

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОМЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО
АГЕНТСТВА»
(ФГБУН НЦБМТ ФМБА России)**

Утверждаю

Директор

д.м.н., профессор

В.Н.Каркищенко

« » февраля 2019 г.



О Т Ч Е Т

**«Качественное и количественное изучение белкового состава продукта
SAUMAL Immune care»**

Ответственный исполнитель:  к.м.н., доцент М.Т.Гасанов

Светлые горы Московской области

2019

МЕТОДЫ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И ВЭЖХ-МС ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛОЧНЫХ БЕЛКОВ

В работе использовались следующие реактивы и материалы («Sigma», США): кумасси бриллиантовый голубой G-250, спирт этиловый, ортофосфорная кислота, натрия хлорид, натриевая соль дезоксихолевой кислоты, натрия этилендиаминтетраацетат двузамещённый, трис(гидроксиметил)-аминометан, 1М раствор дитиотреитола, 1 мМ раствор соляной кислоты, трипсин из свиной поджелудочной железы, эндопротеиназа Lys-C из *Lysobacter enzymogenes*. бычий сывороточный альбумин. («Agilent Technologies», США): фильтры центрифужные с диаметром пор 0,22 мкм в комплекте с микроцентрифужными пробирками вместимостью 2,0 мл – для ферментативного расщепления; калибровочный раствор для QTOF 6545XT – для калибровки масс-спектрометра. А также: ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ, метанол для ВЭЖХ (все «Merck», Германия); муравьиная кислота («Fluka», Германия) – для приготовления подвижных фаз.

Все растворители и реагенты были аналитической степени чистоты, растворы для подготовки проб готовили с использованием деионизованной воды.

Работу проводили с использованием следующего вспомогательного оборудования:

– для получения очищенной воды использовали установку для получения деионизованной воды «АКВАЛАБ» УВОИ-«МФ»-1812 («Медиана фильтр», Россия), имеющей сопротивление 18,2 МОм;

– для определения массы использовали шпатель металлический из нержавеющей стали 150 × 5 мм («Heinz Herenz Medizinal bedarf GmbH», Германия) и весы аналитические Sartorius Expert LE225D («Sartorius», Германия);

– для отбора жидкостей использовали дозаторы переменного объема 10-100; 100-1000; 1000-5000 мкл и наконечники для дозаторов вместимостью 0,1-10,0; 10,0-100,0; 50,0-1000,0; 1000,0-10000,0 мкл («Biohit», Германия);

– для подготовки проб использовали пробирки микроцентрифужные полипропиленовые «LoBindProtein» вместимостью 1,5 и 2,0 мл («Eppendorf», Германия), виалы стеклянные вместимостью 15 мл с герметично завинчивающимися крышками, виалы стеклянные с герметично завинчивающимися крышками вместимостью 2 мл, вставки стеклянные вместимостью 0,2 мл (все «Supelco», США), колбы мерные вместимостью 10 и 1000 мл («Duran», США), шкаф сушильный («СНОЛ», Россия), ванну ультразвуковую («Серьга», Россия), микрошриц 100 мкл («Hamilton», Швейцария), вибро-экстрактор VORTEX K-550 («IKA», Германия), термомиксер «Comfort Eppendorf» («Eppendorf», Германия);

– для хранения проб, реактивов и стандартных образцов использовали холодильник бытовой («Атлант», Беларусь) и морозильную камеру UF V 500 («Binder», Германия);

– для оценки наличия соединений пептидной или белковой природы спектроскопическим методом использовали спектрофотометр Multiscan GO (Thermo Scientific, США) с 96-луночными кюветами длиной 10 мм («Corning», США);

– оценку степени протеолиза проводили с использованием диодно-матричного детектора 1260 DAD HS Max-Light Cell, соединенного с высокоэффективным жидкостным хроматографом 1260 Infinity II Lab Bin Pump, оснащенного встроенным дегазатором, оборудованного системой автоматического ввода пробы Multisampler 1260, и блоком для термостатирования хроматографической колонки («Agilent Technologies» США);

– ВЭЖХ-МС/МС ВР анализ проводили с использованием жидкостного хроматографа модели 1260 Infinity II «Agilent Technologies», оснащенного насосом 2-х канальным дегазатором, оборудованного системой автоматического ввода пробы Multisampler 1260 Analytical head 100 µl с масс-спектрометрическим детектором QTOF 6545XT с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении («Agilent Technologies» США),

серверная станция ЭВМ («HP», США), хроматографические колонки ZORBAX 300SB-C18 длиной 250 мм и внутренним диаметром 2,1 мм, размер сорбента 5,0 мкм с размером пор 300 Å и AdvanceBio Peptide Mapping длиной 150 мм и внутренним диаметром 2,1 мм, размер сорбента 2.7 мкм («Agilent Technologies», США).

- 2D ПААГ электрофорез проводили с использованием готового набора ReadyPrep 2-D Starter Kit, стрипы ReadyStrip IPG Strips, 11cm, pH 4-7, гели Criterion TGX Any kD, краска Bio-Safe Coomassie Stain, детектировали результаты на системе Gel Doc EZ System с использованием программного обеспечения Image Lab Bio-Rad («Bio-Rad», США).

- ГРХ анализ выполняли на хроматографической системе среднего давления NGC Discover («Bio-Rad», США), оснащённой многоволновым спектрофотометрическим детектором, датчиком pH элюента, кондуктометрической ячейкой и хроматографической колонкой для ГРХ высокого разрешения Enrich SEC 650, в качестве калибровочных стандартов с известными молекулярными массами использовали Gel Filtration Standard («Bio-Rad», США).

- База данных полипептидных последовательностей UniProt в сети Интернет (www.ebi.uniprot.org) и программа для сбора и обработки данных Spectrum Mill MS Proteomics Workbench («Agilent», США).

Определение общего белка.

Проводили по методу Бредфорда без предварительного осаждения белка в соответствии с ГФ РФ, ОФС.1.2.3.0012.15, «Определение» белка». Лиофилизат экстракта предварительно растворяли в воде очищенной до концентрации 150 мг/мл в объеме растворителя. Содержание белка определяли по калибровочной кривой для раствора бычьего сывороточного альбумина.

Все процедуры *двумерного электрофоретического разделения белков* выполняли согласно протоколу, входящему в набор. Навеску образца брали из расчета 250 мг белка на 185 мкл денатурирующего раствора. В *двухмерном*

электрофорезе первый этап разделения – изоэлектрофокусировка. Белки разделяются электрофоретически на основе их pI - значения pH , при котором белок не несет чистого заряда. Второй этап разделения представляет собой SDS-PAGE, где белки, уже разделенные ИЭФ, далее разделяются по их размерам. Гели предварительно промывали дистиллированной водой и заливали раствором краски объемом 200-300 мл. Оставляли на ночь для лучшего окрашивания при комнатной температуре. На следующий день отмывали гели дистиллированной водой тремя повторностями и детектировали результаты на системе Gel Doc EZ System.

Молекулярно-массовое белковое распределение продукта проводили на жидкостном изократическом хроматографе высокого давления со спектрофотометрическим проточным детектором с длиной волны 280 нм.

Таблица 1 Условия масс-спектрометрического детектирования

Наименование параметра	Значение
Масс-спектрометрический детектор	QTOF 6545XT
Режим источника ионизации	Dual Agilent Jet Stream Electrospray Ionization (Dual AJS ESI)
Разрешающая способность	60000
Тип ячейки соударительной диссоциации	Ячейка соударительной диссоциации
Энергия ионизации	$(30 \pm 15) \%$
Детектируемое зарядовое состояние	2-5
Режим сканирования	AutoMSMS
Диапазон детектируемых масс	100-1700
Полярность детектируемых ионов	Детектирование положительных ионов
Напряжение на распылителе	3.5 кВ

Наименование параметра	Значение
Напряжение фрагментора	175 В
Скорость потока газа-осушителя	13 л/мин
Давление газа на небулайзере	35 psig
Температура распылителя	250 °С

Анализ на жидкостном хроматографе Agilent Technologies 1260 Infinity II проводили в режиме AutoMSMS. Хроматографическая колонка AdvanceBio Peptide Mapping, предколонка ZORBAX Extend-C18 Narrow-Bore Guard Column. Элюирование осуществляли смесью, состоящей из компонентов А и В, в градиентном режиме: до 0.5 мин – 5%В, с 0.5 по 15,0 мин увеличивается до 35%В, с 17,0– до 95% и удерживается в течение 13 мин, с 30,01 мин – возвращается в исходные условия. Время уравнивания колонки на исходных условиях – 5 мин. Компонент А представлял собой 0,1 % раствор муравьиной кислоты в деионизированной воде, компонент В – 0,1 % раствор муравьиной кислоты и 10 % деионизированной воды в ацетонитриле. Скорость потока – 400 мкл/мин, время анализа составило 30 мин. Условия масс-спектрометрического детектирования приведены в таблице 1.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ГЕЛЬ- ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛОЧНЫХ БЕЛКОВ
МЕТОДАМИ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И ВЭЖХ-МС ВЫСОКОГО
РАЗРЕШЕНИЯ**

Результаты исследований отражены в таблице 2 и Рисунке 1.

Таблица 2.

**Качественный и количественный состав белков в продукте
SAUMAL Immune Care**

	Main Accession	Description	MW [kDa]	% сод-ие	г/100г
1	O77811	Lactotransferrin (Fragment) (TRFL_HORSE)	75,9427	3,0%	0,63
2	Q9GKK3	Beta-casein (CASB_HORSE)	27,0324	29,0%	6,09
3	P11376	Lysozyme C, milk isozyme (LYSC1_HORSE)	14,6429	5,0%	1,05
4	P07380	Beta-lactoglobulin-2 (LACB2_HORSE)	20,1100	14,5%	3,05
5	P02758	Beta-lactoglobulin-1 (LACB1_HORSE)	20,3313	14,5%	3,05
6	P08334	Alpha-lactalbumin A (LALB1_HORSE)	14,2139	17,0%	3,57
7	P08896	Alpha-lactalbumin B/C (LALB2_HORSE)	14,2418	17,0%	3,57
21 г/100г продукта, измеренная концентрация белка в продукте					21,00

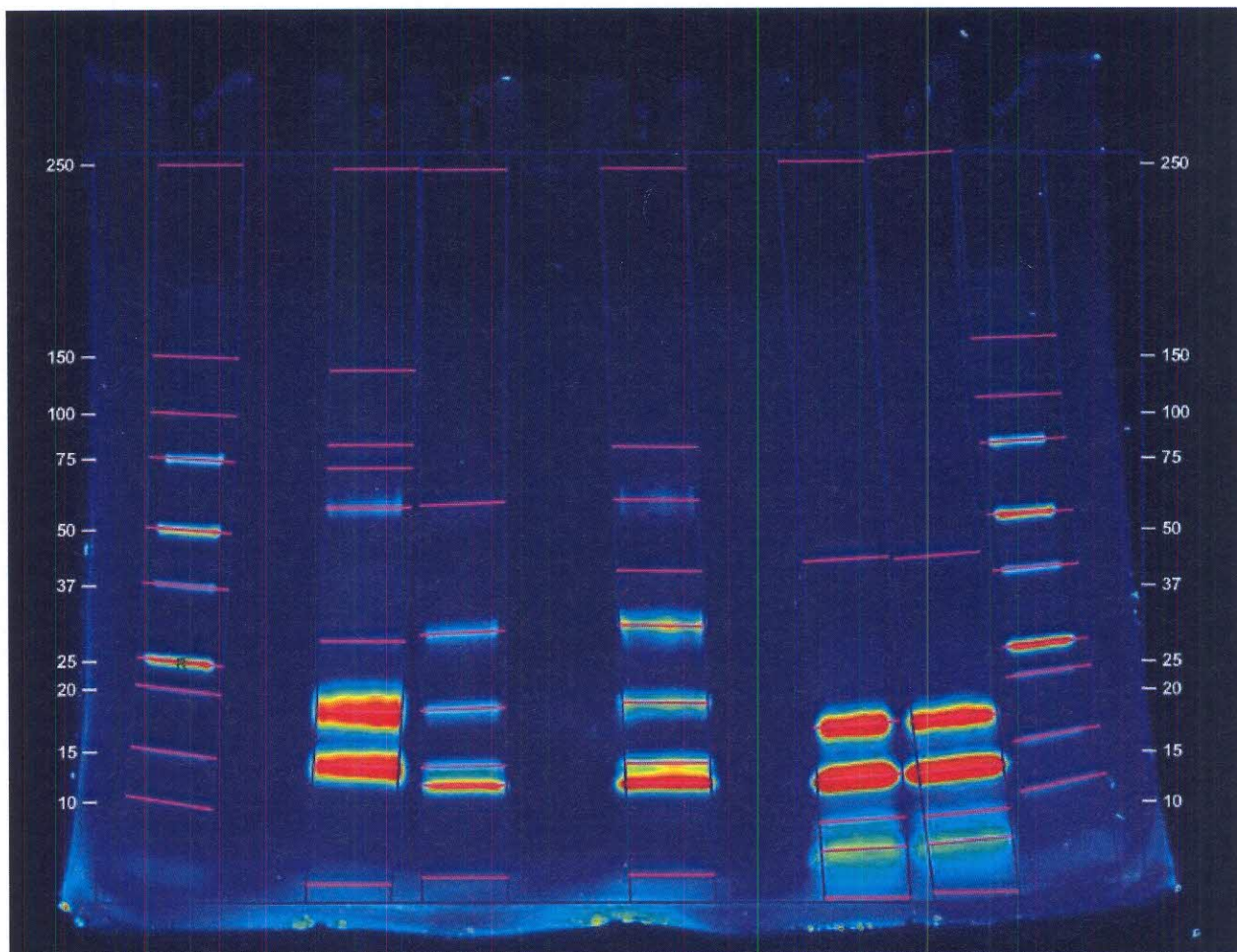
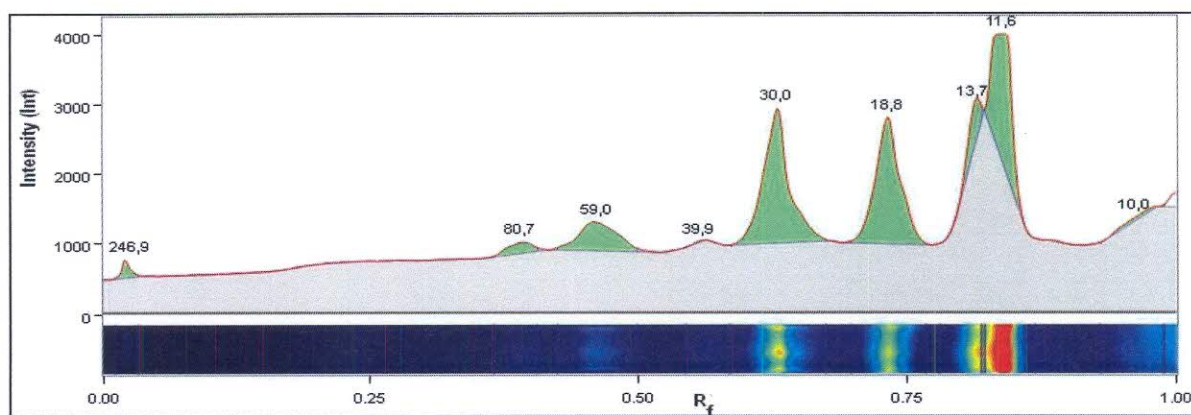


Рисунок 1. А1 и А2 – пробы альфа-лактоальбумина под номером 1, В – проба БСМ (белков сыворотки молока коровы) под номером 2, S – пробы лиофилизата белков молока кобылы, под номером 3 - пробы лиофилизата белков молока кобылы (S1/2 – разбавленная в 2 раза проба), маркер - Bio-Rad Precision Plus.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основываясь на результатах проведенных исследований, можно сделать заключение, что продукт Saumal Immune Care, представляющий собой сублимированное кобылье молоко, действительно является лиофилизатом не подвергавшемуся воздействию высоких температур. Данное утверждение доказывается сохранением структуры белков, входящих в его состав.

Установленное содержание белка соответствует количеству, заявленному производителем. По своим пищевым показателям данный продукт превосходит стандартизованное сухое коровье молоко.

Высокое содержание лактоферрина и лизоцима, 3% и 5% соответственно, позволяет рассматривать Saumal Immune Care как ценный пищевой продукт животного происхождения. Его потребление может быть рекомендовано детям, людям в период восстановления после перенесенных заболеваний и людям с ослабленным иммунитетом. Также он может быть рекомендован людям с непереносимостью коровьего молока.

Следует отметить, что лактоферрин в некоторых случаях может вызывать устойчивые аллергические и другие нежелательные реакции организма, поэтому применение данного продукта, особенно у детей, должно быть контролируемым. В случае их возникновения следует немедленно обратиться к врачу.

Saumal Immune Care не может рассматриваться как биологически активная добавка к пище, его следует относить к классу ценных пищевых продуктов животного происхождения.

Для подтверждения целесообразности включения Saumal Immune Care в лечебные столы питания спецконтингента необходимо проведение его клинической апробации с участием специалистов профильных медицинских отделений и врачей диетологов. Проведения доклинических исследований эффективности и безопасности Saumal Immune Care не требуется.