

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Романенко А.В., Карева А.А., Веровский В.Е., Соснин Д.А., Апухтин А.Ф., Островский О.В.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПИРОГАЛЛОВО-МОЛИБДЕНОВОГО РЕАГЕНТА: ОСАЖДЕНИЕ И ОКРАСКА БЕЛКОВ В РАСТВОРЕ И НА ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММАХ.

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 400131, г. Волгоград, Россия

Исследованы свойства реагента пирогаллол красный-молибдат-карбинол (PRMM). Было определено (на модельных смесях белка), что компромиссное соотношение образец/реагент для определения белка, с одной стороны, и его осаждения, с другой стороны, составляет 1/9. При этом условия предел обнаружения и предел количественного определения близки к 0,04 г/л; выход белка составляет 50-70%. В случае окрашивания ДСН-ПАА гелей или агарозных гелей чувствительность реагента PRMM ниже чувствительности красителя Coomassie R-250 или красителя Acid Violet. Однако, при использовании PRMM отклик линейен от 0,5 мкг до 6 мкг БСА на полосу, что является привлекательным для полуколичественного электрофоретического анализа белков. В случае проб мочи CV% был равен 9,3%. Концентрации белка в образцах мочи, измеренных с помощью PRMM, были близки к результатам клинической лаборатории для концентраций 0,2-0,4 г/л.

Ключевые слова: пирогалловый красный; предел обнаружения; выход белка; окраска электрофореграмм.

Для цитирования: Романенко А.В., Карева А.А., Веровский В.Е., Соснин Д.А., Апухтин А.Ф., Островский О.В. Характеристики пирогаллово-молибденового реагента: осаждение и окраска белков в растворе и на электрофореграммах. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (2): 81-87. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-2-81-87>

Для корреспонденции: Романенко Анна Викторовна, аспирант; e-mail: romanenko.anna@inbox.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 14.01.2023

Принята к печати 25.01.2023

Опубликовано 00.02.2023

Romanenko A.V., Kareva A.A., Verovskiy V.E., Sosnin D.A., Apukhtin A.F., Ostrovskiy O.V.

PROPERTIES OF THE PYROGALLOLIC-MOLYBDENUM REAGENT: PRECIPITATION AND STAINING OF PROTEINS IN SOLUTION AND ON ELECTROPHOREGRAMS.

Federal State Government-Financed Educational Institution of Higher Education «Volograd State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 400131, Volgograd, Russian Federation

Set of properties of pyrogallol red-molybdate-methanol (PRMM) reagent was investigated. It was determined (model protein mixtures) that compromise ratio sample/reagent for protein determination, from one side, and precipitation, from another side, is 1/9. Under this condition: limit of detection and limit of quantification are close to 0,04 g/l, and yield of protein is 50%-70%. In case of SDS-PAA gels or agarose gels staining a sensitivity of PRMM reagent is lower than sensitivity of Coomassie R-250 dye or acid violet dye. However, under PRMM staining response is linear from 0,5 mcg up to 6 mcg BSA per band, thus is attractive for the semiquantitative electrophoretic analysis of proteins. In case urine samples CV% was equal 9,3%. Protein concentrations in urine samples, measured with PRMM, were close to results of clinical laboratory for concentrations 0,2-0,4 g/l.

Key words: pyrogallol red; detection limit; protein yield; protein gel staining.

For citation: Romanenko A.V., Kareva A.A., Verovskiy V.E., Sosnin D.A., Apukhtin A.F., Ostrovskiy O.V. Properties of the pyrogallic-molybdenum reagent: precipitation and staining of proteins in solution and on electrophoregrams. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (2): 81-87 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-2-81-87>

For correspondence: Romanenko Anna Viktorovna, graduate student; e-mail: romanenko.anna@inbox.ru

Information about authors:

Romanenko A.V., <https://orcid.org/0000-0003-3592-7474>;

Kareva A.A., <https://orcid.org/0000-0002-05032744>;

Verovskiy V.E., <https://orcid.org/0000-0001-5944-9572>;

Sosnin D.A., <https://orcid.org/0000-0003-0771-7525>;

Apukhtin A.F., <https://orcid.org/0000-0001-7624-6355>;

Ostrovskiy O.V., <https://orcid.org/0000-0001-9827-9545>.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 14.01.2023

Accepted 25.01.2023

Published 00.02.2023

Введение. Лечение заболевания почек составляют значительную часть бюджета здравоохранения во многих странах. Протеинурия является частым проявлением патологии у таких больных, при этом очевидно, что происхождение белков зависит от ха-

рактера заболевания, что предполагает возможность заменить биопсию почки в качестве диагностической процедуры неинвазивным исследованием протеома мочи. Однако, при всех успехах протеомики следует четко осознавать, что результаты здесь носят, скорее,

качественный, чем количественный характер, и разработка клинической интерпретации данных потребует длительных проспективных исследований. Более того, многостадийность технологии изучения протеома с использованием разных методов определения белка на разных стадиях приводит к неразрешимым аналитическим проблемам. А именно: общий белок мочи наиболее часто определяется при помощи пирогаллолово-молибденового реагента, в то время как окраска белка в электрофоретических гелях выполняется при помощи иных красителей с другими специфическими характеристиками, в результате получают трудно сопоставимые результаты. Поэтому нам представлялось важным применить один краситель на всех стадиях получения протеограммы.

Использовать пирогаллолово-молибденовый реагент для определения белка в моче впервые предложили Y.Fujita и соавт. [1]. В дальнейшем реагент был модифицирован N.Watanabe и соавт. [2]. В редуцированном виде, как правило, без оксалата и карбинола, этот реагент широко представлен на рынке. В 1996 г. T.Marshall и соавт. [3] использовали реагент фирмы Sigma для концентрирования белков перед электрофорезом. Это позволило получить качественные электрофореграммы при концентрации белка в исходных образцах ~1 мг/л. В 2004 г. R.B. Caldwell и C.T. Lattemann. [4] модифицировали состав реагента и усовершенствовали процедуру осаждения белков для концентрирования лизатов клеток.

Таким образом, представляется интересным исследовать модифицированный реагент Ватанабе (PRMM) как «универсальный реагент», пригодный как для определения белка в миллиграммовом диапазоне концентраций в моче, так и для концентрирования и исследования белка в разведенных биопробах.

Материал и методы. Модельные образцы с концентрацией белка от ~ 0,1 г/л до ~1,8 г/л готовили путем разведения сыворотки крови человека (3 серии) с известным содержанием белка (по биуретовому методу) физиологическим раствором. Функцию отклика (оптическая плотность раствора при длине волны 625 нм, спектрофотометр Helios a, Thermo Electron, США) регистрировали в трех приготовлениях каждой из концентраций для трех соотношений проба/реагент: 1/1 [4], 3/7 и 1/9. Результаты сравнивали с характеристиками, полученными при использовании коммерческого реагента «Белок PGR» (Абрис, Россия) («рутинный метод»). Калибровка: одноточечная с использованием калибратора из набора «Белок PGR» (бычий сывороточный альбумин (BCA), 0,2 г/л). Пределы обнаружения аналита (LOD) рассчитывали: 1) по ГОСТ-Р-ИСО-11843-2-2007 (метод А); 2) по ГОСТ-Р-ИСО-11843-1-2007 (метод Б, соответствует рекомендациям IUPAC [5]); 3) по рекомендациям ICH (метод В) [6].

Согласно данным, приведенным в источнике [4], смесь проба/реагент (общий объем – 2 мл) выдерживали в течение ночи при температуре +4°C, затем центрифугировали 10 мин (12 тыс. об/мин, центрифуга Jouan A12, Jouan SA, Франция). Осадок отмывали 1 мл ацетона и вновь центрифугировали. Полученный

осадок ресуспендировали в 50 мкл буфера Лэммли (без бромфенола). Выход белка (до 5 серий приготовлений) оценивали флуорометрически (Hitachi MPF-4, $I_{\text{возбуждения}} = 280 \text{ нм}$, $I_{\text{эмиссии}} = 360 \text{ нм}$) путем сравнения интенсивности флуоресценции в пробах до осаждения и после ресуспендирования.

Способность PRMM окрашивать электрофореграммы изучали на 10% ДСН-полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ, камера Mini-Protean, Bio-Rad, США) и агарозном геле (SP-24 Analisis kit, SAS-1, SAS-2 Helena Biosciences, Великобритания). ДСН-ПАА гели после разделения ресуспендированных образцов окрашивали Coomassie-R250 (общепринятым способом) или оставляли на ночь в PRMM. В случае агарозных гелей SP-24 использовали 5 образцов сыворотки крови человека (каждый наносили дважды на противоположные края геля). После разделения пластину разрезали и окрашивали либо на SAS-2 (краситель Acid Violet), либо реагентом PRMM. Электрофореграммы после окраски PRMM не требовали обесцвечивания фона. Результаты документировали на сканере Epson Perfection V750 Pro. Чувствительность метода окрашивания гелей реагентом PRMM оценивали путем нанесения на дорожки ряда разведений калибратора из набора «Белок PGR» (от 0,15 до 6 мкг на дорожку). Сканы электрофореграмм анализировали с помощью программы ImageJ (США).

Клиническая аппликация определения концентрации белка реагентом PRMM в сравнении с коммерческим реагентом «Белок PGR» (Абрис) была проведена на 10 образцах мочи в четырех приготовлениях. Измерение содержания белка в моче набором «Белок PGR» проводили согласно инструкции производителя. В случае реагента PRMM использовали установленное оптимальное для определения белка и концентрирования соотношение проба/реагент 1/9.

В ходе исследования для сбора биоматериала было получено добровольное информируемое согласие обследуемых по установленной форме, принципы конфиденциальности и уважения автономии личности не были нарушены. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава РФ (протокол № 2020/002 от 17.02.20 г.).

Результаты и обсуждение. Измерение концентрации белка. Результаты исследования зависимости оптической плотности от концентрации белка для соотношений проба/реагент 3/7 и 1/9 приведены на рис.1. При соотношении 1/1 (которое использовалось в работе [4]) для смеси было характерно быстрое погуптнение и адекватное измерение оптической плотности оказалось невозможным. При соотношении реагент/проба 3/7 для результатов было характерно высокое рассеивание, а отклик был близок к линейному ($R^2=0,9$) только при концентрациях белка ниже 0,5 г/л (рис.1).

При соотношении проба/реагент 1/9 коэффициент чувствительности (наклон = 0,57) значительно превышал наклон, достигнутый с использованием реагента «Белок PGR» (0,14, см. рис.1). При этом рассеивание результатов было несколько выше, однако коэффициент детерминации был близок к R^2 для рутинного метода (0,94 по сравнению с 0,99, см. рис. 1). Расчет предела

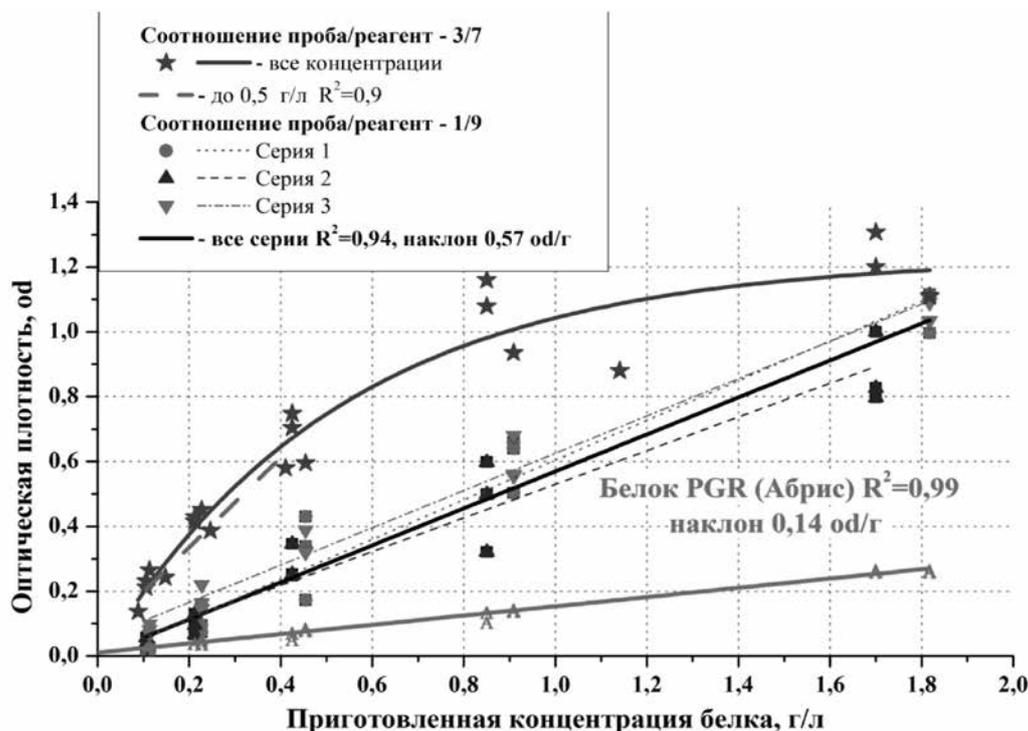


Рис. 1. Зависимость оптической плотности аналитической смеси от концентрации белка для соотношений проба/реагент 3/7 и 1/9.

Таблица 1

Пределы обнаружения белка реагентом PRMM (соотношение реагент проба 1/9) в сопоставлении с рутинным методом

Реактив	Метод А	Метод Б*	Метод В
PRMM	0,061 г/л	0,018 г/л	0,03 г/л
Белок PGR	0,048 г/л	0,011 г/л	0,032 г/л

Примечание. * – В качестве «малой» использовали концентрацию белка 0,05 г/л.

обнаружения белка, проведенный с использованием этих данных (табл. 1), показал, что при любом способе расчета данного показателя оценки достаточно близки. Однако отметим, что значение, полученное методом А (случай линейной калибровки) для рутинного реагента, несколько превышает заявленный производителем нижний предел диапазона измерений.

Как известно, к необходимым характеристикам любого аналитического метода относится также предел количественного определения (LOQ), который определяется априорно установленными требованиями к смещению результата измерения (В%) и коэффициенту вариации (CV%). Результаты анализа этих характеристик приведены на рис. 2.

Коэффициенты вариации для обоих вариантов пирогаллолово-молибденового реактива, начиная с концентрации 0,05 г/л, были в пределах 2%. Значительная же величина смещения может быть объяснена тем, что «истинной» считалась концентрация белка, приготовленная исходя из результатов измерения белка биуретовым методом. Таким образом, если установить относительно «жесткие» требования только к коэффициенту вариации (5%), и учесть данные табл. 1, то предел количественного определения для метода с

PRRM можно принять равным 0,04 г/л (как и для рутинного метода).

Осаждение (концентрирование) белка. Результаты оценки выхода белка при осаждении приведены на рис 3. Зависимость отношения интенсивностей флуоресценции пробы до и после осаждения выглядит несколько парадоксально – чем ниже концентрация, тем выше выход белка. Однако следует учитывать, что, помимо аналитической полосы поглощения, комплекс реагент-белок имеет также достаточно высокоинтенсивное «плечо» в области 360-380 нм [1]. То есть характер зависимости может быть объяснен эффектом внутреннего фильтра. Рассматривая результаты в области малых концентраций, можно заключить, что выход белка составляет не менее 56-79% (см. рис. 3). Такой выход белка сопоставим с выходом, который достигим, например, при осаждении белков мочи другими методами [7].

Окрашивание гелей реагентом PRMM. Вид электрофореграмм после окрашивания PRMM в сопоставлении с «традиционной» окраской (при одинаковых настройках сканера) приведен на рис.4. Качественная оценка электрофореграмм показывает, что интенсивность фракций при окраске PRMM не-

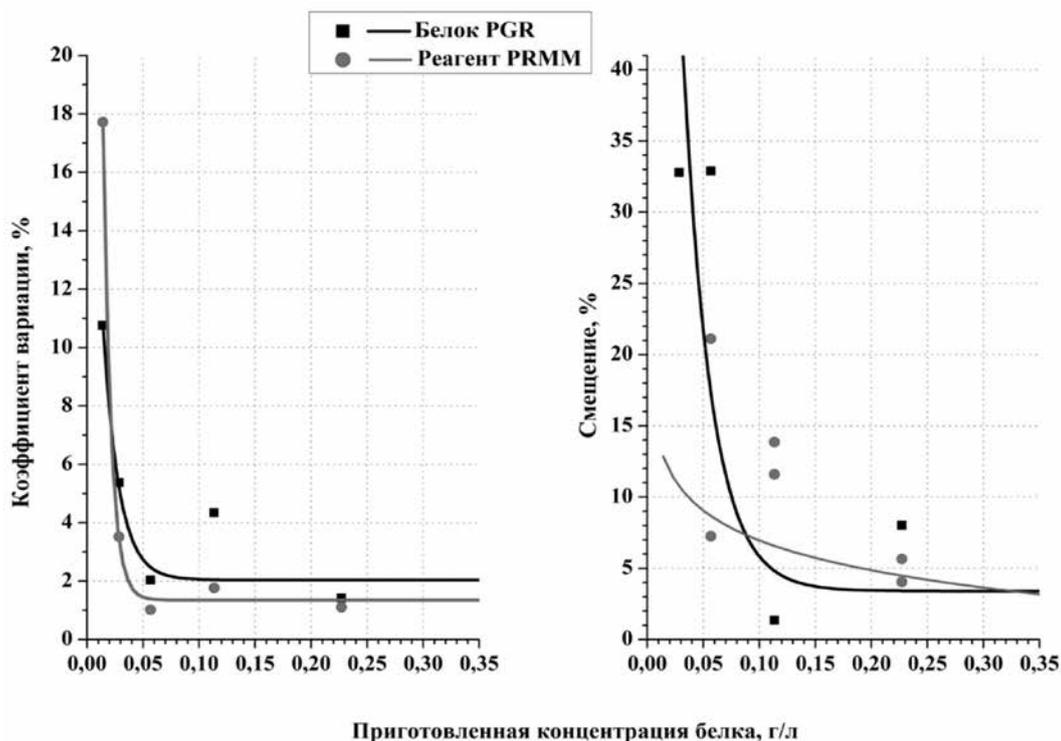


Рис.2. Зависимость коэффициента вариации и смещения результата от концентрации белка.

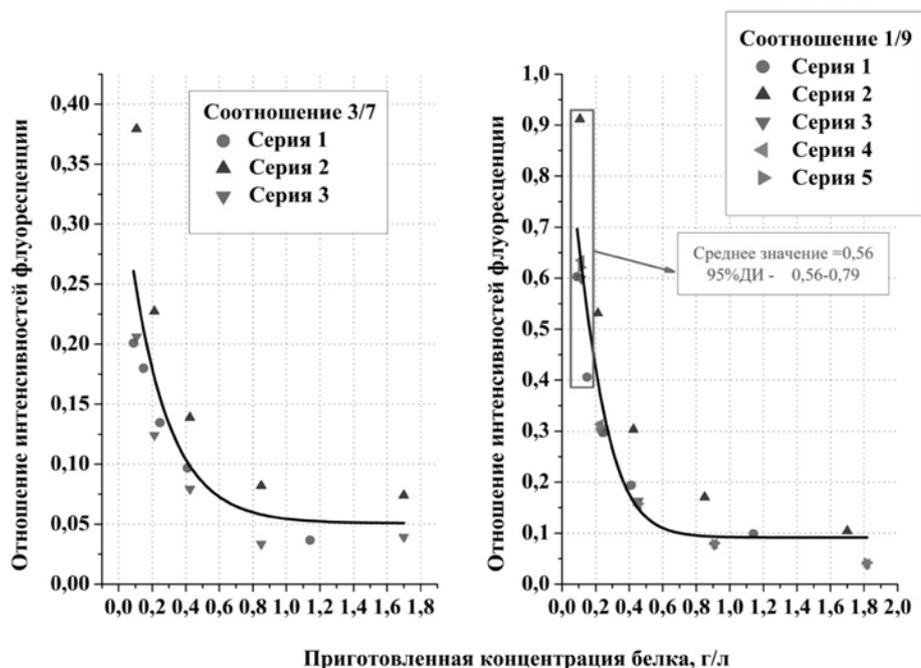


Рис. 3. Зависимость отношения интенсивностей флуоресценции «проба до осаждения/проба после ресуспендирования» от приготовленной концентрации белка.

сколько уступает Кумасси R-250. Однако фоновое окрашивание при использовании PRMM практически отсутствует (см. рис. 4). Количественная оценка зависимости площади полосы на электрофореграмме от количества нанесенного белка (рис. 5) показала, что для Кумасси эта зависимость носит выражен-

ный экспоненциальный характер. В то же время, при окраске PRMM – зависимость линейна ($R^2=0,98$). А преимущество Кумасси по коэффициенту чувствительности (наклон прямой при линейной аппроксимации) выражено только при малых количествах белка (7905 у.е./мкг до 1 мкг на дорожку, см. рис. 5).

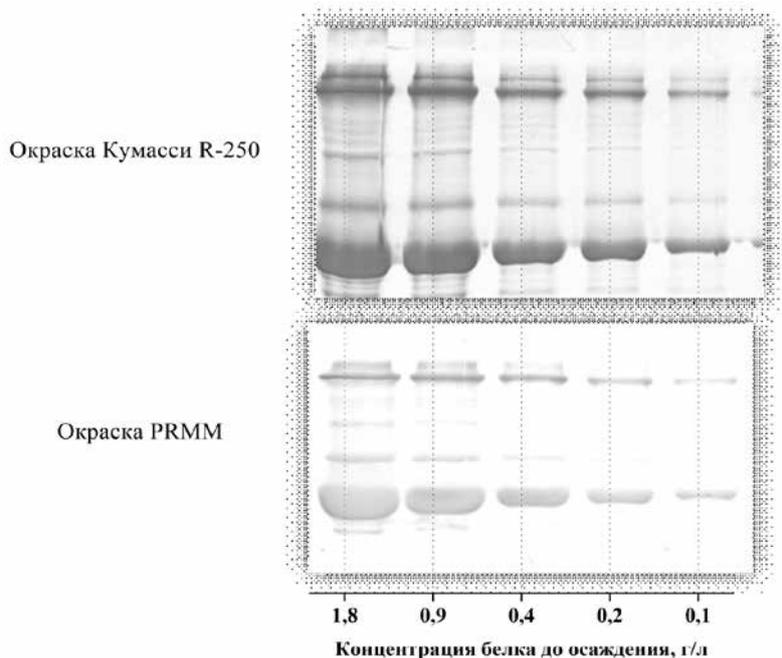


Рис. 4. Результаты ДСН-ПААГ электрофореза ресуспендированных проб: окрашивание PRMM и Кумасси R-250.

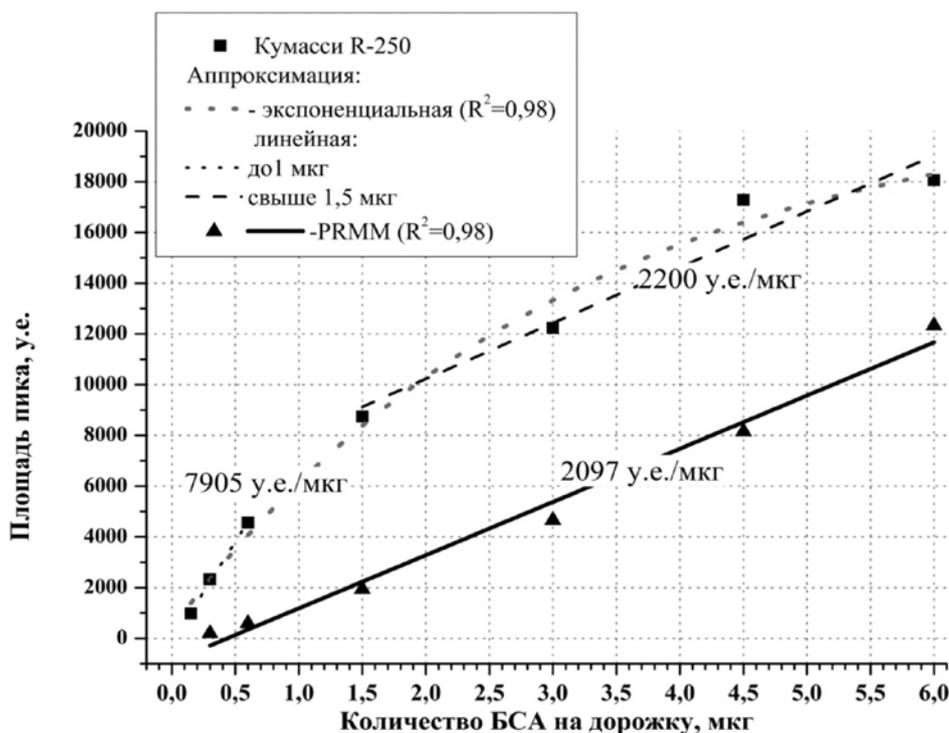


Рис. 5. Зависимость площади пика на электрофореграмме от количества белка, нанесенного на дорожку при окрашивании Кумасси R-250 и реагентом PRMM.

При больших количествах белка на дорожку – коэффициенты чувствительности для обоих методов окрашивания примерно равны. Близкие результаты были получены при окрашивании реагентом PRMM агарозных гелей SP-24 «Helena» (рис. 6).

Измерение концентрации белка в моче пациентов. На этом этапе: а) оценивали воспроизводимость результатов анализа содержания белка в моче реагентом PRMM (табл. 2), и б) проводили сравнительный анализ результатов, полученных в клинической лабо-

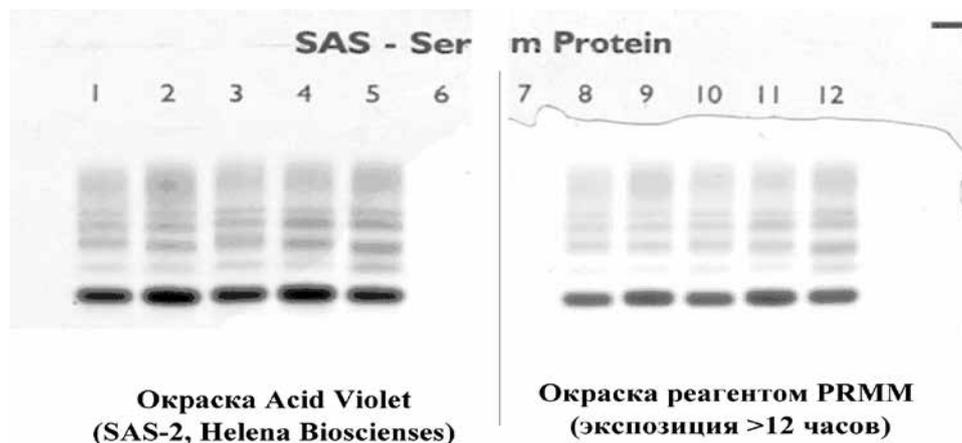


Рис. 6. Гель SP-24 Analysis kit после окраски Acid Violet и PRMM.

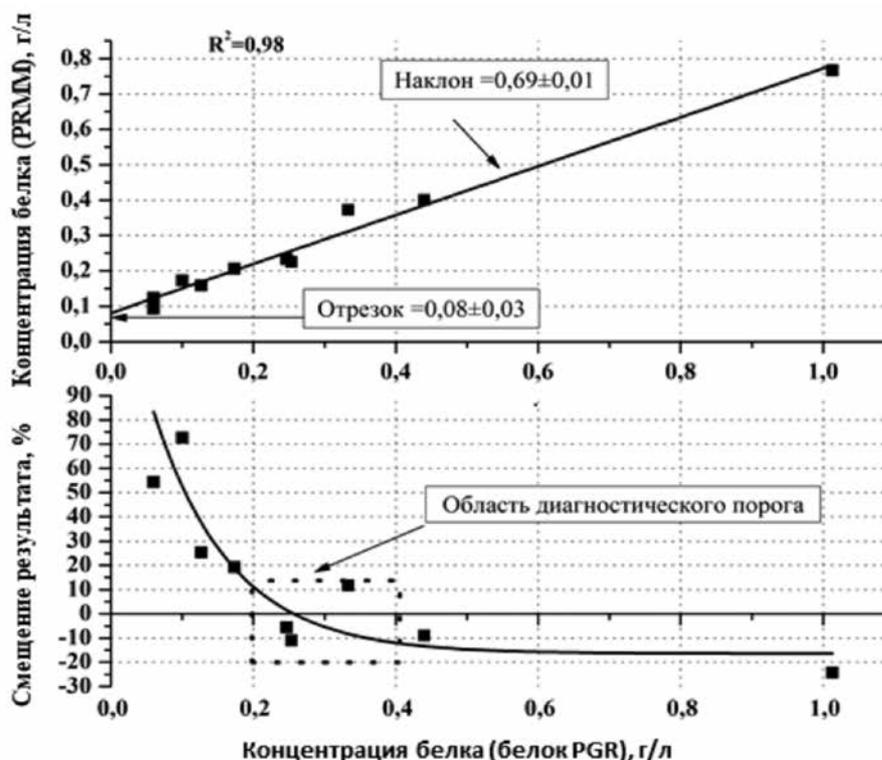


Рис. 7. Зависимость между результатами измерений общего белка в моче набором «Белок PGR» (Абрис) и реагентом PRMM (смещение = $(PGR-PRMM)/PGR, \%$).

ратории, с результатами, полученными с применением реагента PRMM (рис. 7)

Коэффициент вариации (CV%) при анализе отдельных проб колебался в пределах 3%-10%. Зависимость коэффициента от концентрации белка в пробе, в отличие от модельных образцов (см. рис. 2) отсутствовала (см. табл. 2), так, что эти колебания, по-видимому, были связаны с особенностями не белкового состава проб. В целом же (по результатам дисперсионного анализа, см. табл. 2), CV% в случае анализа реальных образцов составил 9,3%.

Зависимость между результатами измерений общего белка в моче набором «Белок PGR» (получены

в клинической лаборатории) и реагентом PRMM имеет выраженный линейный характер ($R^2=0,98$; рис. 7). Однако тангенс угла наклона составил всего 0,69. При этом, при низких концентрациях белка в пробе (на нижней границе динамического диапазона набора «Белок PGR») результат измерений с реагентом PRMM выше на 60-80% (смещение, см. рис. 7). При высоких концентрациях белка в пробе (0,4 – 1 г/л) – результат занижен на 10 – 20%. Это обусловлено, по-видимому, тем, что концентрация белка в 8 из 10 образцов мочи, использованных в данной серии, была меньше нижней границы динамического диапазона коммерческого реагента. Однако в области диагно-

Таблица 2

Оценка воспроизводимости количественного определения белка в моче реагентом PRMM (концентрация белка, г/л)

Код пациента	Приготовления				CV%
	1	2	3	4	
5	0,748	0,713	0,811	0,794	5,8
9	0,410	0,392	0,413	0,399	3,2
10	0,372	0,366	0,392	0,359	3,7
26	0,228	0,189	0,211	0,199	8,23
33	0,221	0,220	0,227	0,235	3,1
36	0,236	0,217	0,252	0,227	6,41
20	0,101	0,090	0,090	0,091	5,81
21	0,180	0,168	0,161	0,182	5,8
22	0,155	0,158	0,154	0,168	3,9
23	0,120	0,134	0,133	0,108	10,0
-					9,3*

Примечание. * – Коэффициент вариации (CV%) по результатам двухфакторного дисперсионного анализа.

Таблица 3

Рекомендуемые аналитические характеристики для методов определения белка в моче по Westgard QC

Аналит	Биологическая вариабельность		Целевые аналитические характеристики		
	CVi, %	CVi, %	CVa, %	Смещение B, %	Общая ошибка, %
Белок в моче, г/л	35,5	23,7	17,8	10,7	40

стического порога (0,2 – 0,3 г/л) результаты измерений близки (см. рис. 7).

Сопоставление полученных результатов с рекомендациями Westgard QC [8] (табл. 3) показывает, что в области диагностического порога определение белка с помощью оригинальной рецептуры реагента PRMM – адекватная альтернатива рутинному методу («Белок PGR», Абрис).

Выводы:

По совокупности характеристик, полученных при исследовании модельных смесей белка, реагент PRMM выглядит весьма перспективным для его использования в качестве «универсального» на 3-х начальных стадиях анализа белкового состава биологических проб с концентрацией белка в диапазоне 0,05-2 г/л.

1. Для измерения концентрации белка в исходных образцах (при соотношении проба/реагент 1/9).

2. Для осаждения (концентрирования) белка в тех же образцах.

3. Для окраски электрофореграмм и полуколичественной оценки содержания отдельных белковых фракций (от 0,5 до 6 мкг во фракции).

На примере клинических образцов мочи также показано, что коэффициент вариации при определении белка на превышает 10% в широком диапазоне концентраций, а смещение (B%) близко к 10% в зоне 0,2-0,4 г/л. То есть, общая ошибка (TE%) в зоне диагностического порога (0,3 г/л) не превышает 14%, что

укладывается в требования, предъявляемые к клиническим лабораторным тестам.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Fujita Y., Mon I., Kitano S. Color reaction between pyrogallol red-molybdenum(VI) complex and protein. *Bunseki Kagaku*. 1983; 32: E379-E386.
- Watanabe N., Kamel S., Ohkubo A., Yamanaka M., Ohsawa S., Makino K., Tokuda K. Urinary protein as measured with a Pyrogallol-Red-molybdate complex manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. *Clin. Chem*. 1986; 32: 1551-4.
- Marshall T., Abbott N.J., Fox P., Williams K.M. Protein concentration by precipitation with pyrogallol red prior to electrophoresis. *Electrophoresis*. 1995; 16: 28-31. DOI:10.1002/elps.1150160107.
- Caldwell R.B., Lattemann C.T. Simple and reliable method to precipitate proteins from bacterial culture supernatant. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004 Jan; 70 (1): 610-2. DOI: 10.1128/AEM.70.1.610-612.2004.
- IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the “Gold Book”). Compiled by A. D. McNaught, A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.
- ICH harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1_Guideline.pdf.
- Afkarian M., Bhasin M., Dillon S.T., Guerrero M.C., Nelson R.G., Knowler W.C., Thadhani R., Libermann T.A. Optimizing a proteomics platform for urine biomarker discovery. *Mol. Cell Proteomics*. 2010; 9(10): 2195-2204. DOI:10.1074/mcp.M110.000992.
- Westgard Quality Requirements. <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>.