

THE USE OF TOOLS DENSITOMETRY IN THE QUANTITATIVE COMPUTATIONS OF PROTEIN FRACTIONS

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНСТРУМЕНТОВ ДЕНСИТОМЕТРИИ ПРИ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ОБСЧЕТАХ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ

Vostrikova N.L.

V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Ключевые слова: денситометрия, биоинформатика, протеомика, белки, базы данных, двумерный электрофорез, фракции белков.

Keywords: densitometry, bioinformatics, proteomics, protein database, two-dimensional electrophoresis, protein fractions.

Аннотация

При исследовании протеомных профилей белков, многие ученые останавливаются на этапе получения итоговых данных эксперимента в виде картины гелей, не представляя возможности и перспективы применения современных компьютерных и биоинформационных ресурсов, позволяющих перевести результат из качественного в количественный. Использование компьютерных технологий позволило осуществить не только сохранение записанных изображений, но и обеспечить выполнение расчетов хроматограмм на базе цифрового видеоизображения хроматограммы.

Отличительными чертами денситометрии с использованием видео технологий являются, высокая скорость расчетов, низкая стоимость расходных материалов.

Заархивированные хроматограммы в электронном виде можно использовать, в том числе и для расчетов, в любое время.

Таким образом, проведенный «ручной» биоинформационный анализ позволяет не только использовать различные программные обеспечения денситометров для перевода и сохранения гелей в электронный вид, но и количественно интерпретировать полученные результаты.

В данной работе представлены методы практического применения элементов биоинформатики при интерпретации результатов белковых профилей, полученных одномерным и двумерным электрофорезом, переведенные в электронно-цифровое изображение. Рассмотрены аспекты количественной интерпретации электрофореграмм, как одномерного электрофореза (1ДЕ), так и двумерного электрофореза (2ДЕ) полученных в результате исследования мышечной ткани сельскохозяйственных животных. Приведены примеры использования различных программ обчислений. Выполнение работ в данном направлении позволит значительно расширить подходы к идентификации и количественному определению белковых маркеров качества, функциональности и безопасности продовольственного сырья и готового продукта в целом, а также провести метрологическую экспертизу получаемых результатов для подтверждения заявленного соответствия продукта.

Abstract

In the study of proteomic profiles of proteins, many scientists stop at the stage of obtaining the final data of the experiment in the form of gels. They have got no information on the possibilities and prospects concerning the application of modern computer and bioinformatics resources that allow to convert the result from qualitative to quantitative form. The use of computer technology allowed to save the recorded images and carry out the calculations with chromatograms using digital video images.

Densitometry with the use of video technology is characterized by high calculation speed and low cost of consumables. Digitally archived chromatograms may be used at any time for a number of applications including calculation.

Thus, the “manual” bioinformatics analysis allows not only to use different densitometer software for conversion and storage of gels in digital form, but also to quantitatively interpret the results obtained.

This paper presents the methods for practical application of bioinformatics tools in the interpretation of protein profiles obtained by one-dimensional and two-dimensional electrophoresis and converted into digital image. The aspects of the quantitative interpretation of electrophoretograms from one-dimensional electrophoresis (1DE) and two-dimensional electrophoresis (2DE) resulting from the studies of muscle tissue of farm animals are reviewed. Examples of various calculation software usage are given. The work in this direction will allow to considerably expand approaches for identification and quantification of protein markers related to quality, functionality and safety of food raw materials and finished products and to carry out metrological examination of the results for confirmation of product compliance.

Введение

Электрофоретические методы исследований белковых профилей являются актуальными т.к. являются наиболее широко используемым инструментом разделения белков. Наиболее информативным

Introduction

Electrophoretic methods for studying protein profiles are relevant because they are the most widely used tools for protein separation. The most informative method is

служит метод 2 ДЕ и особенно полезным при идентификации, где сравнительный анализ является сутью исследования. Сравнительный анализ изменений белка дает информацию и может применяться в исследованиях как биомаркер при идентификации различных технологических изменений и воздействий на продукт. Кроме того, техника 2 ДЕ набирает популярность благодаря возможности связывания ее с многочисленными аналитическими приемами и методами биоинформатики. Так как, конечной целью протеомики является генерация белковых профилей, их сравнение и выявление различия между ними [1], изучение протеома может быть достаточно успешным, благодаря применению различного аналитического оборудования высокого разрешения и методов биоинформатики.

Биоинформатика, как новая формирующаяся дисциплина, сочетает математику, информатику и биологию и помогает ответить на различные вопросы. Главными задачами, которой является анализ и интерпретация биологических данных с помощью различных программных средств и алгоритмов, в настоящей работе это применение элементов денситометрии на практике.

Последним этапом электрофорезного анализа белков является архивация геля, определение специфических белков и/или измерение количества белка или идентификация полученных результатов по базам данных. Архивирование гелей осуществляется путем создания цифрового изображения (скан или фото) с помощью сканеров, цифровых камер или лазерных денситометров.

Анализ полученных пятен проводится с использованием биоинформатических решений — специализированных программ, например PDQuest (Био-Рад, Геркулес, Калифорния, США), ImageMaster 2D и DeCyder (GE Healthcare, Chalfont, Бакс, Великобритания), или Dymension (Syngen, Кембридж, Великобритания). Эти программы, среди прочих функций, выполняют профилирование белков, идентификацию пятен, нормализацию данных и статистический анализ.

Стоит отметить, что инструменты биоинформатики постоянно улучшаются и расширяются. Данные электрофоретического анализа содержатся в базах данных (хранилищах), наиболее распространенным из которых является -World-2DPAGE Repository. Идентификация специфических белков осуществляется методом точечного анализа желаемого белка [2, 3].

Эффективный поиск по базе данных требует эффективных алгоритмов в компьютерных программах. Самыми популярными на Западе являются программы Mascot, Sequest, Tandem, MS-Blast и Peak.

Интерпретация анализируемых белков очень трудоемка. В комплексной матрице, такой как мы-

2DE; it is particularly useful in identification, where the purpose of the study is comparative analysis. Comparative analysis of protein changes provides information and may be used in studies as biomarker in identification of various technological changes and effects on a product. In addition, 2DE technique is gaining popularity due to the possibility of linking it with numerous analytical techniques and methods in bioinformatics. Since the ultimate goal of proteomics is generation, comparison and identification of differences between protein profiles [1], the proteome studies can be quite successful due to the use of various high-resolution analytical equipment and bioinformatics methods.

Bioinformatics, as a new emerging discipline, combines mathematics, computer science, and biology and helps to answer various questions. The main tasks of bioinformatics are the analysis and interpretation of biological data with the help of various software tools and algorithms. In this paper, the application of densitometry tools in practice is described.

The final stage of electrophoresis analysis of proteins is gel archiving, determination of specific proteins and/or measurement of the protein level or identification of proteins using the databases. Gel archiving is carried out by creating digital image (scan or photo) using scanners, digital cameras or laser densitometers.

The analysis of spots is carried out using bioinformatic tools, which are specialized software, such as PDQuest (Bio-Rad, Hercules, California, USA), ImageMaster 2D and DeCyder (GE Healthcare, Chalfont, Bucks, UK), or Dymension (Syngen, Cambridge, UK). This software, among other functions, performs protein profiling, spot identification, data normalization and statistical analysis.

It should be noted that bioinformatics tools are constantly improved and expanding. The data of the electrophoretic analysis are contained in databases; the most common one is World-2DPAGE Repository. Identification of specific proteins is carried out by point-counter analysis of the desired protein [2, 3].

Effective database search requires efficient algorithms in computer software. In the West, the most popular software programs are Mascot, Sequest, Tandem, MS-Blast and Peak.

Interpretation of analyzed proteins is very labour-consuming. In a complex matrix, such as animal muscle tissue,

шечная ткань животного, находится: смесь сотен белков и тысячи масс-спектров, проанализировать такое достаточно длительный и трудоемкий процесс [4].

Биотехнологические базы данных содержат дополнительную информацию о белках, например краткое описание их функций (если известно), заметки об отдельных характеристиках аминокислотной последовательности (например, возможность модификации), ожидаемые вторичная и третичная структура и ссылки [5]. Детальный анализ образцов биологического происхождения, таких как белки, требует использования тщательно подобранной технологии.

Развитие современной науки немыслимо без использования информационных технологий (ИТ). Биология как одна из наиболее стремительно развивающихся естественных наук является ярким тому примером. Благодаря внедрению ИТ в биологию возможности исследований в данной области были значительно расширены. Так, разработка соответствующих пакетов программ позволяет частично или полностью автоматизировать процессы выделения биологического материала: клеток, субклеточных фракций, органелл, молекулярных комплексов и даже молекул; очистки полученного материала, анализа различных физико-химических свойств и биологической активности различных веществ и т.д. Это, в свою очередь, экономит время исследователя, следовательно, значительно повышает эффективность работы конкретного сотрудника. Также в большой степени снижается вероятность ошибок и неточностей, связанных с погрешностями при ручной работе. Кроме того, компьютерное оснащение различных биологических исследований позволяет не только накапливать и хранить данные в удобном для исследователя виде в памяти компьютера, но и при необходимости с лёгкостью осуществлять математическую обработку полученных данных, сравнивать влияние различных условий эксперимента на получаемые результаты и на основе этого корректировать проведение исследования.

Среди огромного количества аналитических методов, наиболее широко применяемых в биохимии, особую роль играют спектрофотометрические (СФ) методы. Данная группа методов позволяет решать многочисленные задачи, которые ставит перед собой исследователь в области биохимии, обладает несомненными преимуществами перед другими аналогичными методами. На основании опыта многих авторов по применению данной группы методов в повседневной практике, были внесены некоторые предложения по использованию ИТ в спектроскопии, которые, несомненно, будут полезны исследователям [6].

there is a mixture of hundreds of proteins and thousands of mass spectra, which analysis is long and labour-consuming process [4].

Biotechnology databases contain additional information about proteins, for example a brief description of their functions (if known), notes about individual characteristics of the amino acid sequence (e.g. the possibility of modification), the expected secondary and tertiary structure, and references [5]. A detailed analysis of biological samples, such as proteins, requires the use of properly selected technology.

The development of modern science is impossible without the use of information technology (IT). Biology, as one of the most rapidly developing natural sciences, is an example. Due to the introduction of IT in biology, research opportunities in this field have been significantly expanded. Thus, the development of appropriate software packages makes it possible to partially or fully automate the processes of biological material isolation (cells, subcellular fractions, organelles, molecular complexes and even molecules), purify the obtained material, analyze various physical and chemical properties and biological activity of various substances, etc. This, in turn, saves the researcher's time and, therefore, significantly increases work efficiency of particular employee. Also, the probability of errors and inaccuracies associated with manual work is greatly reduced. In addition, the computer equipment in various biological studies allows not only to store the data in computer memory in a form convenient for researcher, but also easily perform mathematical processing of the obtained data, compare the influence of various experimental conditions on the results and adjust research design on the basis of this information.

Among huge number of analytical methods most widely used in biochemistry, a special role is played by spectrophotometry. This group of methods makes it possible to solve numerous problems that researcher sets before himself in the field of biochemistry, and has advantages over other similar methods. Based on the experience of many authors concerning the application of this group of methods in everyday practice, some suggestions were made on the use of IT in spectroscopy, which will be useful for researchers [6].

Компьютерное моделирование молекулярно-генетических и биохимических процессов является самым молодым и перспективным направлением в развитии биомедицинских наук. В данной области знаний продолжается дифференциация наук по предмету и объекту исследований. Компьютерным моделированием молекулярно-генетических и смежных процессов занимаются такие науки как биоинформатика, системная биология, геномика, эволюционная генетика, протеомика, транскриптомика, метаболомика и другие, еще более узкоспециализированные дисциплины, в каждой из которых работают тысячи и десятки тысяч исследователей. Такой высокий уровень дифференциации наук связан с колоссальной сложностью и огромным объемом молекулярно-генетических данных. Например, работа с последовательностью ДНК даже простейших эукариот — дрожжей *S. cerevisiae* — не была бы возможна без использования компьютерных методов, не говоря уже о геноме человека [7].

В качестве примера, в Табл. 1 представлены задачи, решаемые биоинформатикой.

Знание пространственной организации белковых молекул является ключом не только к пониманию их функций и механизма работы, но и основой для разработки эффективных и безопасных лекарственных средств. В то же время, определить структуру белков в прямом эксперименте не всегда возможно или целесообразно — из-за сложности, дороговизны и ограниченности возможностей экспериментальных методик. При этом можно подойти к решению данной проблемы иначе: структуру биомакромолекул можно «предсказать», используя теоретические подходы — основанные на физических или эмпирических приближениях.

Например, фармацевты и врачи заинтересованы в производстве и выпуске на рынок новых поколений лекарственных средств. При этом необходимо хорошо разбираться в молекулярных механизмах действия проектируемого лекарства, направленного, на взаимодействие с каким-нибудь белком (рецептором или ферментом) в человеческом организме. Проектирование нового лекарства с учётом атомарного строения молекул-«мишеней», на которые это лекарство будет действовать — наукоёмкий и сложный процесс, называемый драг-дизайном. Молекулярно-генетические данные хранятся в специализированных банках данных:

- крупнейшая база генетических данных — GeneBank;
- удобная в навигации база генетических последовательностей — Ensembl;
- удобный доступ к полным геномам через сайт Европейского института биоинформатики — <http://www.ebi.ac.uk/genomes/>;
- крупнейший банк данных о белках — UniProt.org;
- крупнейший банк данных о структуре биологических макромолекул <http://www.pdb.org/>.

Computer modeling of molecular-genetic and biochemical processes is the most recent and the most promising direction in the development of biomedical sciences. In this area of knowledge, the differentiation of sciences depending on the subject and the object of research still continues. Such computer science as bioinformatics, system biology, genomics, evolutionary genetics, proteomics, transcriptomics, metabolomics and other even more specialized disciplines employing thousands of researchers, are engaged in computer modeling of molecular-genetic and related processes. Such a high level of science differentiation is associated with high complexity and huge volume of molecular-genetic data. For example, work with the DNA sequence of the simplest eukaryote, *S. cerevisiae* yeast, would not have been possible without the use of computer methods, let alone the human genome [7].

As an example, Table 1 represents the tasks solved by bioinformatics.

Information on the spatial organization of protein molecules is the key to understanding their functions and mechanisms, and basis for the development of effective and safe medicines. At the same time, it is not always possible or appropriate to determine the structure of proteins in a direct experiment, because of the complexity, high cost and limitations of experimental techniques. But there is another approach to this problem: the structure of biomacromolecules may be «predicted» using theoretical approaches based on physical or empirical approximations.

For example, pharmacists and doctors are interested in the production and release of new generations of medicines. At the same time, it is necessary to understand the molecular mechanisms of developed drug targeted at the interaction with some protein (receptor or enzyme) in human body. The development of new drug taking into account the atomic structure of target molecules is a science-intensive and complex process called drug design. Molecular and genetic data are stored in specialized data banks:

- the largest database of genetic information — GeneBank;
- database of genetic sequences with convenient navigation — Ensembl;
- convenient access to complete genomes through the website of the European Institute of Bioinformatics — <http://www.ebi.ac.uk/genomes/>;
- the largest database of proteins — UniProt.org;
- the largest data bank on the structure of biological macromolecules — <http://www.pdb.org/>.

Table 1. Tasks in bioinformatics | Таблица 1. Задачи биоинформатики

Data source Источник данных	Data volume Объем данных	Tasks Задачи
Sequenced DNA Секвенированные последовательности ДНК	~ 40 million sequences, 10^{12} base pairs ~40 млн последовательностей, 10^{12} пар оснований	Functional annotation (determination of the nucleotide sequence of DNA fragment) Функциональная аннотация (определение нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК)
Protein sequences Белковые последовательности	~ $5.5 \cdot 10^6$ sequences (~300 amino acids each) ~ $5.5 \cdot 10^6$ последовательностей (~300 аминокислот каждая)	Comparative analysis. Identification of conservative motives (search for degenerate oligonucleotide sequences) Сравнительный анализ. Выявление консервативных мотивов (поиск вырожденных олигонуклеотидных последовательностей)
Structures of macromolecules Структуры макромолекул	50 000 structures (~ 3000 atomic coordinates each) 50000 структур (~3000 атомных координат каждая)	Prediction, alignment, geometry measurement, docking (molecular modeling) Предсказание, выравнивание, измерение геометрии, докинг (метод молекулярного моделирования)
Genomes Геномы	About 1200 genomes of prokaryotes, more than 160 genomes of eukaryotes Около 1200 геномов прокариот, более 160 геномов эукариот	Compilation of complete genomes; Functional annotation; Comparative analysis Сборка полных геномов; Функциональная аннотация; Сравнительный анализ
Expression of genes in various tissues, stages of development, states of the body, etc. Экспрессия генов в различных тканях, стадиях развития, состояний организма и т.д.	Hundreds of thousands of samples with thousands of measurement options for thousands of genes. ~ 1013 measurements Сотни тысяч образцов с тысячами вариантов измерений для десятков тысяч генов. ~1013 измерений	Analysis of regulation mechanisms of co-expressed genes. Relationship with sequences, structural and biochemical data Анализ механизмов регуляции коэкспрессирующихся генов. Связь с последовательностями, структурными и биохимическими данными
SNP (single nucleotide mutations in DNA) SNP (однонуклеотидные мутации в ДНК)	dbSNP database alone contains information on 108 mutations in 23 genomes Только одна база данных dbSNP содержит информацию о 108 мутациях в 23 геномах	Analysis of the relationship with diseases Анализ связи с заболеваниями
Molecular interactions, metabolic pathways and gene networks Молекулярные взаимодействия, метаболические пути и генные сети	More than 106 molecular interactions are described in publications. More than one hundred thousand metabolic pathways and gene networks are represented in databases Более 106 молекулярных взаимодействий описано в публикациях. Более ста тысяч метаболических путей и генных сетей представлено в базах данных	Modeling of molecular genetic processes and systems Моделирование молекулярно-генетических процессов и систем
Publications Публикации	Tens of millions of publications Десятки миллионов публикаций	Search and retrieval of knowledge Поиск и извлечение знаний

Есть программа Атом, Протеин-3Д, которую разработали в Санкт-Петербургском государственном электротехническом университете им. В.И. Ульянова и несколько сходных с ними. Такие программы позволяют изображать трехмерную модель белка, вращать ее, смотреть, как она выглядит, моделировать изменения в структуре белка, и смотреть, как при этом изменяется сама молекула. Компьютер используется при этом, как графическая станция, которая может показать, как выглядит молекула. Для компьютера задача непростая, но решаемая. А студентам, особенно биохимикам, очень интересно посмотреть на молекулу, представить, как она живет и функционирует. Хотя молекула в водном и в солевом растворах меняется, но эти программы позволяют показать даже такие процессы. Для построения этих молекул используются данные рентгеноструктурного анализа. А для машинного эксперимента можно использовать MS Excel, либо другие программы [6, 8].

There is Atom, Protein-3D software, which was developed in the Saint Petersburg Electrotechnical University «LETI», and several similar ones. Such software allows to represent a three-dimensional model of protein, rotate it, simulate changes in the structure of protein, and see how the molecule changes. The computer is used as a graphic station showing how the molecule looks, which is not simple, but solvable task. And for students, especially biochemists, it is very interesting to look at the molecule, to imagine how it lives and functions. The molecule varies in aqueous and in salt solutions, but this software can show even such changes. To build up these molecules, X-ray diffraction data are used. And for computer experiment, MS Excel or other software may be used [6, 8].

Таким образом, в большом выборе программной интерпретации полученных результатов исследователем, необходима (желательна) более наглядная картина представления данных эксперимента. Ниже рассмотрим примеры такой обработки и используемые при этом инструменты и программные продукты.

Так как, при исследовании электрофореграмм 1 ДЕ и 2 ДЕ, многие ученые останавливаются на этапе получения итоговых данных эксперимента в виде картины гелей, не имея порой представления о дальнейших перспективах использования современных компьютерных и биоинформационных ресурсов, позволяющих перевести результат из качественного в количественный. В данной работе представлены подходы и методы, позволяющие полученные белковые профили на геле, интерпретировать количественно. Выполнение работ в данном направлении позволит значительно расширить подходы к идентификации и количественному определению белковых маркеров качества, функциональности и безопасности продовольственного сырья и готового продукта в целом [9, 10].

Материалы и методы

Для более полного понимания применения ресурсов биоинформатики, а конкретно использование метода компьютерной денситометрии (обработки) для интерпретации полученного результата, рассмотрим общие подходы на примере исследования протеомного профиля белков мяса.

В качестве материалов используемых в работе использовали электрофореграммы 1 ДЕ.

Для выделения белковых соединений из исследуемых образцов, в микроцентрифужную пробирку отбирали ($50 \pm 0,05$) мг надосадочной жидкости экстракта пробы добавляли 50 мкл солюбилизирующего раствора (глицерин 10 %, β — меркаптоэтанол, 0,02 % бромфенол синий, трис-OH, SDS 2 %) и выдерживали в термостате при температуре 95 °C в течение 5 мин. Полученный раствор центрифугировали в центрифуге Eppendorf 5402R при 14000 об/мин в течение 8 мин. Надосадочную жидкость использовали для дальнейшего анализа.

Анализ фракционного состава белков исследуемых образцов анализировали методом денатурирующего электрофореза в 12,5 % полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с использованием электрофоретической камеры фирмы «Hellicon» «VE-10», при постоянной силе тока и напряжении 55 В и 130 В, в течение 2 часов. В качестве раствора стандартов использовали маркер, состоящий из 11 препаратов — стандартов с молекулярной массой 250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10 и 5 кДа (фирмы «Thermo», США), более детально приведено в [11].

Также использовали электрофореграммы 2 ДЕ.

Для экстракции белков брали по 300 мг тонко измельченной свинины смешивали с 4 мл экстракции

Thus, in a large choice of software interpretation of the results obtained by the researcher, more visualizable representation of the experimental data is needed (desirable). Hereafter, there are some examples of such processing, as well as the tools and software used.

When studying 1DE and 2DE electrophoretograms, many scientists stop at the stage of obtaining the final data of the experiment in the form of gels. They have got no information on the possibilities and prospects concerning the application of modern computer and bioinformatics resources that allow to convert the result from qualitative to quantitative form. This paper represents the approaches and methods that allow the obtained protein profiles to be interpreted quantitatively. The work in this direction will significantly expand the methods of identification and quantitative determination of protein markers related to quality, functionality and safety of food raw materials and finished products [9, 10].

Materials and methods

For more complete understanding of the application of bioinformatics resources, in particular the use of the computerized densitometry (processing) method for interpreting the result, we will consider the general approaches by the example of the protein profile of meat proteins.

In this work, 1DE electrophoretograms were used as the materials.

To isolate proteins from the test samples, $50 \pm 0,05$ mg of the supernatant of sample extract was transferred into a microcentrifuge tube, then 50 μ l of a solubilizing solution (glycerin 10 %, β -mercaptoethanol, 0.02 % bromophenol blue, tris-OH, SDS 2 %) was added and placed in thermostat at a temperature of 95 °C for 5 minutes. The resulting solution was centrifuged on Eppendorf 5402R centrifuge at 14,000 rpm for 8 minutes. The supernatant was used for further analysis.

Analysis of the fractional protein composition of the test samples was carried out by the method of denaturing electrophoresis in 12.5 % polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate using Hellicon VE-10 electrophoretic chamber, with a constant current and voltage of 55 V and 130 V, for 2 hours. A marker consisting of 11 preparations, i.e. standards with molecular weight of 250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10, and 5 kDa (Thermo, USA), was used as the standard solution; more details are given in [11].

2DE electrophoretograms were used also.

To extract the proteins, 300 mg of finely minced pork were mixed with 4 ml of extraction buffer (0.3 M KCl, 0.15

онного буферного раствора (0,3 моль KCl, 0,15 моль KH_2PO_4 и 0,15 моль KH_2PO_4 , pH 6,5) и хранили два часа при комнатной температуре при постоянном перемешивании путем встряхивания. Затем осуществляли центрифугирование в течение 60 минут при 40 °C и обороте вращения центрифуги 12000 об./мин. Из надосадочной жидкости брали 100 мкл, выпаривали в потоке азота при 39 °C и помещали в 100 мкл 6 молярного раствора мочевины. После восстановления дитиотреитолом (ДТТ) и алкилирования йодистым ацетамидом (IA) происходил процесс расщепления под действием трипсина в течение ночи при 37 °C при медленном перемешивании путем встряхивания. Затем пробы разбавляли деионизованной водой в соотношении 1:2 и обессоливали на колонке Strata-X (30 мг). Для этого брали 1 мл смеси, состоящей из 5 % метанола и 1 % муравьиной кислоты, и промывали водой. Элюирование пептидной смеси осуществлялась с применением 1 мл ацетонитрила/воды (90:10; 0,1 % муравьиной кислоты). Элюат помещали в пробирки типа Эппендорф с 5 мкл диметилсульфоксида (DMSO). В качестве основных протеомных технологий применяли двумерный электрофорез по O'Farrell с изоэлектрофокусированием в амфолиновом (IEF-PAGE) или иммобилиновом (IPG-PAGE) градиентах pH; последующую детекцию белков проводили окрашиванием Ку-масси R-250 и азотнокислым серебром, методология получения которых подробно расписана в [12, 13].

В качестве методов обработки полученных электрофореграмм, используют различные программы, интерпретирующие полученные результаты. Хочется сразу оговориться, что их разнообразное количество, от программ для построения белковых молекул до каких-либо прогностических моделей. Но нам было интереснее разобраться и подобрать наиболее информативную программу, которая отвечала бы на конкретные вопросы, на примере того, сколько и какого белка есть в моей пробе и как изменится он в результате какого-либо технологического воздействия.

Для сравнительной оценки и количественной интерпретации результатов экспериментов электрофореграмм в работе использовали следующее оборудование и программное обеспечение:

- сканер Epson Expression 1680. Сканирование проводили всегда во влажном состоянии. Далее полученные цифровые изображения редактировали в графическом редакторе из специализированного пакета программ MelanieImageMaster, версий 6 и 7 («Genebio», Швейцария). Данный вид обработки результатов исследований использовали в качестве интерпретации гелей двумерного электрофореза 2Д по O'Farrell с изоэлектрофокусированием в амфолиновом (IEF-PAGE) или иммобилиновом (IPG-PAGE) градиентах pH.
- систему гель-документирования Syngene с программным обеспечением GeneTools (для анализа

M KH_2PO_4 and 0.15 M KH_2PO_4 , pH 6.5) and stored for two hours at room temperature with constant stirring by shaking. Then, centrifugation was carried out for 60 minutes at 40 °C and centrifuge rotation of 12,000 rpm. Then 100 μl of supernatant was taken, evaporated in a stream of nitrogen at 39 °C and added into 100 μl of 6 M urea solution. After reduction with dithiothreitol (DTT) and alkylation with iodide acetamide (IA), degradation by trypsin were carried out overnight at 37 °C with slow stirring by shaking. The samples were then diluted with deionized water with 1:2 ratio and desalted in Strata-X column (30 mg). For this purpose, 1 ml of mixture consisting of 5 % methanol and 1 % formic acid was taken and washed with water. Peptide mixture elution was carried out using 1 ml of acetonitrile/water (90:10; 0.1 % formic acid). The eluate was placed in Eppendorf type tubes with 5 μl of dimethylsulfoxide (DMSO). Two-dimensional O'Farrell electrophoresis with isoelectrofocusing in ampholin (IEF-PAGE) or immobilin (IPG-PAGE) pH gradients was used as the main proteomic technology; the subsequent detection of proteins was carried out by Coomassie R-250 and silver nitrate staining; the methodology for preparation of these stains is detailed in [12, 13].

Different software for interpretation of the results was used as the methods for processing of received electrophoretograms. It should be noted that there are a variety of them, from programs for constructing protein molecules to prognostic models. But it was more interesting for us to find the most informative software that would answer specific questions, for example, how much and what protein is in my sample and how will it change as a result of some technological impact.

For comparative evaluation and quantitative interpretation of electrophoretograms, the following equipment and software were used in this work:

- Epson Expression 1680 scanner. Scanning was always carried out in a wet state. Then the resulting digital images were edited in a graphics editor from a specialized Melanie Image Master software package, versions 6 and 7 (Genebio, Switzerland). This type of results processing was used as an interpretation of O'Farrell 2D gel electrophoresis with isoelectrofocusing in ampholin (IEF-PAGE) or immobilin (IPG-PAGE) pH gradients.
- Syngene gel recording system with GeneTools software (for image analysis) was used for interpretation of 1DE electrophoretograms.

изображения), использовали в качестве интерпретации электрофореграмм 1 ДЕ.

- программное обеспечение Sorbfil TLC View, использовали в качестве интерпретации электрофореграмм 2ДЕ.

Обсуждение

Для проведения количественного анализа отдельных белковых фракций на электрофореграммах 2 ДЕ сначала создавали полные цифровые изображения отобранных для сравнения двумерных электрофореграмм (или их отдельных фрагментов) с помощью сканера Epson Expression 1680 (или Perfection 2450 Photo). Сканирование проводили во влажном состоянии.

Дальнейшая процедура проходит в несколько этапов. На первом этапе, проводился автоматический программный анализ гелей, в результате которого программа находит пятна и придает очертание по их окрашенной площади. Далее на втором этапе обработки изображений осуществляется сбор сведений о пятнах и построение трехмерных моделей на их основе. Анализ пятен проводили ещё по трем основным параметрам: интенсивность, площадь и объем пятна. Итоговые трехмерные модели представляют собой наборы пиков, при этом, чем больше интенсивность, тем выше пик, и тем больше концентрация белка в данной фракции. Высота пика берется из расчета 75 % от интенсивности пятна. Более детальные манипуляции по работе с данным программным обеспечением представлены в [9].

Ниже на Рис. 1 представлена последовательность обработки результатов разделения белков свинины методом двумерного электрофореза.

Несмотря на проведенную предварительную обработку изображений, программа иногда в отдельных участках изображения дает не совсем точные очертания пятна. Для устранения подобных недостатков форма отдельных пятен дополнительно корректируется вручную (Рис. 1Г).

Использование дополнительной ручной обработки отдельных участков изображений приводит к тому, что при построении общего синтетического изображения (карты) сильно увеличивался итоговый размер, что приходилось учитывать при последующем анализе.

Таким образом, для использования представленных видоспецифичных белковых биомаркеров при оценке количества и вида белка в мясном сырье и выработанных из него мясных продуктах успешно применимы методы компьютерной денситометрии, при этом можно вводить поправочные коэффициенты, учитывающий кратные различия исходного сырья по содержанию этого белка.

Наряду с вышеописанными приемами обработки электрофореграмм для интерпретации полученных результатов используют обработку гелей 1 ДЕ при помощи системы гель-документирования SYNGENE

— Sorbfil TLC View software, was used for interpretation of 2DE electrophoretograms.

Discussion

For the quantitative analysis of individual protein fractions on 2DE electrophoretograms, complete digital images of the two-dimensional electrophoretograms (or their individual fragments) selected for comparison were created first using Epson Expression 1680 scanner (or Perfection 2450 Photo scanner). Scanning was carried out in a wet state.

The further procedure was carried out in several stages. At the first stage, automatic program analysis of gels was conducted, as a result of which the software identified spots and made contour over their stained area. At the second stage of image processing, information on spots was collected, and three-dimensional models were constructed. The analysis of spots was carried out by three parameters: intensity, area and volume of the spot. The resulting three-dimensional models are sets of peaks; the higher the intensity, the greater the peak and the higher the protein concentration in this fraction. Peak height sets as 75 % of the spot intensity. More detailed information for work with this software are presented in [9].

Figure 1 shows the sequence for processing of the results of pork protein separation by the method of two-dimensional electrophoresis.

Despite pre-processing of images, in some image sections software sometimes gives not quite accurate outlines of the spot. To eliminate such drawbacks, the shape of individual spots is additionally corrected manually (Figure 1D).

The use of additional manual processing of individual image sections leads to the fact that the total synthetic image (map) greatly increase in total size, which had to be taken into account in the subsequent analysis.

Thus, when using species-specific protein biomarkers for estimating the amount and type of protein in meat raw materials and meat products derived from it, computerized densitometry methods are successfully applied, and correction factors may be introduced that take into account the differences in this protein content in raw materials.

In addition to procedures of electrophoretogram processing described above, the processing of 1DE gels by SYNGENE Bio Imaging gel recording system with Gene

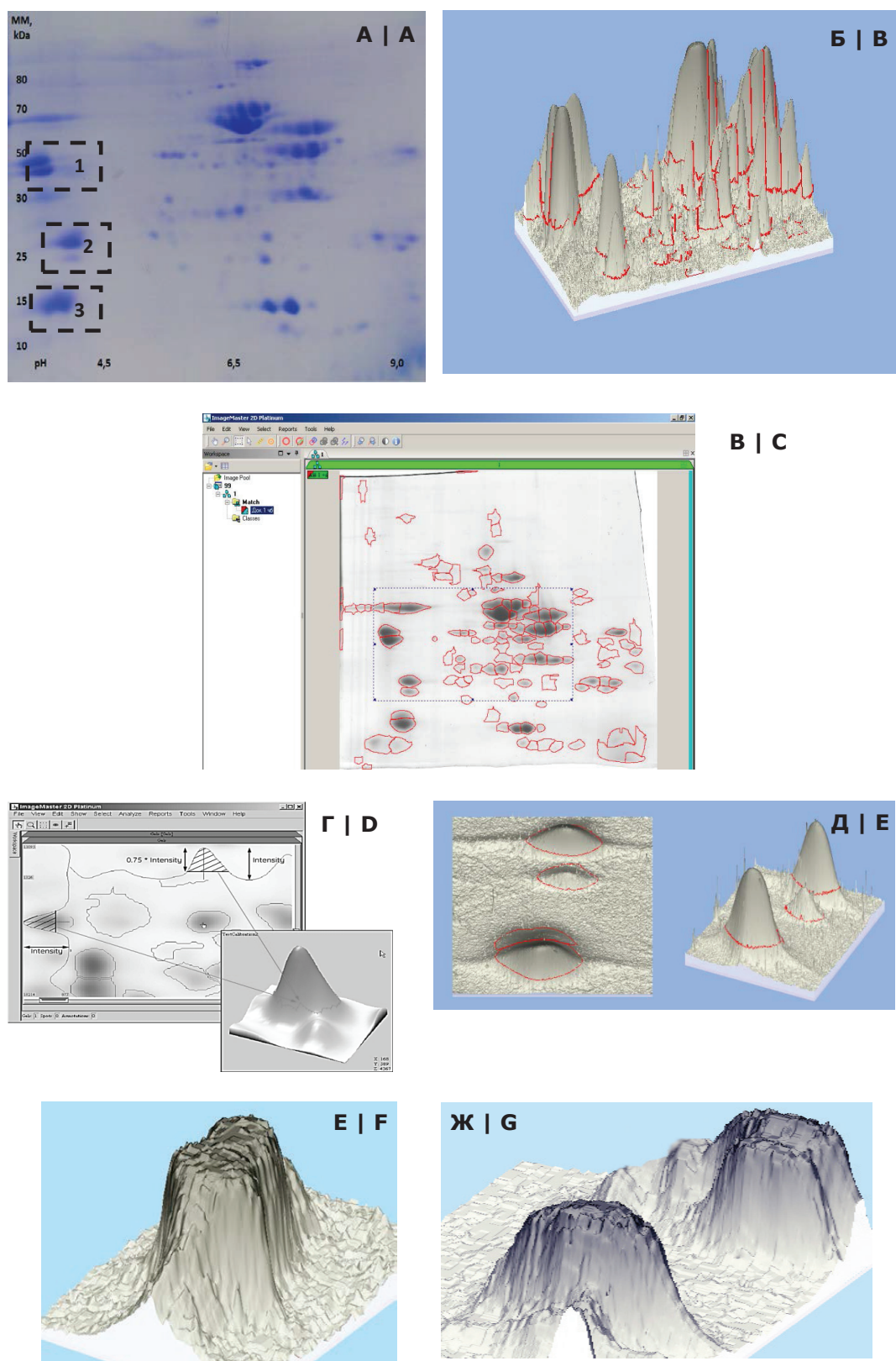


Figure 1. Graphical representation of the results of pork muscle protein studies: | Рис. 1. Графическое представление результатов исследований мышечных белков свинины:

A — electrophoretograms of muscle proteins obtained by 2DE method are indicated by dashed rectangles, α - and β -tropomyosins (1), myosin light chains MLC1 (2) and MLC2 (3) | A — электрофореграмма мышечных белков полученная методом 2ДЕ, выделены пунктирными прямоугольниками α - и β -тропомиозины (1), миозиновые легкие цепи 1 MLC (2) и MLC2 (3);

B — intermediate stage of image acquisition; | Б — промежуточный этап получения изображения;

C — processing of obtained images; | В — обработка полученных изображений;

D — manual processing of individual image sections; | Г — ручная обработка отдельных участков изображений;

E — correction results of manual image processing; | Д — результаты коррекции ручной обработки изображений;

F, G — the final result, three-dimensional models (hills) of protein and peptide fractions. | Е, Ж — итоговый результат — трехмерные модели (холмы) фракций белков и пептидов.

BioImaging systems с программным обеспечением Gene Tools (для анализа изображения) и Gene Sys. На Рис. 2 приведен пример последовательности обработки фотографий 1ДЕ мышечной ткани говядины в период автолиза.

Влажный гель полученный методом 1 ДЕ предварительно сканируют в камере денситометра, в результате получают фотографию геля (Рис. 2 А), изображение которой загружают в программу Gene Tools и дальнейшем проводят различного рода манипуляции. Программное обеспечение Gene Tools автоматически распознает треки (дорожки) и полосы на геле автоматически корректирует изгибы и искажения полос и треков, автоматически проводит базовую линию (Рис. 2 Б). При необходимости положение треков и базовой линии может быть задано и скорректировано вручную. Определение молекулярного веса по положению полосы и/или количественное определение по интенсивности могут быть проведены с использованием стандартов с одной или нескольких дорожек (дорожек). Gene Tools оснащено библиотекой мар-

Tools (image analysis) and GeneSys software is used to interpret the results obtained. Figure 2 shows an example of 1DE electrophoretogram processing sequence for beef muscle tissue during autolysis.

Wet gel obtained by 1DE method is pre-scanned in the densitometer chamber, a photo of gel (Figure 2A) is loaded into Gene Tools software and further various manipulations are performed. Gene Tools software automatically recognizes tracks and bands on gel, automatically corrects the bends and distortions of bands and tracks, and automatically traces the baseline (Figure 2B). If necessary, the position of tracks and baseline may be set and adjusted manually. Molecular weight determination from the position of the band and/or quantitative evaluation by intensity can be performed using standards from one or more tracks. Gene Tools is equipped with marker library for automatic or manual matching (the library may be supplemented by

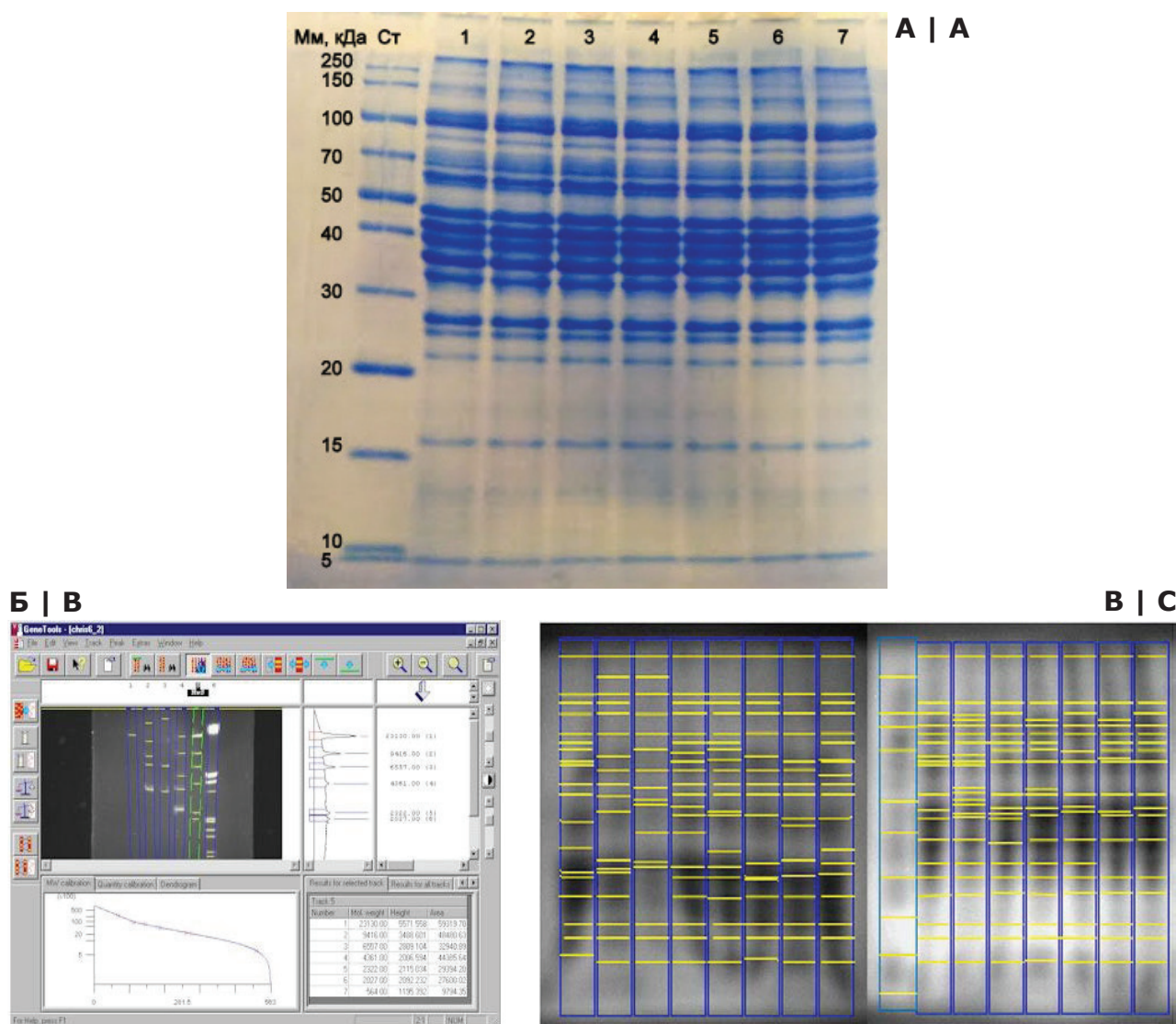


Figure 2. Scanned 1DE gels processed with SYNGENE Bio Imaging system

Рис. 2. Сканированные гели 1 ДЕ обработанные с помощью SYNGENE Bio Imaging systems

керов для автоматического или ручного сопоставления (библиотека может дополняться пользователем). Возможно использование единого трека в качестве стандарта для нескольких обрабатываемых областей. Все результаты (включая профили треков, количественные характеристики каждой полосы, пояснительные надписи для треков и многое другое) могут быть выведены на печать и/или выгружены в Word или Excel. Полученное изображение выводится на экран (основное поле), параллельно с «эскизами» текущего и предыдущего изображений (только что полученных или открытых из сохраненных ранее). Итоговое изображение сканирования представлено на Рис. 2 В, на котором желтым маркером автоматически прорисованы белковые полосы, при необходимости скорректированные в ручную.

Работая с полученным изображением, можно увеличить его, добавить пояснительную надпись, сохранить в различных форматах и/или распечатать, а также открыть в программе для обработки изображения GeneSys (Рис. 3). Все эти действия также можно проводить с изображениями, сохраненными ранее.

Пользователь имеет возможность сохранять не только сами изображения, но и конфигурации системы (параметры, использованные для получения изображения), что исключительно удобно для сложных в обработке объектов, и также аннотации, сделанные к полученному изображению.

При работе с GeneSys в автоматическом режиме (Autocapture) пользователю достаточно ввести информацию о том, с каким образцом необходимо работать (или загрузить эту информацию из сохраненных ранее конфигураций). Необходимо выбрать формат образца («sample format» — гель, блот или иное), тип образца («sample type» — например, белок, ДНК или РНК), тип матрицы («matrix type» — например, акриламидный или агарозный гель), метод детекции (колориметрическая, флуоресцентная, хемилюминесцентная). После выбора типа визуализируемого объекта в режиме «Autocapture» GeneSys предложит пользователю выбрать тип метки (флуорофора или видимого красителя) из базы данных. Возможен выбор как одного красителя (метки), так и нескольких (в случае мультиплексной детекции). База данных GeneSys содержит

user). It is possible to use a single track as a standard for several processed sections. All results (including track profiles, quantitative characteristics of each band, explanatory notes for tracks and much more) can be printed and/or uploaded to Word or Excel. The resulting image is displayed on the screen (main field) along with the thumbnails of current and previous images (just acquired or previously saved ones). The resulting scan image is shown in Figure 2C, where protein bands are automatically traced by yellow highlighter tool and may be adjusted manually, if necessary.

The resulting image may be enlarged, saved in various formats and printed out or opened in GeneSys image processing software, and explanatory note may be added (Figure 3). All these manipulations may be also carried out with images saved earlier.

The user is able to save not only images themselves, but also system configurations (parameters used to acquire the image), which is very convenient for complex objects, and also notes to the resulting image.

When working with GeneSys in automatic mode (Auto capture), the user just enters information about what sample is to work with (or download this information from the previously saved configurations). It is necessary to select the sample format (gel, blot or other), sample type (e.g. protein, DNA or RNA), matrix type (for example, acrylamide or agarose gel), detection method (colorimetric, fluorescent, chemiluminescent). After selecting the type of the object to be displayed in the «Auto capture» mode, GeneSys will prompt the user to select the type of label (fluorophore or visible stain) from database. A choice of one stain (label) and several stains (in the case of multiplex detection) is possible. The GeneSys database contains more



Figure 3. An example of calculation in GeneSys gel recording software of SYNGENE Bio Imaging system

Рис. 3 Пример обсчета в программе Gene Sys гель-документирования SYNGENE Bio Imaging systems

более 210 красителей и регулярно обновляется в соответствии с появляющимися на рынке новинками.

GeneSys содержит базу данных, объединяющую в себе необходимую информацию по широкому спектру экспериментальных задач (флуоресценция, хемилюминесценция и т.д.). Как только в режиме «Autocapture» пользователь обозначает, какой именно образец обрабатывается, GeneSys определяет наилучшую конфигурацию для захвата изображения и устанавливает рабочие параметры системы в соответствии с ней.

Такие установки как: контроль камеры и линз, освещение, время экспозиции, выбор фильтров подбираются в соответствии с характеристиками образца — в режиме «Autocapture» все контролируется GeneSys (при желании или необходимости даже в режиме «Autocapture» параметры получения изображения могут быть скорректированы вручную). Пользователю остается только оценить качество изображения (в режиме реального времени), нажать кнопку «capture» (захват изображения) и дождаться появления картинки.

При хемилюминесцентной детекции система автоматически учитывает свойства используемого субстрата и устанавливает наиболее подходящее именно для него время экспозиции. В процессе захвата изображения исходящий от блота сигнал непрерывно контролируется вплоть до получения наилучшего изображения.

При мультиплексной детекции GeneSys автоматически устанавливает наилучшие параметры системы (камера, освещение, фильтры) для работы с каждым красителем (меткой) по отдельности и фиксирует отдельные изображения, затем автоматически объединяя их и выводя на экран мультиплексное изображение.

В ручном режиме (Manual capture) все параметры системы (фокус, апертура диафрагмы, приближение, время экспозиции, выбор источника освещения, выбор фильтров и т.п.) устанавливаются пользователем. Просмотр изображения в режиме реального времени существенно упрощает эту процедуру.

Полученное изображение выводится на экран (основное поле), параллельно с «эскизами» текущего и предыдущего изображений (только что полученных или открытых из сохраненных ранее). «Иконки» внизу экрана позволяют вернуться на предыдущие этапы процесса получения изображения.

Таким образом, при интерпретации электрофореграмм 1ДЕ так же можно получить количественное содержание каждого выявленного белка, по интенсивности окраски полосы геля, принимая общее количество выявленных полос в треке за 100 %. При этом методология имеет априорные ограничения: различия физико-химических свойств отдельных пептидов напрямую влияют на возможность их детекции.

than 210 stains and is regularly updated in accordance with new products on the market.

GeneSys contains database that combines the necessary information on a wide range of experimental tasks (fluorescence, chemiluminescence, etc.). Once the user designates which sample is being processed in «Auto capture» mode, GeneSys determines the best configuration for capturing the image and sets system parameters according to this configuration.

Such settings as camera and lens control, lighting, exposure time, the choice of filters, etc. are selected in accordance with sample characteristics. In «Auto capture» mode everything is controlled by GeneSys (if desired or necessary, image acquisition parameters may be adjusted manually even in «Auto capture» mode). User can only evaluate image quality (in real time), press the «capture» button (image acquisition) and wait for the picture to appear.

In chemiluminescent detection, the system automatically takes into account the properties of the substrate used and sets the most appropriate exposure time. During image capture, the signal emitted from the blot is continuously monitored until the best image is obtained.

With multiplex detection, GeneSys automatically sets the best system parameters (camera, lighting, filters) for each stain (label) individually and captures individual images, and then automatically integrates them and displays multiplex image.

In «Manual capture» mode, all system parameters (focus, aperture, zoom, exposure time, light source selection, filter selection, etc.) are set by user. Viewing the image in real time significantly simplifies this procedure.

The resulting image is displayed on the screen (main field) along with the thumbnails of current and previous images (just acquired or previously saved ones). Icons at the bottom of the screen allow you to go back to previous stages of the image acquisition process.

Thus, when interpreting 1DE electrophoretograms, it is also possible to carry out quantitative evaluation of each detected protein by the color intensity of gel band, taking the total number of detected bands in the track as 100 %. However, the methodology has a priori limitations: differences in physical and chemical properties of individual peptides directly affect the possibility of their detection.

На следующем этапе нашей работы мы изучили использование одной из наиболее информативных и простой в применении программы компьютерной денситометрии — программы Sorbfil TLC View (Имид, Россия) обработки электрофореграмм 1ДЕ.

Программа Sorbfil TLC View производит расчет видеоизображения пластины с построением хроматограммы (графика аналоговой кривой) на основании отклонения яркости пятен от яркости фона пластины с последующим нахождением пиков на этой кривой и расчетом их площади (количественным расчетом полученной хроматограммы). Размеры и яркость пятна (по отношению к фону пластины) пропорциональны количеству вещества в пятне.

Основные функциональные возможности программы Sorbfil TLC View:

- визуальная оценка цифрового изображения хроматограммы;
- расчет ориентировочного содержания анализируемых веществ в смеси (выраженного в процентах) по методу нормировки;
- расчет концентрации вещества в пробе, с использованием стандартов;
- обработка/сохранение цифровых изображений хроматограмм, записанных как в дневном, так и в ультрафиолетовом цвете;
- ручная/автоматическая расстановка треков;
- сглаживание при поиске треков;
- анализ цветового состава;
- определение отношения Сигнал/Шум;

— составление отчета результатов расчета состава веществ в смеси или концентрации веществ в пробе. Этапы работы в программе представлены на Рис. 4.

Расчет треков можно производить в любом порядке, но удобнее это делать последовательно, начиная с первого трека. Для расчета трек нужно выделить, щелкнув мышью по полю трека (выделенный трек очерчен границами, его номер показан красным цветом Рис. 4А).

Результаты расчета трека даются в окне «Расчет трека» в виде аналоговой кривой — хроматограммы — пики, которой соответствуют пятнам трека, выводится увеличенное изображение хроматограммы трека в координатах R_f — Яркость (где яркость равная 0 — яркость фона)(см. Рис. 4Б). При включении этой команды на экран выводится окно Трек содержащее результаты расчета трека: R_f , пробег пятна L , площадь пика S , отношение площади пика к сумме площадей всех пиков $\%S$, высота пика H , отношение высоты пика к сумме высот всех пиков $\%H$. Величины $\%S$ и $\%H$ характеризуют ориентировочное содержание веществ в смеси (весовые проценты), NTP — число теоретических тарелок, $uNTP$ — удельное число теоретических тарелок, As — асимметрию пика. В окне можно дать описание отдельных пиков и всего трека. На Рис. 4В представлена хроматограмма трека № 3, в правой части которого приведен расчет полученных пиков.

At the next stage of our work, we studied the use of one of the most informative and easy-to-use densitometry software — Sorbfil TLC View (Imid, Russia) for 1DE electrophoretogram processing.

Sorbfil TLC View software calculates the video image of the plate and constructs chromatogram (graph of the analog curve) based on the deviation of spot brightness from the plate background brightness followed by detection of peaks on this curve and calculation of their area (quantitative calculation of the chromatogram obtained). Dimensions and brightness of the spot (compared to the plate background) are proportional to the amount of substance in the spot.

The main functionality of Sorbfil TLC View software:

- visual assessment of the chromatogram digital image;
- calculation of the approximate content of analytes in mixture (expressed as a percentage) using the normalization method;
- calculation of substance concentration in the sample using standards;
- processing/storing digital images of chromatograms recorded both in visible and ultraviolet spectra;
- manual/automatic arrangement of tracks;
- anti-aliasing when searching for tracks;
- analysis of color composition;
- determination of signal-to-noise ratio;
- compilation of a report on the results of composition calculation for substances in the mixture or substance concentration in the sample.

The stages of software operation are presented in Figure 4.

Calculation of tracks may be done in any order, but it is more convenient to do this sequentially starting with the first one. To calculate the track, it must be selected by clicking on the track's field (the selected track is bordered, and its number is shown in red, Figure 4A).

The results of track calculation are presented in Track Calculation window in the form of analogue curve, chromatogram, which peaks correspond to track spots. Enlarged image of track chromatogram is displayed in brightness coordinates, R_f (where the brightness of background is equal to 0) (see Figure 4B). When this command is turned on, Track window containing the results of the track calculation is displayed: R_f , spot distance L , peak area S , peak area to total peaks area ratio $\%S$, peak height H , peak height to total peaks height ratio $\%H$. The values of $\%S$ and $\%H$ characterize the approximate content of the substances in mixture (weight percent), NTP is the number of theoretical plates, $uNTP$ is the specific number of theoretical plates, and As is peak asymmetry. In this window, you can give a description of individual peaks and the entire track. Figure 4C shows the chromatogram of track No. 3, on the right side of which the calculation of the obtained peaks is presented.

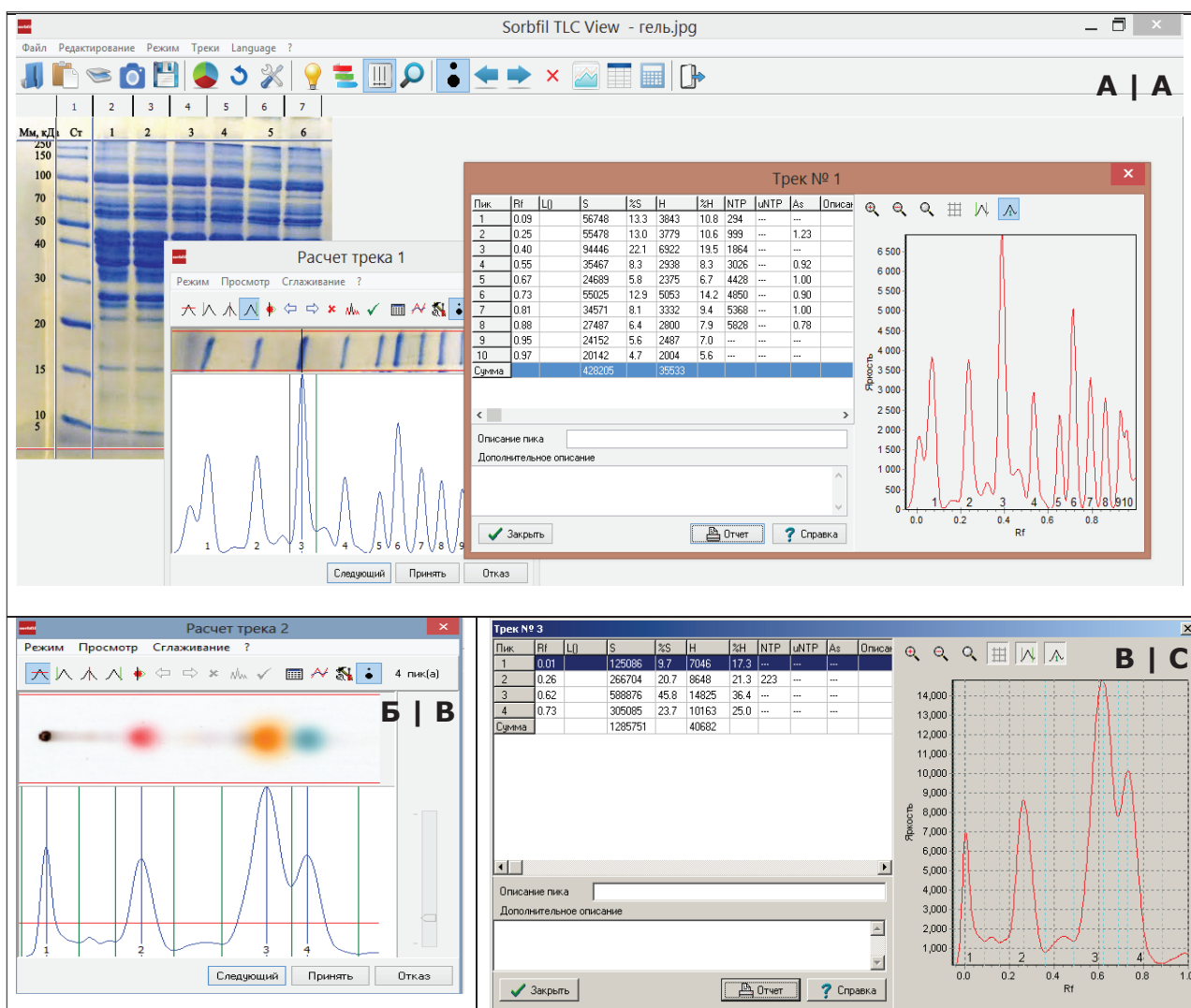


Figure 4. An example of quantitative interpretation of 1DE electrophoretograms

Рис. 4. Пример количественной интерпретации электрофореграмм 1ДЕ

Расчет содержания веществ в смеси: ориентировочный расчет содержания веществ в смеси, выраженный в процентах, производится методом нормировки. Этот метод основан на положении, что вещества, независимо от их строения, взятые в одинаковом количестве, дают одну и ту же площадь пика (это положение приблизительно выполняется для химически сходных веществ). Для определения ориентировочного содержания веществ в смеси находят выраженное в процентах отношение площади каждого отдельного пика (пятна) к сумме площадей всех пиков (пятен) в треке.

Расчет концентрации вещества в пробе: расчет производят методом абсолютной калибровки (путем построения градуировочного графика с применением внешнего стандарта).

Для расчета концентрации вещества в пробе по этому методу определяют абсолютное количество искомого вещества в пробе, а затем, зная вес (объем) исходной пробы, рассчитывают концентрацию вещества в пробе, как отношение веса вещества к весу (объему) пробы.

Calculation of the content of substances in mixture is an approximate calculation expressed as a percentage and performed by the normalization method. This method is based on the assumption that substances taken in the same amount, regardless of their structure, give the same peak area (this provision is approximately met for chemically similar substances). To determine the approximate content of substances in mixture, the ratio of each individual peak (spot) area to the sum of areas of all peaks (spots) in the track expressed as a percentage must be calculated.

Calculation of substance concentration in the sample: the calculation is made by the absolute calibration method (by calibration curve construction using an external standard).

To calculate substance concentration in the sample by this method, the absolute amount of substance in the sample is determined and then, knowing the weight (volume) of initial sample, substance concentration in the sample is calculated as the ratio of substance weight to sample weight (volume).

Определение абсолютного количества вещества в пробе производится для рассчитанной площади пятна вещества в пробе по калибровочному графику зависимости количества вещества — площадь пика. Этот график строится для известных количеств вещества (стандартов).

Все описанные выше расчеты выполняются компьютером в автоматическом режиме на основе обсчета изображения хроматограммы.

Заключение

Для развития биохимии белков в начале XXI века принципиальное значение приобрело широкое применение протеомных биоинформационных технологий [14, 15, 16]. Накапливающиеся результаты, представляющие собой совокупности взаимосвязанных сведений, подлежащих совместной обработке, рассматриваются как соответствующие информационные массивы, на основе которых формируются различные общие и специализированные базы данных, размещаемые в сети Интернет [17]. При исследовании протеомных профилей белков, многие ученые останавливаются на этапе получения двумерных электрофореграмм, не имея порой даже представления о дальнейших перспективах использования современных инструментальных и биоинформационных ресурсов, позволяющих подтвердить или опровергнуть их гипотезы, а порой просто идентифицировать [8, 18]. В данной работе предпринята попытка представления результата протеомных исследований от получения профиля белков на геле, до конкретной интерпретации полученного результата.

Видеосистемы в значительной мере вытеснили обычную фотографию как средство регистрации и архивирования различных объектов, в том числе и в протеомике. Использование компьютерных технологий позволило осуществить не только сохранение записанных изображений, но и выполнение расчетов хроматограммы на базе цифрового видеоизображения хроматограммы.

Отличительными чертами денситометрии с использованием видео технологий являются, скорость расчетов, низкая стоимость расходных материалов и сохраненные в электронном виде хроматограммы могут быть использованы, в том числе и для расчетов, в любое время.

Таким образом, проведенный «ручной» биоинформационный анализ позволяет нам не только использовать различные программные обеспечения денситометров для перевода и сохранения гелей 1 ДЕ и 2 ДЕ в электронный вид, но и количественно интерпретировать полученные результаты.

К настоящему времени результаты, ранее выполненных протеомных исследований мышц сельскохозяйственных животных, открывшие путь к созданию высокочувствительных технологий контроля

Determination of substance absolute amount in the sample is made for the calculated area of the substance spot in the sample using calibration curve of the substance amount against peak area. This graph is constructed for known quantities of the substance (standards).

All the calculations described above are performed by the computer in automatic mode on the basis of the chromatogram image calculation.

Conclusion

For the development of protein biochemistry in the beginning of the 21st century, the widespread use of proteomic bioinformatics technologies has become of fundamental importance [14, 15, 16]. The results are accumulated, i.e. aggregates of interrelated information subject to joint processing, that are considered the information arrays, on the basis of which various general and specialized Internet databases are formed [17]. In the study of proteomic profiles, many scientists stop at the stage of obtaining the final data of the experiment in the form of gels. They have got no information on the possibilities and prospects concerning the application of modern computer and bioinformatics resources that allow to confirm or disprove their hypotheses and sometimes simply identify [8, 18]. In this paper, an attempt was made to represent the results of proteomic studies from protein profile obtaining in gel to specific interpretation of the data obtained.

Video systems have almost replaced conventional photography as a tool for recording and archiving various objects, for example in proteomics. The use of computer technology allows not only to store recorded images, but also to perform chromatogram calculations based on the digital video image of the chromatogram.

Densitometry with the use of video technology is characterized by high calculation speed, and low cost of consumables. Digitally archived chromatograms may be used at any time for a number of applications including calculation.

Thus, the «manual» bioinformatics analysis allows not only to use different densitometer software for conversion and storage of 1DE and 2DE gels in digital form, but also to quantitatively interpret the obtained results.

To date, the results of previous proteomic studies of farm animal muscles, which opened the way to creation of highly sensitive technologies for quality monitoring of

качества мясных продуктов питания на основе анализов видоспецифических изоформ ряда мышечных белков [7, 12, 19, 20], имеют реальный шанс перейти из разряда качественных состав в количественное содержание.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Westermeier, R. *Proteomics in Practice: A Guide to Successful Experimental Design* / R. Westermeier, T. Naven, H.R. Hopker // Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.—2008. — P. 1–8.
2. Westermeier, R. *Proteomics in Practice: A Guide to Successful Experimental Design* / R. Westermeier, T. Naven, H.R. Hopker // Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. — 2008. — P. 15–19.
3. Zheng, C.Y. Native PAGE eliminates the problem of PEG-SDS interaction in SDS-PAGE and provides an alternative to HPLC in characterization of protein PEGylation / C.Y. Zheng, G. Ma, Z. Su // *Electrophoresis*. — 2007. — № 28. — P. 2801–2807.
4. Xu, C. Software for computational peptide identification from MS-MS data / C. Xu, B. Ma. // *Drug Discovery Today*. — 2006. — Vol. 11. — № 13/14. — P. 595–600.
5. Righetti, P.G. The Proteome Revisited Theory and Practice of all Relevant Electrophoretic Steps / P.G. Righetti, A. Stoyanov, M.Y. Zhukov // *Journal of Chromatography Library*. — 2001. — Volume 63. — Pages V–VII.
6. Сборник методических указаний для обучающихся к практическим занятиям по дисциплине «Медицинская информатика» для специальности 060101 — Лечебное дело (очная форма обучения) / сост. Е. И. Кичигина, [и др.]. — Красноярск: тип. КрасГМУ, 2012. — 385 с.
7. Shishkin, S.S. *Proteomic Approaches for the Study of Transgelins as Tumor-associated Proteins and Potential Biomarkers* / S.S. Shishkin, M.A. Kovaleva, L.S. Eryomina, K.V. Lisitskaya, L.I. Kovalev // *Current Proteomics*.— 2013. — Vol. 10.— № 2. — P. 165–178.
8. Интервью с А. Ю. Лянгузовым, Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, преподавателем кафедры биохимии биолого-почвенного факультета СПбГУ [Электронный ресурс: URL: http://old.ci.ru/inform23_02/p_22.htm/. Дата обращения: 26.09.2017]
9. Вострикова Н.Л., Чернуха И.М. Биоинформатика — инструмент интерпретации протеомных профилей белков мяса. Теория и практика переработки мяса. 2017;2(1):4–17. DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-1-4-17
10. Shishkin, S.S. The application of proteomic technologies for the analysis of muscle proteins of farm animals used in the meat industry (Review) / S.S. Shishkin, L.I. Kovalev, M.A. Kovaleva, A.V. Ivanov, L.S. Eremina, E.G. Sadykhov // *Applied Biochemistry and Microbiology*. — 2014. — Vol. 50. — № 5. — P. 421–432.
11. Определение белкового профиля говядины в ходе автолиза / Д.А. Афанасьев, А.Г. Ахремко, И.М. Чернуха, Н.Г. Машенцева // Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова. М.: ВНИИМП. — 2016. — С. 39.
12. Ковалев, Л.И. Протеомное изучение белков в образцах свинины и выработанных из нее мясных продуктах / Л.И. Ковалев, С.С. Шишкин, М.А. Ковалева, А.В. Иванов, Н.Л. Вострикова, И.М. Чернуха // *Все о мясе*. — 2013. — № 3. — С. 32–34.
13. Чернуха И.М., Федулова Л.В., Котенкова Е.А., Шишкин С.С., Ковалев Л.И. Влияние автолиза на протеомно-пептидный профиль сердечной мышцы и аорты *Bostaurus* и *Sus scrofa*. Теория и практика переработки мяса. 2016;1(2):4–9. DOI:10.21323/2414-438X-2016-1-2-4-9.
14. Picard, B. Recent advances in omic technologies for meat quality management / B. Picard, B. Lebret, I. Cassar-Malek, L. Li-aubet, C. Berri, B. Le Bihan-Duval, J.F. Hocquette, G. Renand // *Meat Science*. — 2015. — Vol. 109. — P. 18–26.
15. Zhang, R. Polymorphisms and expression analysis of SOX-6 in relation to porcine growth, carcass, and meat quality traits. / R. Zhang, C. Gross-Brinkhaus, H. Heidt, M.J. Uddin, M.U. Cinar, D. Tesfaye, E. Tholen, C. Looft, K. Schellander, C. Neuhoft // *Meat Science*. — 2015. — Vol. 107. — P. 26–32.
16. Lametsch, R. *Proteomics in Muscle-to-Meat Conversion* // *Proceedings of the American Meat Science Association 64th Reciprocal Meat Conference* (June 19–22 2011, Kansas State University Manhattan, Kansas).— 2012. — P. 19–23.

meat products based on species-specific isoform analyzes of various muscle proteins [7, 12, 19, 20], have a real chance to transform from the qualitative method to the quantitative one.

REFERENCES

1. Westermeier, R. *Proteomics in Practice: A Guide to Successful Experimental Design* / R. Westermeier, T. Naven, H.R. Hopker // Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.—2008. — P. 1–8.
2. Westermeier, R. *Proteomics in Practice: A Guide to Successful Experimental Design* / R. Westermeier, T. Naven, H.R. Hopker // Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. — 2008. — P. 15–19.
3. Zheng, C.Y. Native PAGE eliminates the problem of PEG-SDS interaction in SDS-PAGE and provides an alternative to HPLC in characterization of protein PEGylation / C.Y. Zheng, G. Ma, Z. Su // *Electrophoresis*. — 2007. — № 28. — P. 2801–2807.
4. Xu, C. Software for computational peptide identification from MS-MS data / C. Xu, B. Ma. // *Drug Discovery Today*. — 2006. — Vol. 11. — № 13/14. — P. 595–600.
5. Righetti, P.G. The Proteome Revisited Theory and Practice of all Relevant Electrophoretic Steps / P.G. Righetti, A. Stoyanov, M.Y. Zhukov // *Journal of Chromatography Library*. — 2001. — Volume 63. — Pages V–VII.
6. The collection of methodical instructions for students on practical training in “Medical Informatics” for the 060101-Medical case (full-time education) / comp. E. I. Kichigina, [and others]. — Krasnoyarsk: KrasGMUprintshop, 2012.— 385 P.
7. Shishkin, S.S. *Proteomic Approaches for the Study of Transgelins as Tumor-associated Proteins and Potential Biomarkers* / S.S. Shishkin, M.A. Kovaleva, L.S. Eryomina, K.V. Lisitskaya, L.I. Kovalev // *Current Proteomics*.— 2013. — Vol. 10.— № 2. — P. 165–178.
8. Interview with A.Y. Lyanguzov, State Research Institute of Extremely Clean Biopreparations, Lecturer of Biochemistry Department of Biology and Soil Faculty of St. Petersburg State University [Electronic source: URL: http://old.ci.ru/inform23_02/p_22.htm/. Access date: 26.09.2017]
9. Vostrikova N.L., Chernukha I.M. Bioinformatics as a tool for reinterpretation of proteomic profiles of meat protein. // *Theory and practice of meat processing*. 2017; — V 2. — No. 1. — P 4. DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-1-4-17
10. Shishkin, S.S. The application of proteomic technologies for the analysis of muscle proteins of farm animals used in the meat industry (Review) / S.S. Shishkin, L.I. Kovalev, M.A. Kovaleva, A.V. Ivanov, L.S. Eremina, E.G. Sadykhov // *Applied Biochemistry and Microbiology*.—2014. — Vol. 50.—№ 5. — P. 421–432.
11. Afanasiev D.A., Akhremko A.G., Chernukha I.M., Mashentseva N.G. Determination of the beef protein profile during autolysis // International scientific-practical conference dedicated to the memory of Vasily Matveevich Gorbatov. M.: VNIIMP.— 2016. — PP. 39.
12. Kovalev, L.I. Proteomic research of proteins in the samples of pork and pork products / L.I. Kovalev, S.S. Shishkin, M.A. Kovaleva, A.V. Ivanov, N.L. Vostrikova, I.M. Chernukha // *Vseomyase*.— 2013. — No. 3. — PP. 32–34.
13. Chernukha I.M., Fedulova L.V., Kotenkova E.A. et al. The Influence of autolysis on the protein-peptide profile of *Bos taurus* and *Sus scrofa* heart and aorta tissues // *Theory and practice of meat processing*. 2016;1(2):4–9. (In Russ.) DOI:10.21323/2414-438X-2016-1-2-4-9
14. Picard, B. Recent advances in omic technologies for meat quality management / B. Picard, B. Lebret, I. Cassar-Malek, L. Li-aubet, C. Berri, B. Le Bihan-Duval, J.F. Hocquette, G. Renand // *Meat Science*. — 2015. — Vol. 109. — P. 18–26.
15. Zhang, R. Polymorphisms and expression analysis of SOX-6 in relation to porcine growth, carcass, and meat quality traits. / R. Zhang, C. Gross-Brinkhaus, H. Heidt, M.J. Uddin, M.U. Cinar, D. Tesfaye, E. Tholen, C. Looft, K. Schellander, C. Neuhoft // *Meat Science*. — 2015. — Vol. 107. — P. 26–32.
16. Lametsch, R. *Proteomics in Muscle-to-Meat Conversion* // *Proceedings of the American Meat Science Association 64th Reciprocal Meat Conference* (June 19–22 2011, Kansas State University Manhattan, Kansas).— 2012. — P. 19–23.
17. UniProtKB/Swiss-Prot/SIB Swiss Institute of Bioinformatics

17. UniProtKB/Swiss-Prot/SIB Swiss Institute of Bioinformatics [Электронный ресурс: URL: http://web.expasy.org/docs/swiss-prot_guideline.html. Дата обращения: 18.07.2017]
18. Sun, H. Proteomic and bioinformatic analysis of differentially expressed proteins in denervated skeletal muscle / H. Sun, J. Qiu, Y. Chen, M. Yu, F. Ding, X. Gu, // International journal of molecular medicine.— 2014. — Vol. 33.— № 6. — P. 1586–1596.
19. Манюхин, Я.С. Изучение белков конины с помощью протеомных технологий/ Я.С. Манюхин, И.М. Чернуха, Л.И. Ковалев, А.В. Иванов, М.А. Ковалева, С.С. Шишкин // Все о мясе.— 2014.— № 3. — С. 20–25.
20. Moczowska, M. The effect of the packaging system and storage time on myofibrillar protein degradation and oxidation process in relation to beef tenderness./ M. Moczowska, A. Półtorak, M. Montowska, E. Pospiech, A. Wierzbicka // Meat Science.— 2017. — Vol. 130. — P. 7–15.

- ics [Electronic source: URL: http://web.expasy.org/docs/swiss-prot_guideline.html. Access date: 18.07.2017]
18. Sun, H. Proteomic and bioinformatic analysis of differentially expressed proteins in denervated skeletal muscle / H. Sun, J. Qiu, Y. Chen, M. Yu, F. Ding, X. Gu, // International journal of molecular medicine.— 2014. — Vol. 33.— № 6. — P. 1586–1596.
19. Manyukhin, Y.S. The study of horsemeat proteins by the use proteomic technologies/Y.S. Manyukhin, I.M. Chernukha, L.I. Kovalev, A.V. Ivanov, M.A. Kovaleva, S.S. Shishkin // Vse o myase. — 2014. — No. 3. — P. 20–25.
20. Moczowska, M. The effect of the packaging system and storage time on myofibrillar protein degradation and oxidation process in relation to beef tenderness./ M. Moczowska, A. Półtorak, M. Montowska, E. Pospiech, A. Wierzbicka // Meat Science.— 2017. — Vol. 130. — P. 7–15.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Вострикова Наталья Леонидовна — кандидат технических наук, заведующий лабораторией «Научно-методические работы, биологические и аналитические исследования», Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН. 109316, г. Москва, ул. Талалихина, д. 26
Тел.: +7-495-676-79-81
E-mail: nvostrikova@list.ru

Критерии авторства

Автор самостоятельно подготовил данную рукопись и несёт ответственность за плагиат

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 17.09.2017

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Vostrikova Natalia Leonidovna — candidate of technical sciences, head of «Scientific and methodical work, biological and analytical research» laboratory, V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences. 109316, Moscow, Talalikhina str., 26
Tel.: +7-495-676-79-81
E-mail: nvostrikova@list.ru

Contribution

The author independently prepared this manuscript and is responsible for plagiarism.

Conflict of interest

The author declare no conflict of interest.

Received 17.09.2017