

УДК 577.34:543.42

**КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА НАТИВНОГО СОСТОЯНИЯ БЕЛКА
СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ: ВАЛИДАЦИЯ НА МОДЕЛИ
ОВАЛЬБУМИНА ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ**

Н.Д. Донец, студент

Научный руководитель – **Н.Н. Рубан**, к.б.н., доцент
Полесский государственный университет

В современной фармацевтической биоиндустрии белковые препараты занимают значительную долю рынка. К ним относятся моноклональные антитела, инсулин, интерфероны, факторы свёртывания крови, ферменты и вакцины на основе рекомбинантных белков. Эффективность и безопасность таких препаратов напрямую зависят от сохранения нативной (природной) конформации белка.

В процессе производства, очистки, хранения и транспортировки белковые молекулы подвергаются различным стрессовым воздействиям: изменению температуры, механическим нагрузкам (встряхивание, перемешивание), заморозке и оттаиванию, контакту с гидрофобными поверхностями, воздействию света. Эти факторы могут вызывать частичную или полную денатурацию белка, а также образование агрегатов — от растворимых олигомеров до крупных нерастворимых конгломератов. Задача состояла в том, чтобы проверить, позволяет ли обычное УФ-измерение при разных длинах волн надёжно отличать нативный овальбумин от денатурированного при различных физических воздействиях.

Объект исследования выступил овальбумин куриного яйца, растворённый в фосфатном буфере (рН 7.4, 50 мМ) до концентрации 1.0 мг/мл. Образцы овальбумина тестировали в следующих режимах (таблица 1).

Таблица 1. – Режимы тестирования овальбумина

Воздействие	Режим
Контроль	22 °С
Тряска	10 мин при 22 °С
Нагрев 50 °С	10 мин
Нагрев 70 °С	5 и 10 мин
Медленная разморозка	24 часа при 4 °С
Быстрая разморозка	1 час при 22 °С

Оптическую плотность растворов овальбумина измеряли в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см.

Индекс агрегации (IA) показывает долю светорассеяния относительно общего белкового сигнала. Чем выше значение IA, тем больше в образце агрегированного белка.

$$IA = \frac{A_{350}}{A_{280}}$$

Коэффициент нативности (N) выражает степень сохранения нативной структуры белка в процентах относительно лучшего (наименее агрегированного) образца в серии. Значения, близкие к 100%, соответствуют нативному состоянию, низкие значения — денатурации и агрегации.

$$N = \frac{IA_{min}}{IA_{sample}} \times 100\%$$

где:

- IA_{sample} — индекс агрегации исследуемого образца;
- IA_{min} — минимальное значение индекса агрегации среди всех образцов.

Результаты измерений оптической плотности при 280 и 350 нм для всех образцов приведены в таблице 2.

Таблица 2. – Значения A280 и A350 для овальбумина после различных воздействий

Условие	A280	A350
Контроль	0,1039	0,0074
Тряска	0,1080	0,0087
50°С	0,1112	0,0940
70°С (5 мин)	0,3600	0,1507
70°С (10 мин)	0,5826	0,3376
Быстрая разморозка	0,1400	0,0094
Медленная разморозка	0,1097	0,0080

Примечание – Увеличение A280 при нагревании до 70°С связано не с ростом концентрации белка, а со светорассеянием на крупных агрегатах, которое частично регистрируется и на длине волны 280 нм.

На основе измеренных значений A280 и A350 рассчитали индекс агрегации и коэффициент нативности. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 3. – Индекс агрегации и коэффициент нативности овальбумина после различных воздействий

Условие	IA	N
Контроль	0,0671	100
Медленная разморозка	0,0712	94
Быстрая разморозка	0,0729	92
Тряска	0,0806	83
50°C (10 мин)	0,4186	16
70°C(5 мин)	0,5794	12
70°C (10 мин)	0,8456	7,9

Полученные данные позволяют предложить следующие критерии для оценки состояния белка по коэффициенту нативности N:

- N > 80% — белок сохраняет нативную структуру (контроль, оба типа заморозки, тряска);
- N < 20% — нативная структура полностью утрачена (нагрев при 50°C и 70°C).

Промежуточных значений (N от 20% до 80%) в данном эксперименте не зафиксировано, что делает критерий удобным для бинарной классификации «годен / брак».

Список использованных источников

1. Ленинджер А. Л. Основы биохимии : в 3 т. — М. : Мир, 2015.
2. Ткачук В. А. Биохимия : учебник. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2019.
3. Коровкин Б. Ф., Кузнецов В. В. Биохимические методы исследования. – М. : Медицина, 2005.