общего белка и белковых фракций испытывают колебания в следующих пределах: общий белок от 7,4—9,5 (в абсолют. проц.); фракции в относительных процентах: альбумины от 50,0—60,0,  $\alpha$ -глобулины от 12—15,5,  $\beta$ -глобулины от 11,5—16 и  $\gamma$ -глобулины от 10 до 15,5. А/Г, коэффициент колебался во всех случаях от 1,1—1,3.

Полученные данные позволяют считать, что фракционирование производится с достаточной четкостью и полученные данные соответствуют большинству средних норм электрофоретических методов.

### М е т о д и к а

Реактивы: 1) основной раствор однозамещенного фосфорнокислого калия с рН—6,9—7,0;

## 2) 2,4 н. раствор едкого натрия.

Для приготовления основного раствора препарат предварительно выдерживается в течение одного дня в термостате при 37°, затем постоянно хранится в эксикаторе. Из этого препарата готовится 2,39 М раствор на 2,4 н. растворе едкого натрия. Для получения данной концентрации 32,4 г фосфорнокислого калия помещаются в мерную колбу на 100 мл (можно и в мензурку) и доливается до 100 мл 2,4 н. раствором едкого натрия. рН этого раствора равен 6,9—7,0. Такой метод приготовления основного раствора более рационален, так как обеспечивает стабильность рН, который, наоборот, колеблется при добавлении едкого натрия в сухом виде.

*Калибровка стабильного стандарта.* Для установления уровня стабильного стандарта в нефелометре надо приготовить раствор белка (лучше смесь альбумина и глобулина) в соотношении и концентрации, примерно соответствующей сыворотке крови. В целях калибровки можно также воспользоваться сыворотками с известным содержанием белка, определенным каким-либо другим методом. При коагулировании сыворотки основным раствором фосфата (1-ая фракция общий белок) получается сильно выраженная опалесценция, поэтому лучше как для калибровки, так и для дальнейших определений брать только 0,05 мл сыворотки на 5 мл фосфата, тогда как для коагулирования других фракций берется удвоенное количество сыворотки, т. е. 0,1 мл на 5 мл фосфата.

Полученный мутный раствор ставится в нефелометре на какую-либо произвольную высоту, например 10 мм, а напротив устанавливается стабильный стандарт и уравнивается освещенность полей. Эту процедуру следует повторить 2—3 раза и найти среднюю высоту стабильного стандарта, которая и будет его основной высотой.

Ввиду того, что в последнем мутном растворе, где коагулируются только  $\gamma$ -глобулины, степень мутности получается незначительной, надо также найти половинную высоту стояния стабильного стандарта. Для ее нахождения тот же мутный раствор переставляется на половину первоначальной высоты, т. е. на 5 мм и снова уравнивается освещенность полей.

После калибровки стабильный стандарт постоянно находится в нефелометре и только переставляется по надобности с полной высоты на половинную и наоборот.

*Ход определения.* В четыре колбочки наливается по 5 мл раствора фосфорнокислого калия в следующих концентрациях.

1. Основной (2,39 М) для коагулирования общего белка с рН—6,9—7,0.

2. 65% (по объему) от основного для коагулирования общего глобулина с рН—6,9—7,0.

3. 54% от основного для коагулирования  $\beta$  и  $\gamma$ -глобулинов рН—6,9—7,0.

4. 44% от основного для коагулирования  $\gamma$ -глобулинов рН—7,9—8,0.

Для точного приготовления этих растворов из основного приводится табл. 1, где все количества рассчитаны для одной пробы.

Таблица 1

№№ растворов	Количество основного раствора в мл	Количество воды	Количество раствора едкого натрия	Общее количество коагулирован. раствора
1	5	—	—	5
2	3,25	1,75	—	5
3	2,7	2,3	—	5
4	2,2	2,2	0,6	5

В первую колбочку при постоянном взбалтывании наливается 0,05 мл сыворотки, а в остальные 3—по 0,1 мл сыворотки. Полученные мутные растворы тотчас сравниваются со стабильным стандартом мутности и определяются соответствующие высоты столбов для каждой фракции.

Примечание: Первые 3 раствора сравниваются со стабильным стандартом на основной высоте, а в четвертом степень мутности слабая и поэтому его приходится сравнивать на половинной высоте стабильного стандарта.

### Р а с ч е т

Для нахождения количества белка в каждом мутном растворе прежде всего надо вычислить постоянный коэффициент для данного уровня стабильного стандарта. Коэффициент, представляющий собой произведение высоты столба любого белкового раствора на его концентрацию, вычисляется по данным калибровки следующим образом: допустим, количество белка в сыворотке крови равно 8% и мутный раствор был поставлен на высоту 10 мм. Для нахождения коэффициента надо 8 умножить на 10, но полученный результат разделить на 2, так как в первом мутном растворе количество сыворотки было вдвое меньше, чем в остальных (при количестве сыворотки 0,1 мл высота столба получилась бы вдвое меньше). Таким образом, в данном случае коэффициент получился равным 40.

По найденному коэффициенту вычисляется количество белка в каждом мутном растворе путем деления коэффициента на полученную при нефелометрировании высоту столба каждого мутного раствора.

Например, для первого мутного раствора высота столба оказалась равной 10,14, разделив на 2, получим 5,07 мм. Тогда количество общего белка будет равно:

$$40 : 5,07 = 7,9\%$$

Для второго мутного раствора высота столба получилась 11,8 мм, следовательно общее количество глобулинов (2-ая фракция) будет:

$$40 : 11,8 = 3,4\%$$

В третьем мутном растворе высота столба равна 19,1 мм, тогда количество  $\beta$ -и  $\gamma$ -глобулинов будет:

$$40 : 19,1 = 2,1\%$$

Если в четвертом мутном растворе на половинной высоте, допустим, получился столб высотой 18,2 мм, то его надо умножить на 2 (так как на полной высоте столб был бы вдвое выше) —  $18,2 \times 2 = 36,4$  мм.

Количество  $\gamma$ -глобулинов будет:

$$40 : 36,4 = 1,1\%$$

По полученным данным вычисляется количество белка в каждой фракции. Для нахождения количества альбуминов из общего количества белка (1-я фракция) вычитываем общее количество глобулинов (2-я фракция). Для нахождения количества  $\alpha$ -глобулинов из общего количества глобулинов (2-я фракция) вычитываем количество  $\beta$ -и  $\gamma$ -глобулинов (3-я фракция). Для нахождения количества  $\beta$ -глобулинов из суммарного количества  $\beta$ -и  $\gamma$ -глобулинов (3-я фракция) вычитываем количество  $\gamma$ -глобулинов (4-я фракция). Количество  $\gamma$ -глобулинов было рассчитано непосредственно по высоте столба в четвертом растворе.

В данном примере при расчете получились следующие данные:

Общий белок	—	7,9%
Альбумины	7,9 — 3,4 =	4,5
$\alpha$ -глобулины	3,4 — 2,1 =	1,3
$\beta$ -глобулины	2,1 — 1,1 =	1,0
$\gamma$ -глобулины		1,1

Для вычисления А/Г коэффициента надо количество альбуминов разделить на общее количество глобулинов.

### Обсуждение результатов

Благодаря всем последовательно проведенным приемам в отношении выбора концентраций и рН коагулирующих растворов фосфатов, в предлагаемой методике достигнута хорошая воспроизводимость результатов и стабильность полученных результатов определения белковых фракций у здоровых лиц.

На основании наших исследований, можно отметить, что фракционирование можно произвести успешно, если подобрать необходимые реактивы и создать соответствующие условия. Ионы фосфата имеют преимущество перед другими коагулянтами, так как они способствуют правильному фракционному разделению, что подчеркивалось не только Ауллом и Маккордом [24], но и другими авторами. Маркович [34] показал, что ионы фосфата способствуют более точному фракционированию  $\beta$ -и  $\gamma$ -глобулинов при электрофорезе, так как

при проведении электрофореза в фосфатном буфере аномалии получаются значительно меньше, чем при разделении фракций в других средах.

Однако не исключается возможность при необходимости произвести фракционное разделение сывороточных белков и другими коагулянтами, в частности аммонией сульфатом, хотя по этому вопросу в литературе имеются противоречивые данные. Р. А. Гудович [35] отмечает, что при старом методе фракционного разделения альбуминов и глобулинов [28], действительно, А/Г коэффициент получается на много выше (1,5—2,5), чем при электрофоретическом методе и объясняет это тем, что для коагулирования глобулинов берется недостаточная концентрация аммония сульфата.

Действительно, полунасыщенный раствор сульфата аммония с рН 6,6—6,8 не полностью осаждает глобулины, благодаря чему количество глобулинов получается заниженным, а А/Г коэффициент, наоборот, завышенным.

Однако при значительном повышении концентрации аммония сульфата можно полностью осадить глобулины и проверить при помощи раствора чистого альбумина, что было сделано также и нами.

Гудович отмечает, что путем соответствующего подбора концентраций аммония сульфата можно также подразделить подфракции глобулинов и получить результаты близкие к электрофоретическим нормативам.

В работе В. И. Окулова [36], наоборот, подчеркивается, что при помощи аммония сульфата невозможно произвести правильное фракционное разделение подфракций глобулинов. Эти данные, в корне противоречащие данным Гудовича и нашим исследованиям, можно приписать несовершенству методики фракционного разделения фракций, примененной Окуловым.

При фракционировании автор добавляет аммоний сульфат в сухом виде, меняя тем самым физико-химические свойства биологической системы и не учитывая рН образующейся смеси.

Кроме этого, он производит дальнейшее определение фракций глобулинов в фильтрах рефрактометрическим способом, что также не дает достоверных данных, так как на основании исследований Гудовича (что подтверждается и нашими исследованиями), рефрактометрические определения возможно производить исключительно в чистых сыворотках, ибо малейшие манипуляции с ним (разведение или внесение постороннего вещества) резко искажают результат рефрактометрического определения.

Исходя из сказанного, можно сделать вывод, что несмотря на преимущество фракционного подразделения при помощи различных концентраций фосфатов, не исключена возможность фракционного подразделения и другими коагулянтами, в частности аммонием сульфатом, с подбором соответствующих условий и концентраций коагулирующих растворов.

Проведенные нашим методом исследования показывают большую стабильность результатов у здоровых лиц и отклонения будут наблюдаться только в патологических случаях, что было отмечено нами.

Работы Аулла и Маккорда [24], Бутлера [25], Раппопорта [26], Гудовича [35] и, наконец, наши исследования подтверждают, что определение белка в мутных средах имеет особые преимущества и дает правильные результаты при правильном способе получения мутной взвеси.

Причина заключается в том, что реакции между белком и коагулирующим агентом специфичны и чувствительны, и поэтому, по сравнению с количеством взятого материала, количество мутного раствора настолько увеличивается (сыворотка разводится в 50 или 100 раз), что совершенно отпадает значение примесей, которые могут влиять на результат исследования и которые могут меняться в патологических случаях.

Прибавление различных веществ к сыворотке крови действительно не отражается на получаемой опалесценции. Следовательно, надо признать, что в данном случае нет никаких побочных факторов, влияющих на степень опалесценции, и поэтому единственной причиной погрешности может быть захват соседней подфракции, что также исключается в нашем методе благодаря созданию большего интервала между концентрациями коагулирующих фосфатов.

Следовательно, в предлагаемом нами методе учтены все возможные случайности и поэтому при правильном использовании метода будут получаться вполне точные и воспроизводимые результаты.

В техническом отношении методика крайне проста и доступна для освоения любой лабораторией. Все определения общего белка и его фракций производятся в течение нескольких минут.

Кафедра биохимии  
Ереванского медицинского института

Поступило 10.VIII 1960 г.

Յու. Ա. ԿԵՇԵԿ, Լ. Վ. ՍԵՄԵՐՋՅԱՆ

ԱՐՅԱՆ ՇԻՃՈՒԿԻ ՄԵՎ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑԻ ԵՎ ՆՐԱ ՖՐԱԿՑԻԱՆԵՐԻ  
ԲԱՆԱԿԱԿԱՆ ՈՐՈՇՄԱՆ ՆՈՐ ՄԵԹՈԴԻ ՆԵՖԵԼՈՄԵՏՐԻԿ ԵՂԱՆԱԿՈՎ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ներկա ուսումնասիրությունը հիմնված է ամերիկյան հեղինակներ Աուլլի և Մակկորդի հետազոտությունների վրա: Առաջարկվում է արլան շիճուկի մեջ սպիտակուցի և նրա ֆրակցիաների (ալբումինների և  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  գլոբուլինների) քանակական որոշման նոր մեթոդ՝ նեֆելոմետրիկ եղանակով:

Պատրաստվում է  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -ի և 2,39 M լուծույթ,  $\text{pH} = 6,9 - 7$ : Այս լուծույթով կոագուլացիայի են ենթարկվում արլան բոլոր սպիտակուցները:



նորացնելով և փոխելով լուծույթի pH-ը, հնարավոր է դառնում անջատել սպիտակուցի ֆրակցիաները մեկը մյուսից:

Պատրաստում են չորս պղտոր լուծույթներ՝ I-ի մեջ կոագուլացիայի են ենթարկվում բոլոր սպիտակուցները, II-ի մեջ՝ գլոբուլինները, III-ում՝  $\beta$  և  $\gamma$ -գլոբուլինները, իսկ IV-ում՝ միայն  $\gamma$ -գլոբուլինները:

Ստացված չորս պղտոր լուծույթները համեմատվում են նեֆելոմետրի մեջ կալուն ստանդարտի հետ (որը նախօրոք ենթարկված է կալիբրավայի) և սյան բարձրությունների միջոցով որոշվում է ընդհանուր սպիտակուցի ու նրա ֆրակցիաների քանակը:

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Tiselius E. Biochem. J. 31, 1464, 1937.
2. Philpot J. L. H. Natur. 141, 283, 1938.
3. Svensson H. Kolloid J. 87, 181, 1939.
4. Tiselius A., Erikson, Quensel B. Bioch. J. 33, 1752, 1939.
5. Longsworth J. G., Melnes D. A. J. am. chem. 62, 705, 1940.
6. Gordon и сопр. Natur. 164, 498, 1948.
7. Кравченко Н. А., Самарина О. П. и Крицман М. Г. Биохимия, 18, 1, 34, 1953.
8. Лазарев. Лабораторное дело., 2, 9, 1955.
9. Хавкин Ю. А. Лабораторное дело, 1, 11, 1957.
10. Alberty K. и Nicolas. J. am. chem soc. 70, 1675, 2297, 1948.
11. Svensson H. Arkiv, klin, min geol. 22, 156, 1946.
12. Moyer L. S. Abramson H. Gen. physiol. 19, 727, 1936.
13. Kunkel H. Methodes of. Biochemic analyses New J. 1954.
14. Егорова М. Н. Биохимия, т. 24, 1, 127, 1959.
15. Cremer H. D., Tiselius A. Biochem Z. 320, 273, 1950.
16. Мериди, Портильо, Ортега. Реф. журн. биохимия 12, 14663, 1958.
17. Koiw E., Wallenius G. Bull. Soc. Chem bid 33, 1940, 1951.
18. Dier и Färber Z. physiol. Chem. 2, 6, 307, 1957.
19. Dier и Färber Hoppe scybers. Zeit. phys. 313, 296, 1958.
20. Wohfson W. и сопр. Am J. Clin. path. 18, 1819, 1948.
21. Рождественская М. А. Актуальные вопросы перелив. крови, в. 6, 208, 1958.
22. Гуткина З. Л., Гаврилов Н. Н., Каверзин Е. Д., Асатiani В. С. Биохимическая фотометрия, 364, 1957.
23. Sohn E. J. Luebscher и сопр. J. am. Chem su. 62, 3396, 1940.
24. Aull J. и Meccord W. J. Clin med. 46, 476, 1955.
25. Butler A. U., Mangometry. J. biol. chem. 99, 1932, 33, 109, 755, 1935.
26. Rapoport M., Rubin J. Clin. Inwert. 22, 1943.
27. Кечек Ю. А. Лабораторное дело, 5, 15, 1956.
28. Валоховский С. Д. и Балаховский И. С. Методы химического анализа крови. 342, 1953.
29. Кечек Ю. А. Известия АН АрмССР (биол. и с.-х. науки), т. VII, 1954.
30. Коваленко В. Н. Лабораторное дело, 1, 6, 1957.
31. Касавина Б. С., Горкин В. З. Бюл. эксп. мед. и биол., т. 12, 38, 1954.
32. Ойвин И. А. и Басок М. Я. Клинич. медицина, 4, 52, 1951.
33. Ван-Хэ-Бинь. Лабораторное дело, 2, 8, 1959.
34. Маркович А. В. Вопросы мед. химии, вып. 1, т. VI, 41, 1960.
35. Гудович Р. А. К методу определения белков плазмы и сыворотки. Автореферат диссертации. Ташкент, 1955.
36. Окулов В. И. Вопросы мед. химии, 3, 163, 1958.