

# RESEARCH METHODOLOGY OF SUS SCROFA TISSUE EXTRACTS PROTEIN-PEPTIDE COMPONENTS

## МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВО-ПЕПТИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ ЭКСТРАКТОВ ТКАНЕЙ SUS SCROFA

Vasilevskaya E.R., Kotenkova E.A., Lukinova E.A., Kalinova E.A.

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

**Ключевые слова:** белки, пептиды, экстракция, спектрофотометрия, метод Брэдфорд, метод Лоури, метод Кингслея — Вейксельбаума, биуретовая реакция.

**Keywords:** proteins, peptides, extraction, spectrophotometry, Bradford assay, Lowry's assay, Kingsley-Weixelbaum assay, biuret reaction.

### Аннотация

В данной статье приведены данные сравнительного анализа четырех методов количественной оценки содержания белково-пептидных комплексов в экстрактах, полученных на основе сырья животного происхождения, а также низкомолекулярных и высокомолекулярных фракциях экстракта: прямого спектрофотометрического определения при длинах волн 260 и 280 нм с последующим расчетом по формуле Калькара; биуретовой реакции по методу Кингслея — Вейксельбаума; с использованием реактива Брэдфорда и по стандартному методу Лоури. Анализ полученных экспериментальных данных показал, что в случае с экстрактом, содержащим белково-пептидные комплексы в различном диапазоне молекулярных масс наиболее качественно показывает концентрацию белка метод Кингслея-Вейксельбаума, при исследовании высокомолекулярной фракции (более 30 кДа) больше информации возможно получить при сочетании спектрофотометрического метода и также метода Кингслея-Вейксельбаума. Низкомолекулярные (менее 30 кДа) фракции следует исследовать комплексно, с применением спектрофотометрического метода, методов Лоури и Брэдфорда. Данные методы дают возможность предположительно оценить диапазоны размеров белковых молекул (по числу пептидных связей), а также определить наличие гидрофобных и ароматических аминокислот.

### Abstract

The article presents a comparative analysis of four methods for quantifying the protein-peptide complexes content in extracts obtained from animal raw materials, as well as the low- and high-molecular weight extract fractions: the direct spectrophotometric determination at wavelengths of 260 and 280 nm with subsequent calculation by the Kalckar formula; the biuret reaction by the Kingsley-Weixelbaum method; the method with Bradford reagent and the standard Lowry method. Experimental data analysis demonstrates that in case of the extract that contains protein-peptidic complexes in different molecular weights range, the Kingsley-Weixelbaum method shows the highest quality of protein concentration determination; while studying highmolecular weight fraction (more than 30 kDa), it is possible to obtain more information by combining the spectrophotometric method and the Kingsley-Weixelbaum method. Low-molecular weight fractions (less than 30 kD) should be investigated by complex methods including the spectrophotometric method, Lowry and Bradford methods. These methods make it possible to presumably estimate protein molecules size ranges (by amount of peptide bonds), and also to determine hydrophobic and aromatic amino acids presence.

### Введение

Ключевым моментом большинства исследований в области выделения биологически активных молекул является предварительное определение содержания белка в экстракте, что позволяет более качественно и точно выполнять дальнейший анализ свойств и функций белковых молекул (электрофоретические, хроматографические и иные исследования). Критическим моментом является правильный выбор метода определения содержания белка и его модификаций, поскольку в зависимости от природы образца, можно получить либо завышенные, либо заниженные результаты [1]. Одним из самых важных требований, которые предъявляются к методу определения концентрации белка, является его инертность к присутствию посторонних внутриклеточных компонентов и к составу экстрагирующей смеси. В настоящее время не существует метода количественного определения белка, ко-

### Introduction

A key moment in the most of investigations in the field of biologically active molecules extraction is protein content preliminary determination in an extracts, which allows performing with higher quality and more accurately following analysis of protein molecules properties and functions (electrophoretic, chromatographic and other investigations). Critical moment is a right choice of protein content determination method and its modifications as overestimated or underestimated results can be obtained depending on a sample nature [1]. One of the most important requirements to a method for protein concentration detection is its inertness to foreign intracellular components presence and to extraction mixture composition. At present, there are no methods for quantitative protein de-

торый обладал бы в равной степени специфичностью, чувствительностью, воспроизводимостью, быстротой и простотой проведения, а также отсутствием влияния небелковых компонентов. У каждого метода определения содержания белка есть свои преимущества и недостатки [2].

Наиболее популярными и достоверными методами, используемыми в современной практике, являются: спектрофотометрическое определение концентрации белка, метод Кингслея — Вейксельбаума, метод Лоури и метод Брэдфорда [3].

Спектрофотометрический метод основан на поглощении ультрафиолетового излучения ароматическими аминокислотами (тирозина, триптофана, и фенилаланина), входящими в последовательность белковой молекулы. Содержание белка находят по формуле Калькара, которая дает возможность исключить влияние нуклеиновых кислот в образцах, на основе данных определения оптической плотности при 280 и 260 нм [4].

Метод Кингслея — Вейксельбаума впервые был описан в 1914 году, основан на биуретовой реакции и является колориметрическим. Принцип метода состоит в образовании фиолетового комплекса ионов меди с белковыми молекулами в щелочной среде: связывание атома кислорода с ионом меди происходит за счет появления отрицательного заряда, возникающего при отщеплении атома водорода от енольной группы пептидной связи [5]. В биуретовую реакцию вступают белки и пептиды, состоящие не менее чем из 3 аминокислот. Концентрацию белка устанавливают по интенсивности светопоглощения при длине волны 540–580 нм. Предел чувствительности биуретового метода ограничен концентрацией белка 300 мг/л [6].

Метод Лоури основан на реакции с реагентом Фолина — Чокалтеу, активным компонентом которого является комплекс из молибдата, вольфрамата и фосфорной кислоты. В ходе биуретовой реакции и восстановления реактива Фолина циклическими аминокислотами [7] (главным образом тирозином, а также триптофаном и фенилаланином, в меньшей степени — цистеином), происходит окрашивание раствора. Метод Лоури более чем в сто раз чувствительнее биуретового, однако является невысокоспецифичным, физиологически активные амины мешают точному определению концентрации белка [8].

Метод Брэдфорда с применением красителя Ку-масси бриллиантового синего (КБС) G-250 является достаточно чувствительным и простым. Предположительно, молекула красителя образует мостик между двумя отрицательно заряженными группами индикатора и положительно заряженными молекулами белка, реагируя с ними, в результате чего формируется относительно крупный комплекс из белка и красителя, окрашенный в синий цвет [9]. Данный краситель не образует окрашенного комплекса со свободными

тектон, which have specificity, sensitivity, reproducibility, rapidness and simplicity of performance in an equal degree, and also free of non-protein components effect. Each protein determination method has its own advantages and disadvantages [2].

The most popular and reliable methods used in the modern practice are: spectrophotometric determination of protein concentration, the Kingsley-Weichselbaum method, Lowry method and Bradford method [3].

The spectrophotometric method is based on ultraviolet radiation absorption by aromatic amino acids (tyrosine, tryptophan and phenylalanine), which are constituents of protein molecule sequence. The protein content is determined by the Kalckar formula, which allows excluding an nucleic acids effect in samples based on data on optical density at 280 and 260 nm [4].

The Kingsley-Weichselbaum method was described for the first time in 1914. It colorimetric method based on the biuret reaction. The principle consists in the development of violet colored copper ions complex with protein molecules in the alkaline medium: oxygen atom binding with the copper ion takes place due to negative charge appearance that occurs upon splitting of hydrogen atom from of the peptide bond enol group [5]. Proteins and peptides that contain not less than 3 amino acids enter into the biuret reaction. The protein concentration is determined by the intensity of light absorption at a wavelength of 540–580 nm. Biuret reactionsensitivity limit is restricted by protein concentration of 300 mg/l [6].

The Lowry method is based on reaction with the Folin-Ciocalteu's reagent, which active component is a molybdate, tungstate and phosphoric acid complex. In the course of biuret reaction and reduction of Folin reagent by cyclic amino acids [7] (primarily, tyrosin as well as tryptophan and phenylalanine, to a lesser degree by cystein), solution coloring takes place. The Lowry method is a hundred times more sensitive than the biuret method; however, it is not highly specific and physiologically active amines impair accurate determination the protein concentrations [8].

The Bradford assay with the Coomassie brilliant blue G-250 dye (CBB) use is high sensitive and simple. Presumably, the dye molecule forms a bridge between two negatively charged groups of indicator and positively charged protein molecules reacting with them; as a result, relatively large protein complex and the dye having blue color is formed [9]. This dye does not form a stained complex with free amino acids and low molecular weight oligopeptides

аминокислотами и низкомолекулярными олигопептидами, содержащими менее 15 аминокислот, в то же время легко связываясь с основными аминокислотами: лизином, гистидином, аргинином [10, 11].

Целью данной работы являлся подбор оптимальных методов определения концентрации белково-пептидных комплексов, содержащихся в комплексных водно-солевых экстрактах животного сырья и отдельных фракциях.

### Материалы и методы

В качестве основных объектов исследований: комплексный водно-солевой экстракт на основе иммунокомпетентных органов свиней (тимус, селезенка, мезентеральные лимфатические узлы); фракции данного экстракта, содержащие белково-пептидные комплексы с молекулярными массами менее 30 кДа и более 30 кДа. Технология белково-пептидных комплексов включала использование воды с различным содержанием дейтерия в качестве экстрагента (D/H 40 и 150 ppm). Фракционирование белково-пептидных комплексов проводили методом ступенчатой ультрафильтрации на установке Владисарт (Влидисарт, Россия) под давлением  $P = 2,5$  бар с использованием модулей из полиэфирсульфона с пластиковыми фиттингами и емкостями VivaFlow200 (Sartorius, Германия). В результате были получены фракции в диапазоне молекулярных масс менее 30 кДа и более 30 кДа [12].

Определение концентрации белка проводили четырьмя методами: прямое спектрофотометрическое определение концентрации белка, биуретовая реакция по методу Кингслея — Вейксельбаума, с помощью реактива Брэдфорда и методом Лоури.

Прямое спектрофотометрическое определение концентрации белка проводили путем измерения оптической плотности растворов при длинах волн 260 и 280 нм в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см. Результаты оценивали с применением формулы Калькара [13].

Метод Кингслея — Вейксельбаума использовался с применением полуавтоматического анализатора BioChemSA (HTI, США) по стандартным методикам, прилагаемым к реактивам (HTI, США).

Колориметрический метод Лоури проводили по стандартной методике без предварительного осаждения белка, предложенной Оливером Х. в 1951 году [14]. Реакция белков с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  происходила в щелочном растворе в присутствии восстанавливающегося фосфорномолибдено-вольфрамового реактива (Folin&Ciocalteu's phenol reagent, Sigma-Aldrich, Germany), содержание белка рассчитывали по калибровочному графику.

Метод Брэдфорда проводили с использованием красителя Кумасси бриллиантового синего G-250. Оптическую плотность измеряли при длине волны 595 нм против контроля, содержащего вместо белка

that contain less than 15 amino acids; at the same time, it easily binds with basic amino acids: lysine, histidine, arginine [10, 11].

The aim of this study was an optimal methods selection for detecting protein-peptide complexes contained in complex aqueous-salt extracts of animal raw material and individual fractions.

### Materials and methods

The main research subjects were the complex aqueous-salt extract based on porcine immunocompetent organs (thymus, spleen, mesenteric lymph nodes); fractions of this extract that contain the protein-peptide complexes with molecular weights less than 30 kDa and more than 30 kDa. The technology of the protein-peptide complexes included the use of water with different deuterium content as an extracting agent (D/H 40 and 150 ppm). Fractionation of the protein-peptide complexes was carried out by the method of stepwise ultrafiltration on a Vladisart unit (Vladisart, Russia) under pressure of 2.5 bar using the polyethersulfone modules with plastic fittings and containers VivaFlow200 (Sartorius, Germany). As a result, fractions in a molecular weights range less than 30 kDa and more than 30 kDa were obtained [12].

Protein concentration determination was carried out by four methods: the direct spectrophotometric protein concentration determination, the Kingsley-Weichselbaum biuret method, method with Bradford reagent use and the Lowry method.

The direct spectrophotometric protein concentration determination was carried out by measuring the optical density of solutions at wavelengths of 260 and 280 nm in quartz cuvettes with an optical path length of 1 cm. The results were assessed with the use of the Kalckar formula [13].

The Kingsley-Weichselbaum biuret method was used with the semi-automatic analyzer BioChemSA (HTI, USA) according to the standard methods supplied with the reagents (HTI, USA).

The colorimetric Lowry method was carried out by the standard methodology without a preliminary protein precipitation proposed by Oliver H. Lowry in 1951 [14]. The reaction of proteins with  $\text{Cu}^{2+}$  occurred in the alkaline solution in a presence of the reducing reagent containing molybdate, tungstate and phosphoric acid (Folin&Ciocalteu's phenol reagent, Sigma-Aldrich, Germany); the protein concentration was calculated by using the calibration curve.

The Bradford method was applied with the use of the Coomassie brilliant blue G-250 dye. The optical density was measured at a wavelength of 595 nm against the con-



воду. Концентрацию белка определяли по калибровочному графику, для построения которого использовали стандартный раствор сывороточного альбумина 0,5 мг/мл (BSA) [15].

### Результаты и обсуждение

Определение концентрации белка в экстракте показало, что биуретовым методом можно определить максимальное количество белковых соединений, в то время как показатели, полученные спектрофотометрическим методом и методами Лоури и Брэдфорда, были занижены более чем на 20 процентов. Возможно, это обусловлено достаточно узким диапазоном определения белка, что является спецификой данных методов.

Сравнительный анализ результатов, полученных выбранными методами, показал, что наиболее подходящими для анализа высокомолекулярной фракции (с молекулярной массой более 30 кДа) с содержанием различных белковых соединений являются прямой спектрофотометрический метод и биуретовая реакция. Полученные данные свидетельствуют о том, что в данной фракции содержатся в основном соединения, содержащие большое количество связанных ароматических аминокислот (триптофана, тирозина и в меньшей степени фенилаланина), а также о наличии белков, имеющих в своей структуре не менее двух ОН-групп и трех атомов азота, находящихся в полипептидной цепи.

Присутствие в экстракте нуклеиновых кислот и нуклеотидов практически не повлияло на анализ бел-

трол, which contained water instead of protein. The protein concentration was determined by using the calibration curve, in which construction the standard solution of serum albumin (0.5 mg/ml) (BSA) was used [15].

### Results and discussion

Protein concentration determination in the extract showed that it is possible to determine the maximum protein compounds amount by the biuret method, while the levels obtained by the spectrophotometric method, the Lowry method and the Bradford method were underestimated by more than 20 percent. It is possibly conditioned by a comparatively narrow range of protein determination, which is a specific characteristics of these methods.

A comparative analysis of the results obtained by the chosen methods demonstrates that the direct spectrophotometric method and the biuret reaction are the most suitable for high molecular weight fraction analysis (with the molecular weight more than 30 kDa) containing different protein compounds. The obtained data suggest that this fraction largely contains the compounds with the high number of bound aromatic amino acids (tyrosine, tryptophan and, to a lesser degree, phenylalanine), as well as proteins, which have in their structure not less than two OH- groups and three nitrogen atoms present in the polypeptide chain.

The presence of the nucleic acids and nucleotides in the extract practically did not influence an analysis of protein

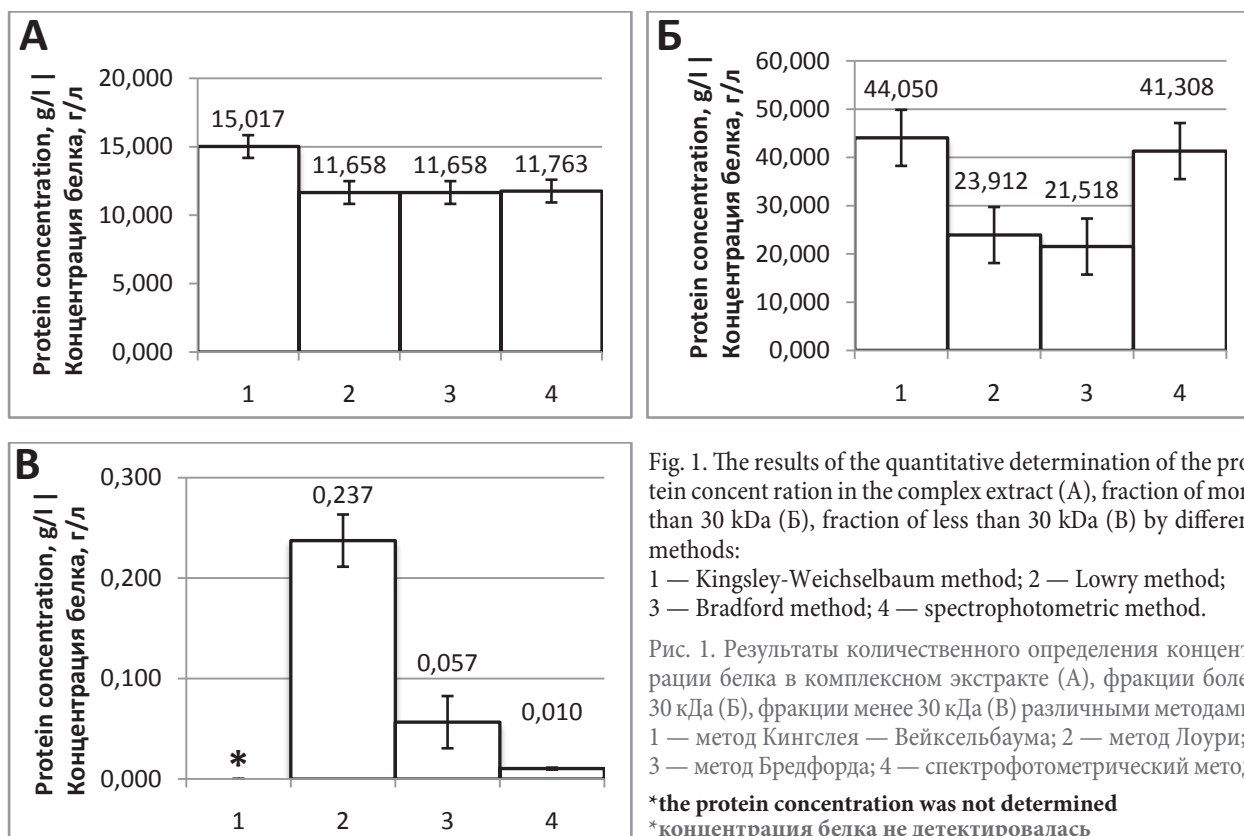


Fig. 1. The results of the quantitative determination of the protein concentration in the complex extract (A), fraction of more than 30 kDa (B), fraction of less than 30 kDa (B) by different methods:

1 — Kingsley-Weichselbaum method; 2 — Lowry method; 3 — Bradford method; 4 — spectrophotometric method.

Рис. 1. Результаты количественного определения концентрации белка в комплексном экстракте (А), фракции более 30 кДа (Б), фракции менее 30 кДа (В) различными методами: 1 — метод Кингслея — Вейксельбаума; 2 — метод Лоури; 3 — метод Брэдфорда; 4 — спектрофотометрический метод.

\*the protein concentration was not determined  
\*концентрация белка не детектировалась

кового состава спектрофотометрическим методом, отклонение от общего биуретового метода составило не более 7%.

Использование метода Лоури и метода Брэдфорда также показало схожие между собой результаты, однако полученный результат отличался от данных, полученных биуретовым и спектрофотометрическим методами более чем в 2 раза. Подобная погрешность может свидетельствовать о том, что произошло чрезвычайно активное связывание с аргинином и гидрофобными аминокислотными остатками (в случае с методом Брэдфорда), а также об активном восстанавливающем влиянии воды с пониженным содержанием дейтерия (в случае с методом Лоури), что было показано ранее [16].

Анализ данных, полученных при исследовании низкомолекулярной фракции (с молекулярной массой менее 30 кДа), показал, что в данном случае недопустимо использование биуретовой реакции ввиду слишком малого содержания белка в образце, в подобной ситуации образец следует сконцентрировать (например, лиофильно высушить), кроме того биуретовая реакция не позволяет определять пептидные соединения. Наибольшее значение белка было определено методом Лоури, что свидетельствует о наличии в образце значительного количества белков и пептидов, имеющих в своей структуре ароматические аминокислоты, что также было подтверждено спектрофотометрическим методом. Кроме того, методом Брэдфорда было показано наличие гидрофобных аминокислотных остатков.

При обсуждении полученных результатов следует обратить внимание при оценке концентрации белка в экстракте на взаимодействие реактива Кумасси со строго определенными аминокислотами боковых цепей молекулы белка, поскольку остальные белковые соединения, в составе которых нет аргинина и ароматических кислот, выпадают из аналитической выборки [17, 18]. Таким образом, отмечено заведомое занижение результатов при использовании метода Брэдфорд относительно метода Лоури. При анализе неизвестных по белковому составу жидкостей также сложно подобрать необходимый стандарт для построения калибровочной кривой, в связи с чем вынужденное использование стандарта БСА может также влиять на полученные данные [19]. Калибровочные кривые, построенные по результатам спектрофотометрического исследования, являются более четкими и позволяют использовать данную методику без риска потерять при определении концентрации белка низкомолекулярные пептидные соединения, которые обладают наибольшей функциональной активностью и являются целевыми, однако в данном случае на результаты могут влиять технические и конструктивные характеристики приборов, с использованием которых проводится анализ [20,21].

composition by the spectrophotometric method; deviation from the general biuret method was not more than 7%.

The use of Lowry and Bradford methods also gave results that were similar to each other; however, they differed from the data obtained by the biuret method and the spectrophotometric method by more than two times. This discrepancy can be indicative of an extremely active binding with arginine and hydrophobic amino acid residues (in case of the Bradford method) and of an active reducing effect of water with lowered deuterium content (in case of the Lowry method), which was shown earlier [16].

Analysis of the data obtained when studying the low molecular weight fraction (with molecular weight less than 30 kDa) shows that in this case, it is infeasible to use the biuret reaction because of too low protein content in a sample; in this situation, a sample is to be concentrated (for example, lyophilized). In addition, the biuret reaction does not allow low determination of peptide compounds. The highest protein level was determined by the Lowry method, which points to the presence in the sample of the high amount of proteins and peptides that have aromatic amino acids in their structure, which was also confirmed by the spectrophotometric method. Moreover, the Bradford method revealed the presence of hydrophobic amino acid residues.

While discussing obtained results and assessing a protein concentration in an extract, it is necessary to pay attention to the interaction of the Coomassie reagent with specific amino acids of the side chains of the protein molecule, as other protein compounds that do not contain arginine and aromatic acids fall out of the analytical sample [17, 18]. Therefore, undoubted underestimation of the results when using the Bradford method compared to the Lowry method was noted. In analysis of liquids with an unknown protein content, it is also difficult to choose a needed standard for constructing a calibration curve. In this connection, the necessary use of the BSA standard can also influence the obtained data [19]. Calibration curves constructed by the results of the spectrophotometric analysis, are more clear and allow using this method without a risk of losing low molecular weight peptide substances, which have the highest functional activity and are a target, in determination of the protein concentration. However, in this case, the results can be influenced by technical and design features of equipment, which is used in analysis [20, 21].

## Закключение

Таким образом, можно сделать вывод, что при количественном определении содержания белка в экстрактах на основе сырья животного происхождения, с широким спектром белково-пептидных соединений, наибольшей точностью обладает биуретовый метод. При исследовании фракций экстрактов с молекулярной массой более 30 кДа наиболее полную информацию можно получить с помощью спектрометрического метода и биуретовой реакции, а при исследовании низкомолекулярных фракций с молекулярной массой менее 30 кДа следует проводить комплексное исследование с сочетанием методов Лоури, Брэдфорда и спектрофотометрическим методом, а биуретовый метод в данном случае непригоден.

## Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 15-16-00008).

## Conclusion

Therefore, it is possible to conclude that upon quantitative protein content determination in extracts based on animal raw material with a high range of protein-peptide substances, the biuret method is the most accurate. While studying the extract fractions with a molecular weight more than 30 kDa, the most comprehensive information can be obtained using the spectrophotometric method and the biuret reaction. When studying the low molecular weight fractions with a molecular weight less than 30 kDa, it is necessary to carry out a complex analysis combining the methods of Lowry, Bradford and spectrophotometric analysis, while the biuret method is not suitable in this case.

## Acknowledges

The study was financed by the Grand of the Russian Scientific Foundation (Project No. 15-16-00008).

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Noble, J.E. Quantitation of protein/ J. E. Noble, M.J. Bailey// *Methods Enzymol.*— 2009. — V. 463. — P. 73–95. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63008-1
2. Brady, P.N. Evaluation of Colorimetric Assays for Analyzing Reductively Methylated Proteins: Biases and Mechanistic Insights/ P.N. Brady, M.A. Macnaughtan // *Analytical biochemistry.*— 2015. — V.491. — P. 43–51. DOI: 10.1016/j.ab.2015.08.027
3. Lanouette, S. The functional diversity of protein lysine methylation/ S. Lanouette, V. Mongeon, D. Figeys, J.F. Couture // *Mol-Syst Biol.*— 2014. — V. 10. — P. 1–26.
4. Gordon, M.A.R. A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts / M.A.R. Gordon, E. Armenise, R.P. White, P.R. Hirsch, K.W.T. Goulding// *Soil BiolBiochem.*— 2013. — V. 67(100). — P. 166–173.
5. Olson, B. Assays for determination of protein concentration/ B. Olson, J. Markwell// *CurrProtoc Protein Sci.*— 2007. — Unit 3.4.
6. Jian, W. A workflow for absolute quantitation of large therapeutic proteins in biological samples at intact level using LC-HRMS/ W.Jian, L.Kang, L. Burton, N. Weng // *Bioanalysis.*— 2016. — V. 8. P. 1679–91.
7. Larda, S.T. Lysine methylation strategies for characterizing protein conformations by NMR/ S.T. Larda, M.P. Bokoch, F. Evanics, R.S. Prosser// *J Biomol NMR.* — 2012. — V. 54. — P. 199–209.
8. Georgiou, C.D. Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: A hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins/ C.D. Georgiou, K.Grintzalis, G. Zervoudakis, I. Pappostolou // *Anal Bioanal Chem.*— 2008. — V. 391. — P. 391–403.
9. Whiffen, L.K. Polyphenolic compounds interfere with quantification of protein in soil extracts using the Bradford method/ L.K. Whiffen, D.J. Midgley, P.A. McGee // *Soil BiolBiochem.*— 2007. — V. 39(2). — P. 691–694.
10. Вавилова, Т.П. Сравнительный анализ содержания белков в костной ткани верхней и нижней челюстей / Т.П. Вавилова, В.А. Китаев, А.В. Пушкина, С.В. Шишкин // *Вятский медицинский вестник.*— 2007.— № 4.
11. Roberson, K.J. Review of methods to assign the nuclear magnetic resonance peaks of reductively methylated proteins/ K.J. Roberson, M.A. Macnaughtan // *Anal Biochem.* — 2014. — V. 466. — P. 76–82.
12. Fedulova L.V. Influence of Different Polypeptides Fractions Derived from Sus Scrofa Immune Organs on the Rats Immunological Reactivity/ L.V. Fedulova, E.R. Vasilevskaya,, E.A. Kotenkova, A.A. Elkina, M.G. Baryshev, A.B. Lisitsyn // *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences.*— 2017.— № 7. — P. 35–40.
13. Krohn, R. I. The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein // *Current Protocols in Cell Biology.* — 2002. — V. 15. — P. 3H: A.3H.1–A.3H.28. DOI: 10.1002/0471143030.cba03hs15

## REFERENCES

1. Noble, J.E. Quantitation of protein/ J. E. Noble, M.J. Bailey// *Methods Enzymol.*— 2009. — V.463. — P. 73–95. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63008-1
2. Brady, P.N. Evaluation of Colorimetric Assays for Analyzing Reductively Methylated Proteins: Biases and Mechanistic Insights/ P.N. Brady, M.A. Macnaughtan // *Analytical biochemistry.*— 2015. — V.491. — P. 43–51. DOI:10.1016/j.ab.2015.08.027
3. Lanouette, S. The functional diversity of protein lysine methylation/ S. Lanouette, V. Mongeon, D. Figeys, J.F. Couture // *Mol-Syst Biol.* — 2014. — V. 10. — P. 1–26.
4. Gordon, M.A.R. A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts / M.A.R. Gordon, E. Armenise, R.P. White, P.R. Hirsch, K.W.T. Goulding // *Soil BiolBiochem.*— 2013. — V.67(100). — P. 166–173.
5. Olson, B. Assays for determination of protein concentration/ B. Olson, J. Markwell // *CurrProtoc Protein Sci.*— 2007. — Unit 3.4.
6. Jian, W. A workflow for absolute quantitation of large therapeutic proteins in biological samples at intact level using LC-HRMS/ W. Jian, L. Kang, L. Burton, N. Weng // *Bioanalysis.*— 2016. — V. 8. P. 1679–91.
7. Larda, S.T. Lysine methylation strategies for characterizing protein conformations by NMR/ S.T. Larda, M.P. Bokoch, F. Evanics, R.S. Prosser// *J Biomol NMR.*— 2012. — V. 54. — P. 199–209.
8. Georgiou, C.D. Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: A hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins/ C.D. Georgiou, K. Grintzalis, G. Zervoudakis, I. Pappostolou // *Anal Bioanal Chem.*— 2008. — V. 391. — P. 391–403.
9. Whiffen, L.K. Polyphenolic compounds interfere with quantification of protein in soil extracts using the Bradford method/ L.K. Whiffen, D.J. Midgley, P.A. McGee // *Soil BiolBiochem.*— 2007. — V. 39(2). — P. 691–694.
10. Vavilova, T.P. Comparative analysis of protein content in the bone tissue of the upper and lower jaw / T.P.Vavilova, V.A. Kitaev, A.V.Pushkina, S.V.Shishkin // *Vyatsky medical bulletin.*— 2007.— № 4.
11. Roberson, K.J. Review of methods to assign the nuclear magnetic resonance peaks of reductively methylated proteins/ K.J. Roberson, M.A. Macnaughtan // *Anal Biochem.*— 2014. — V. 466. — P. 76–82.
12. Fedulova L.V. Influence of Different Polypeptides Fractions Derived from Sus Scrofa Immune Organs on the Rats Immunological Reactivity/ L.V. Fedulova, E.R. Vasilevskaya,, E.A. Kotenkova, A.A. Elkina, M.G. Baryshev, A.B. Lisitsyn // *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences.*— 2017.— № 7. — P. 35–40
13. Krohn, R.I. The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein // *Current Protocols in Cell Biology.*— 2002. — V. 15. — P. 3H: A.3H.1–A.3H.28. DOI: 10.1002/0471143030.cba03hs15

14. Reichelt, W. Bioprocess monitoring: minimizing sample matrix effects for total protein quantification with bicinchoninic acid assay/W. Reichelt, D. Waldschitz, C. Herwig, L. Neutsch// *J Ind-MicrobiolBiotechnol.*— 2016. — V. 43. — P. 1271–80.
15. Ku, H.K. Interpretation of protein quantitation using the Bradford assay: comparison with two calculation model/ H.K. Ku, H.M. Lim, K.H. Oh, H.J. Yang, J.S. Jeong, S.K. Kim// *Anal Biochem.*— 2013. — V. 434(1). — P. 178–180.
16. Василевская, Е.Р. Влияние изотопного состава воды на экстракцию биоактивных соединений / Е.Р. Василевская, Л.В. Федулова, Е.А. Котенкова, А.П.Даньшина // *Все о мясе.*— 2016.— № 6. — С. 42–45.
17. Simonian, M.H. Quantitation of proteins/ M.H. Simonian, J.A. Smyth// *Protocols in Molecular Biology, supplement 76.*— 2006. — P. 10.1A1–10.1A9.
18. Janairo, G.Determination of the Sensitivity Range of Biuret Test for Undergraduate Biochemistry Experiments/ G.Janairo, M. L.Sy, L.Yap, N.Llanos-Lazaro, J. Robles // *Journal of Science & Technology.*— 2011. — V.5(6). — P. 77–83.
19. Lu, T. S. Interpretation of biological and mechanical variations between the Lowry versus Bradford method for protein quantification/ T. S. Lu, B. S. Yiao, M. D. Kenneth, R. V. Jensen, L. Hsiao // *North American Journal of Medical Sciences.* — 2010. — V. 2(7). — P. 325–328.
20. Waterborg, J. H. The Lowry Method for Protein Quantitation// *The Protein Protocols Handbook.*— 2009. — V.32. — P. 7–10.
21. Okutucu, B. Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration/B.Okutucu, A. Dinçer, Ö. Habib, F.Zihnioğlu // *Journal of Biochemical and Biophysical Methods.*— 2007. — V. 70(5). — P. 709–711.

14. Reichelt, W. Bioprocess monitoring: minimizing sample matrix effects for total protein quantification with bicinchoninic acid assay/ W. Reichelt, D. Waldschitz, C. Herwig, L. Neutsch// *J Ind-MicrobiolBiotechnol.*— 2016. — V. 43. — P. 1271–80.
15. Ku, H.K. Interpretation of protein quantitation using the Bradford assay: comparison with two calculation model/ H.K. Ku, H.M. Lim, K.H. Oh, H.J. Yang, J.S. Jeong, S.K. Kim// *Anal Biochem.*— 2013. — V. 434(1). — P. 178–180.
16. Vasilevskaya E.R. The effect of the isotopic composition of water on the extraction of bioactive compounds / E.R. Vasilevskaya, L.V. Fedulova, E.A. Kotenkova, A.P. Danshin // *Vse o myase.*— 2016. — No. 6. — P. 42–45.
17. Simonian, M.H. Quantitation of proteins/ M.H. Simonian, J.A. Smyth// *Protocols in Molecular Biology, supplement 76.*— 2006. — P. 10.1A1–10.1A9.
18. Janairo, G. Determination of the Sensitivity Range of Biuret Test for Undergraduate Biochemistry Experiments/ G. Janairo, M. L. Sy, L. Yap, N. Llanos-Lazaro, J. Robles // *Journal of Science & Technology.*— 2011. — V. 5(6). — P. 77–83.
19. Lu, T. S. Interpretation of biological and mechanical variations between the Lowry versus Bradford method for protein quantification/ T. S. Lu, B. S. Yiao, M. D. Kenneth, R. V. Jensen, L. Hsiao // *North American Journal of Medical Sciences.*—2010. — V. 2(7). — P. 325–328.
20. Waterborg, J. H. The Lowry Method for Protein Quantitation// *The Protein Protocols Handbook.*— 2009. — V. 32. — P. 7–10.
21. Okutucu, B. Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration/ B. Okutucu, A. Dinçer, Ö. Habib, F. Zihnioğlu // *Journal of Biochemical and Biophysical Methods.*— 2007. — V. 70(5). — P. 709–711.

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

##### Принадлежность к организации

**Василевская Екатерина Романовна** — младший научный сотрудник Экспериментальной клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26  
Тел.: +7-495-676-92-11  
E-mail: Rina715@yandex.ru

**Котенкова Елена Александровна** — кандидат технических наук, научный сотрудник Экспериментальной клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26  
Тел.: +7-495-676-92-11  
E-mail: lazovlena92@yandex.ru

**Лукинова Екатерина Александровна** — старший лаборант Экспериментальной клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26  
Тел.: +7-495-676-92-11  
E-mail: kate3584@mail.ru

**Калинова Евгения Андреевна** — старший лаборант Экспериментальной клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26  
Тел.: +7-495-676-92-11  
E-mail: jane\_135@mail.ru

##### Критерии авторства

Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.

##### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.09.2017

#### AUTHOR INFORMATION

##### Affiliation

**Vasilevskaya Ekaterina Romanovna** — junior researcher of Experimental clinic –research laboratory of biologically active substances of an animal origin, V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences 109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel.: +7-495-676-92-11  
E-mail: Rina715@yandex.ru

**Kotenkova Elena Alexandrovna** — candidate of technical sciences, research scientist of Experimental clinic –research laboratory of biologically active substances of an animal origin, V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences 109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel.: +7-495-676-92-11  
E-mail: lazovlena92@yandex.ru

**Lukinova Ekaterina Aleksandrovna** — senior laboratory assistant of Experimental clinic –research laboratory of biologically active substances of an animal origin, V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences 109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel.: +7-495-676-92-11  
E-mail: kate3584@mail.ru

**Kalinova Evgenia Andreevna** — senior laboratory assistant of Experimental clinic –research laboratory of biologically active substances of an animal origin, V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences 109316, Moscow, Talalikhina str., 26  
Tel.: +7-495-676-92-11  
E-mail: jane\_135@mail.ru

##### Contribution

The authors equally contributed to the writing of the manuscript and are equally responsible for plagiarism.

##### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Received 14.09.2017