re218.fm Page 65 Wednesday, July 4, 2018 9:27 AM

УДК 57.088.3 DOI: 10.24411/1728-323X-2018-12065

УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ МЕТОД ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКОВ МОЛЛЮСКОВ ПРИ ЭЛЕКТРОФОРЕЗЕ В ДЕНАТУРИРУЮЩИХ УСЛОВИЯХ

Т. С. Дроганова, *старший преподаватель,*
Л. В. Поликарпова, *научный сотрудник,*
А. С. Коничев, *старший научный сотрудник,*
Московский государственный областной университет,
ecolab@mgou.ru

Усовершенствован метод фракционирования белков пресноводных моллюсков, основанный на электрофоретическом разделении в денатурирующих условиях. Для повышения точности и эффективности исследования предлагается увеличить время и температуру денатурации белков, а также проводить электрофорез белков при постоянном охлаждении; при фракционировании использовать концентрирующий и сепарирующий гели; фиксацию проводить совместно с окрашиванием с использованием 3,5 %-ного раствора формальдегида в 25 %-ном этаноле. Данный метод применен для установления субъединичной структуры белков пресноводного моллюска живородка речная и определения молекулярной массы субъединиц. Метод может быть весьма информативным для решения задач экологической биохимии гидробионтов и в том числе моллюсков, как наиболее подходящих объектов для изучения механизмов биохимической адаптации к токсическому воздействию, обнаружения специфических белков-металлотионеинов, ответственных за связывание тяжелых металлов, белков теплового шока и других.

The method of fractionating fresh-water mollusks based on the electrophoretic separation under denaturing conditions is improved. To increase the accuracy and effectiveness of the study, it is proposed to increase the time and temperature of proteins denaturation, as well as to perform protein electrophoresis under constant cooling; when fractionating, to use concentrating and separating gels; fixation should be carried out together with staining using 3.5 % formaldehyde solution in 25 % ethanol. This method was used to establish a protein sub-unit structure of the freshwater mollusk of the river snails (*Viviparidae*) and determine their molecular weight. The method can be very informative for solving the problems of ecological biochemistry of hydrobionts, including mollusks, as the most suitable objects for studying the mechanisms of biochemical adaptation to toxic effects, the detection of specific responsible for binding heavy metals metallothione in proteins, heat shock proteins and others.

Ключевые слова: фракционирование белков, электрофорез в денатурирующих условиях, пресноводные моллюски, живородка речная.

Keywords: protein fractionation, electrophoresis in denaturing conditions, freshwater mollusks, river snails (*Viviparidae*).

В настоящее время существуют различные приемы выявления гетерогенности и субъединичной структуры белков [1—4], основанные на их электрофоретическом разделении или ультрацентрифугировании. Данные методы широко используются в практике биохимических и медицинских исследований, однако не учитывают особенности белков различных биологических объектов, что в некоторых случаях не обеспечивает достижения достоверных результатов исследования.

Среди этих методов выделяется разработанный почти полвека назад метод электрофореза белков в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия [5], который активно используется в различных направлениях биохимии животных, растений и микроорганизмов. Этот метод может быть также весьма информативным для экологической биохимии гидробионтов и в том числе моллюсков, как наиболее подходящих объектов для изучения механизмов биохимической адаптации к токсическому воздействию и, как следствие, наиболее популярных лабораторных тест-объектов и объектов-индикаторов загрязнений в природных условиях [6]. Данный метод, в принципе, позволяет быстро и с высокой эффективностью разделять полипептидные цепи белков, определять их молекулярные массы и субъединичный состав, что немаловажно для исследования адаптационных изменений в наборах белков у тест-объектов под воздействием различных загрязнителей воды. В частности, как мы полагаем, этот метод может быть применим для обнаружения специфических, ответственных за связывание тяжелых металлов, белков-металлотионеинов, белков теплового шока и других, так называемых «стрессовых» белков с еще мало изученными свойствами [6]. В то же время попытки его применения в отношении моллюсков до настоящего времени не принесли желаемых результатов.

Для изучения спектров растворимых белков под влиянием экотоксикантов мы долгое время применяли стандартный метод фракционирования белков в денатурирующих условиях по Лэмли [7], однако результаты были недостаточно четкими и трудно воспроизводимыми. С целью повысить точность исследования, а также получить возможность в дальнейшем использовать метод для анализа субъединичной структуры и молекулярных масс белков пресноводных гидробионтов, мы разработали модификацию данного метода, которая заключается в следующем: 1) электрофорез белков проводится при постоянном охлаждении; 2) при фракционировании используются концентрирующий и сепарирующий гели; 3) фиксация проводится совместно с окрашиванием с использованием

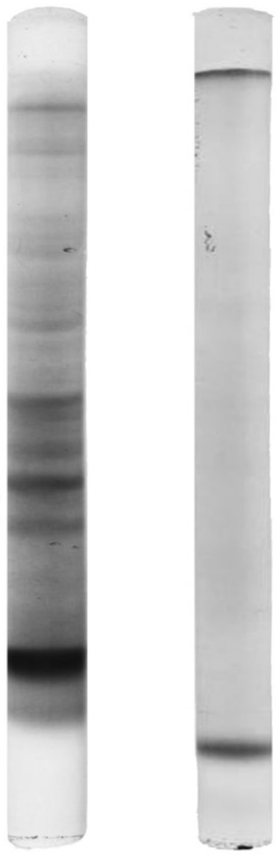
re218.fm Page 66 Wednesday, July 4, 2018 9:27 AM

3,5 %-ного раствора формальдегида в 25 %-ном этаноле. Кроме того, время и температура денатурации белков пресноводных моллюсков для достижения необходимого эффекта были, по сравнению с исходным методом, увеличены.

Материалы и методы. Материалом для исследований служили моллюски живородка речная (*Viviparus viviparus*), из пищеварительной железы которых получали экстракт водорастворимых белков путем гомогенизации с 10-кратным объемом 0,5 %-ного раствора Triton X-100 и последующего центрифугирования в течение 15 минут при 10 000 g при 4 °С для освобождения от клеточного дебриса. Концентрацию белка в полученном экстракте определяли по методу Лоури.

Электрофоретическое фракционирование белков для увеличения разрешающей способности проводили в ступенчатой буферной системе в колонках ПААГ при охлаждении (4 °С) с целью предотвращения разогревания геля и изменения структуры как самого геля, так и фракционируемых полипептидов. Экспериментальным путем нами было установлено, что для достижения необходимого результата электрофорез необходимо проводить при постоянном охлаждении, поскольку в противном случае вследствие неравномерного разогревания столбиков ПААГ наблюдается искривление белковых зон, появление шмеров. Концентрация сепарирующего геля составляла 11 %, pH 8,8, концентрирующего геля — 4 %, pH 6,8. Полимеризацию проводили в течение 1 часа под УФ-лучами. В качестве электродного использовали Трис-HCl буфер pH 8,3 (30,3 г трис и 144 г глицина растворяли в 1 л дистиллированной воды) с добавлением 1 % ДДС-Na, разбавляя буферный раствор перед использованием в 10 раз. Белковые экстракты смешивали с равным объемом буферного раствора, содержащего 5 мл глицерина, 2,5 мл 0,5М Трис-HCl pH 6,8, 7,1 мл дистиллированной воды, 4 мл 10 % ДДС-Na, 0,01 г бромфенолового синего и 100 мкл β-меркаптоэтанола. Денатурацию проводили на кипящей водяной бане в течение 4 минут, поскольку наш опыт работы показал, что в связи с физико-химическими особенностями белков моллюсков температура и время денатурации должны быть увеличены. На колонку наносили около 100 мкг белка. Силу тока регулировали из расчета 2 мА на колонку при вхождении белков в концентрирующий гель, затем увеличивали до 3 мА. Продолжительность электрофореза составляла около 3 часов. Фиксация проводилась совместно с окрашиванием в 3,5 %-ном растворе формальдегида в 25 %-ном этаноле в течение 3 часов для вытеснения ДДС-Na красителем и ковалентного связывания белков с матрицей геля вследствие образования метиленовых мостиков между аминогруппами аминокислот и первичными аминами ПААГ [8]. Следует отметить, что при использовании классического метода окрашивания нами было выявлено перерастворение белков, выпавших в осадок при фиксации, и вымывание их из ПААГ.

Результаты и обсуждение. Результаты фракционирования белков моллюсков разработанным методом представлены на рисунке. Из представленных данных хорошо видно, что использование предлагаемого нами способа фракционирования белков живородки речной дает наиболее полные, наглядные результаты по сравнению со стандартным методом. На колонке А нами выявлены 18 белковых фракций пищеварительной железы живородки речной, в то время как на рисунке Б эти белковые фракции отсутствуют или слабо выражены. Мы полагаем, что это связано с частичным растворением и вымыванием белков пресноводных моллюсков в процессе фиксации, что неоднократно наблюдалось нами при постановке электрофорезов стандартным способом —



А Б

Рис. Фотография электрофореграмм фракционирования белков печени живородки речной в денатурирующих условиях: А — с использованием предлагаемого нами метода; Б — стандартный метод фракционирования по Лэмли

re218.fm Page 67 Wednesday, July 4, 2018 9:27 AM

белковые зоны начинали слабо проявляться в геле после окрашивания, а впоследствии практически полностью исчезали при отмывке.

Предлагаемый нами способ, характеризующийся высокой чувствительностью, экспрессивностью, а также возможностью реализации в условиях современных биохимических лабораторий, исключает частичное растворение и вымывание белковых фракций у пресноводных гидробионтов из ПААГ в процессе фиксации и окрашивания, тем самым обеспечивая более достоверный результат по сравнению с имеющимися методами.

Таким образом, результатом, достигаемым при использовании разработанной нами модификации метода электрофореза с додецилсульфатом натрия белков пресноводных моллюсков, является выявление четкого спектра полипептидов, а также минимизация неточностей при исследовании белков данной группы живых организмов. Есть все основания полагать, что данный метод вполне подходит в определению молекулярной массы полипептидов моллюсков, анализа их субъединичной структуры и оценки гетерогенности популяций моллюсков как в норме, так и в условиях токсического загрязнения пресноводных водоемов и его использование существенно усилит исследования в области экологии гидробионтов.

Библиографический список

1. Лелевич В. В. Биологическая химия: методические рекомендации для студентов лечебного факультета / В. В. Лелевич, И. О. Леднева, Н. Э. Петушок. — Гродно: ГрГМУ, 2016. — 73 с.
2. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Пособие для студентов биол. факультетов и учащихся спец. старших классов гимназий. — М.: МЦНМО, 2002. — 248 с.
3. Практикум по молекулярной биологии / А. С. Коничев, И. Л. Цветков, А. П. Попов и др. — М.: КолосС, 2012. — 151 с.: ил.
4. Современные проблемы биохимии. Методы исследований: учеб. пособие / Е. В. Барковский [и др.]; под ред. проф. А. А. Чиркина. — Минск: Выш. шк., 2013. — 491 с.: ил.
5. Цветков И. Л., Коничев А. С. Биохимические и молекулярно-генетические аспекты адаптации гидробионтов. М.: Изд-во МГОУ, 2013. — 122 с.
6. Цветков И. Л., Коничев А. С. Экологическая биохимия гидробионтов. М.: Изд-во МГОУ, 2006. 104 с.
7. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the heat of bacteriophage T4. // Nature, V. 227. P. 680—685.
8. Steck T. L., Koziarz J. J., Singh M. K., Reddy G., Köhler H. Preparation and analysis of seven major, topographically defined fragments of band 3, the predominant transmembrane polypeptide of human erythrocyte membranes. Biochemistry, 1978, 17, 1216—1222.

THE IMPROVED METHOD OF FRACTIONATING FRESH-WATER MOLLUSKS BASED ON THE ELECTROPHORETIC SEPARATION UNDER DENATURING CONDITIONS

T. S. Droganova, senior lecturer of the Department of Theoretical and Applied Chemistry of Moscow State Regional University (MGOU),
A. S. Konichev, Ph. D. (Biology), Dr. Habil., Professor, Senior Researcher, Research Laboratory of Ecological Biochemistry, MGOU,
L. V. Polikarpova, Researcher of the Research Laboratory of Ecological Biochemistry, MGOU

References

1. Lelevich V. V. Biologicheskaya khimiya: metodicheskiye rekomendatsii dlya studentov lechebnogo fakulteta [Biological chemistry: methodological recommendations for students of the medical faculty / V. V. Lelevich, I. O. Ledneva N. E. Petushok]. Grodno: GrGMU, 2016. 73 p. [in Russian]
2. Osterman L. A. Metody issledovaniya belkov i nukleinovykh kislot Posobiye dlya studentov biol. fakultetov i uchashchikhsya spets. starshikh klassov gimnazy. [Methods for studying proteins and nucleic acids. A manual for students of Biol. faculties and students of special. senior classes of gymnasiums]. Moscow: MCNMO, 2002. 248 p. [in Russian]
3. Praktikum po molekulyarnoy biologii [Workshop on molecular biology / A. S. Konichev, I. L. Tsvetkov, A. P. Popov et al.]. Moscow, Koloss, 2012. 151 p.: ill. [in Russian]
4. Sovremennye problemy biokhimii. Metody issledovany: ucheb. posobiye / Ye. V. Barkovsky [i dr.]; pod red. prof. A. A. Chirkina. [Modern problems of biochemistry. Methods of Research: Textbook. allowance / E. B. Barkovsky [et al.]; Ed. by prof. A. A. Chirkina. Minsk: Higher Education shk., 2013. 491 p.: ill. [in Russian]
5. Tsvetkov I. L., Konichev A. S. Biokhimicheskiye i molekulyarno-geneticheskiye aspekty adaptatsii gidrobiontov. [Biochemical and molecular genetic aspects of adaptation of hydrobionts]. Moscow: MGOU, 2013. — 122 p. [in Russian]
6. Tsvetkov I. L., Konichev A. S. Ekologicheskaya biokhimiya gidrobiontov [Ecological biochemistry of hydrobionts]. Moscow: MGOU, 2006. 104 p. [in Russian]
7. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the heat of bacteriophage Vol. 4. // *Nature*, V. 227. P. 680—685.
8. Steck T. L., Koziarz J. J., Singh M. K., Reddy G., Köhler H. Preparation and analysis of seven major topographically defined fragments of band 3, the predominant transmembrane polypeptide of human erythrocyte membranes. Biochemistry, 1978, 17, 1216—1222.