

УДК: 591.111.1:597.556.333.1

Л. П. Чумаченко¹, асп., Т. В. Гладкий¹, канд. биол. наук., доц.,Л. Ф. Дьяченко², канд. биол. наук., ст. науч. сотр.

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,

¹ кафедра физиологии человека и животных,² кафедра генетики и молекулярной биологии,

ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

ФРАКЦИОННЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕРНОМОРСКИХ БЫЧКОВ (*PERCIFORMES*, *GOBIIDAE*)

Электрофоретические спектры сывороточных белков бычка-кругляка (*Neogobius melanostomus* (Pallas)) и бычка-ратана (*Neogobius ratan* (Nordmann)) характеризуются высокой гетерогенностью. Белковый состав сыворотки крови бычков-кругляков более разнообразен по сравнению с этим же показателем бычков-ратанов. Предполагается, что высокая гетерогенность сывороточных белков бычка-кругляка может отражать его более высокий биологический потенциал и адаптационную пластичность.

Ключевые слова: бычок-кругляк, бычок-ратан, электрофорез, белки сыворотки крови.

В последние десятилетия электрофоретическое изучение белков крови рыб используется для идентификации популяций, а также для уточнения и выяснения систематического положения конкретных видов и форм [1, 2]. В 2001 г. обнаружено расширение ареала бычка-кругляка (*Neogobius melanostomus* (Pallas)) в бассейне северо-западной части Черного моря благодаря его способности занимать освобождающиеся экологические ниши и вытеснять менее устойчивые виды. Бычок-ратан (*Neogobius ratan* (Nordmann)) не обладает такой высокой приспособляемостью и пластичностью. В связи с этим интересным является изучение ряда физиологических показателей, которые могут объяснить высокую устойчивость и пластичность бычка-кругляка. Белки сыворотки крови представляют весьма лабильную систему, отражающую состояние организма и происходящие в нем изменения под влиянием внешних и внутренних факторов. В литературе мы не обнаружили работ, посвященных исследованию белков крови черноморских бычков. Нами найдена одна, довольно давняя, работа Н. И. Куликовой [3] о сывороточных белках бычков Азовского моря.

Изложенное выше и определило цель нашей работы — установить и сопоставить белковые спектры сыворотки крови бычка-кругляка и бычка-ратана.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на бычках-кругляках и бычках-ратанах, выловленных в акватории биологической станции ОНУ им. И. И. Мечникова в июле 2004 г.

Кровь для исследования отбирали из хвостовой артерии рыб. Полученную кровь центрифугировали, отделяя сыворотку от клеточных элементов. Сыворотку смешивали с экстракционным буфером [4] для стабилизации белков в соотношении 1 : 5.

Электрофорез белков сыворотки крови проводили в 10% полиакриламидном геле по методу Дэвиса [5] на установке для электрофореза "Helicon". После окончания электрофореза гели окрашивали раствором кумасси, содержащим 9–10 % уксусной кислоты и 40–45% этанола (по объему). Рабочая концентрация красителя составляла 0,1 %, продолжительность окрашивания 3,5 часа [6]. После окрашивания гели промывали от несвязавшегося с белком красителя путем многократного вымачивания в свежих порциях 7% уксусной кислоты.

Электрофореграммы (ЭФ) сканировали и с помощью компьютерной программы для анализа электрофоретических спектров (Ана-ИС) определяли относительную подвижность (Rf) каждой обнаруженной фракции. В качестве контроля для определения местоположения фракций использовали бычий сывороточный альбумин фирмы Serva. Фракции белков на электрофореграммах нумеровали, начиная с наиболее подвижной.

Проанализировали белковый спектр сыворотки крови 36 бычков-кругляков (22 самцов и 14 самок) и 16 бычков-ратанов (10 самцов и 6 самок).

Результаты исследования и их обсуждение

При разделении сывороточных белков крови млекопитающих выявляются следующие белковые фракции: альбумины, α_1 -, α_2 -, β - и γ -глобулины. Однако оказалось, что белковый спектр крови рыб более сложен и при разделении сывороточных белков крови рыб в полиакриламидном геле выявляется большее количество фракций, чем у млекопитающих. Это позволило ряду авторов выделить дополнительные фракции и расположить их в порядке возрастания электрофоретической подвижности следующим образом: преальбумины, альбумины, α_1 -, α_2 -, β_1 -, β_2 -, γ -глобулины [7, 8].

Электрофоретическое разделение сывороточных белков крови бычковых рыб продемонстрировало сложный белковый состав, что значительно усложнило идентификацию отдельных фракций (рис. 1).

При анализе полученных протеинограмм бычка-кругляка выявлено 27, различающихся относительной подвижностью, фракций белка (табл. 1).

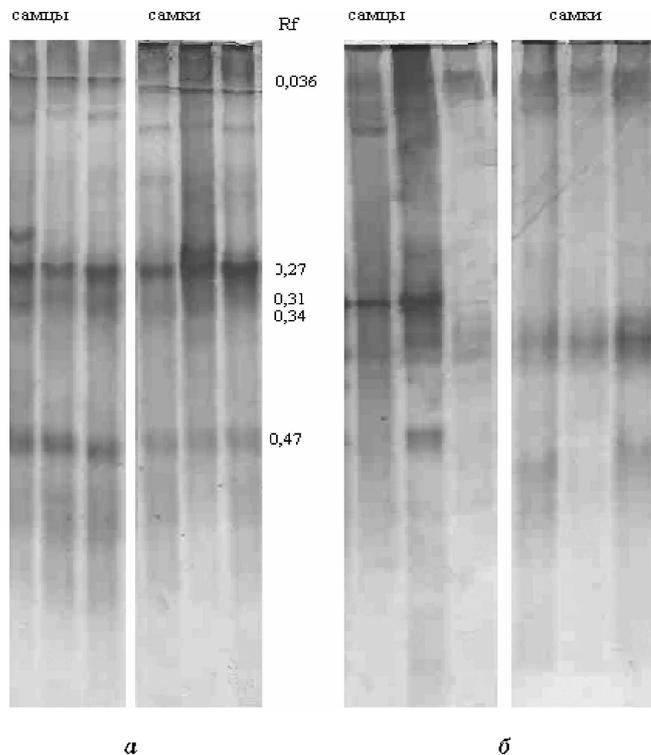


Рис. 1. Электрофореграммы сывороточных белков черноморских бычков (а — бычок-кругляк; б — бычок-ратан)

Разделение фракций белков сыворотки крови бычков на пре-, альбуминовые и глобулиновые мы осуществили после сравнения полученных протеинограмм с протеинограммами сывороточных белков рыб, проведенных рядом авторов [3, 8, 9], а также бычьим сывороточным альбумином.

Фракции с 1 по 5 мы отнесли к преальбуминовым, с 6 по 13 — к альбуминовым, а с 14 по 27 — к глобулиновым.

В крови отдельных бычков выявлялись не все обнаруженные нами фракции. Протеинограммы образцов сыворотки крови бычков-кругляков содержали от 7 до 13 полос. Белковый состав сыворотки крови бычка-ратана был менее разнообразен по сравнению с бычком-кругляком и на протеинограммах выявлялось не более 6–11 полос (рис. 1).

У самцов бычка-кругляка обнаруживаются как белки, встречающиеся в сыворотке крови у 95–100% особей (фракции 6, 13), так и более редкие минорные белки. Фракции 15, 23–26 встречаются на протеинограммах у 70–89% кругляков; фракции 2–4, 11, 16 — с частотой 30–50%. Все остальные фракции обнаруживаются менее чем у трети бычков, т. е. с частотой меньше 30% (рис. 2).

Таблица 1

Частота встречаемости (%) белковых фракций в сыворотке крови рыб семейства Бычковые

Характеристика фракций			Бычки-кругляки		Бычки-ратаны	
	№ фракции	Rf отдельных фракций	самцы	самки	самцы	самки
			n=22	n=14	n=10	n=6
I Глобулиновые	27	0.015	27.3	35.7	10.0	35.0
	26	0.036	81.9	85.7	100.0	68.2
	25	0.071	77.3	71.4	70.0	68.2
	24	0.080	77.3	57.1	30.0	68.2
	23	0.096	72.7	71.4	20.0	68.2
	22	0.120	13.6	50.0	20.0	38.1
	21	0.160	31.8	42.9	–	–
	20	0.180	36.4	71.4	50.0	–
	19	0.200	9.1	14.3	–	–
	18	0.220	9.1	21.4	–	–
	17	0.230	18.2		20.0	
	16	0.240	50.0	50.0	50.0	65.4
	15	0.270	86.1	100.0	50.0	31.3
14	0.290	9.1	–	40.0	–	
II Альбуминовые	13	0.310	100.0	100.0	40.0	34.3
	12	0.330	9.1	21.4	–	–
	11	0.340	36.4	78.6	80.0	65.2
	10	0.360	18.2	21.4	40.0	100.0
	9	0.370	9.1	28.6	20.0	
	8	0.390	13.6	–	–	–
	7	0.430	22.7	21.4	–	–
	6	0.470	95.5	100.0	40.0	33.3
III Преальбуминовые	5	0.490	9.1	–	–	–
	4	0.520	45.5	35.7	30.0	31.0
	3	0.53	40.9	35.7	–	33.6
	2	0.54	31.9			35.1
	1	0.75	4.5	–	–	–

Примечание: "–" — отсутствие белковых фракций на ЭФ.

В сыворотке крови самок имеются постоянные белки (частота 100%), представленные альбуминовыми фракциями 6, 13 и глобулиновой фракцией 15; часто встречаются белки, соответствующие альбуминовой фракции 11 и глобулиновым фракциям 20, 23, 25, 26.

В крови самок отсутствует ряд фракций (1, 2, 5, 8, 17), которые обнаружены в сыворотке крови самцов с частотой менее 30% (рис. 2).

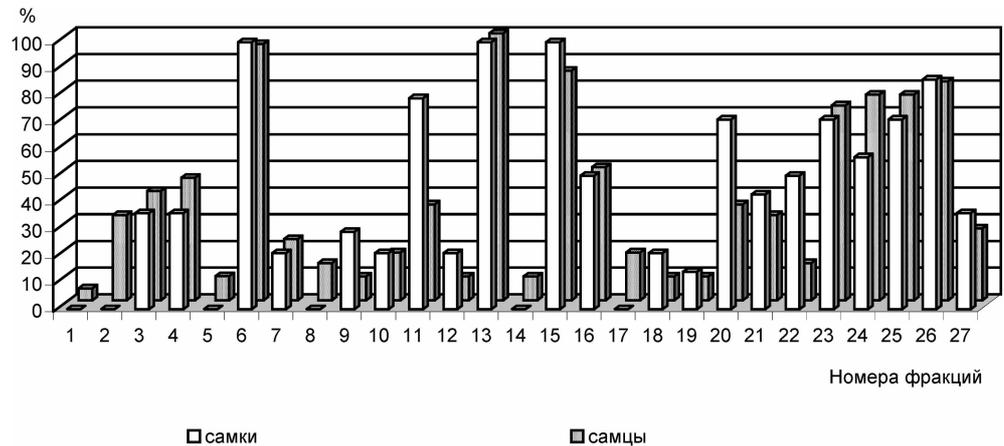


Рис. 2. Частота встречаемости белковых фракций в сыворотке крови бычка-кругляка

При сравнении протеинограмм самцов и самок бычка-кругляка видно, что у самцов содержится большее количество полос, чем у самок, что указывает на большее разнообразие белков в сыворотке крови самцов в данный период исследования. В то же время альбуминовые фракции 6, 13 и глобулиновая фракция 15 встречаются практически на ЭФ всех особей (90–100%) независимо от пола. У обоих полов с высокой частотой (60–80%) на ЭФ встречаются глобулиновые фракции 23–26. Вышеупомянутые фракции, совпадающие по частоте встречаемости у самцов и самок, вероятно, можно отнести к "видовым" фракциям. Значительное разнообразие протеинограмм отмечается в области редко встречающихся, по всей видимости, индивидуальных фракций сывороточных белков.

На ЭФ сывороток крови бычка-ратана выявляется меньшее количество полос, чем у бычка-кругляка. Так, на имеющихся ЭФ самцов обнаружено 17 полос, из которых 6 относится к альбуминовым, а 11 — к глобулиновым фракциям. На ЭФ белков сыворотки крови самок выявлено 15 полос, из них альбуминовым соответствуют 7, а глобулиновым — 8 полос (табл. 1; рис. 3).

У всех самцов бычка-ратана встречается только одна глобулиновая фракция — 26. Из альбуминовых фракций наиболее постоянной является фракция 11 (частота встречаемости 80%). У всех самок бычка-ратана выявляется альбуминовая фракция 10, которая у самцов встречается редко. Преальбуминовые фракции 2, 3 у самцов вообще не встречаются.

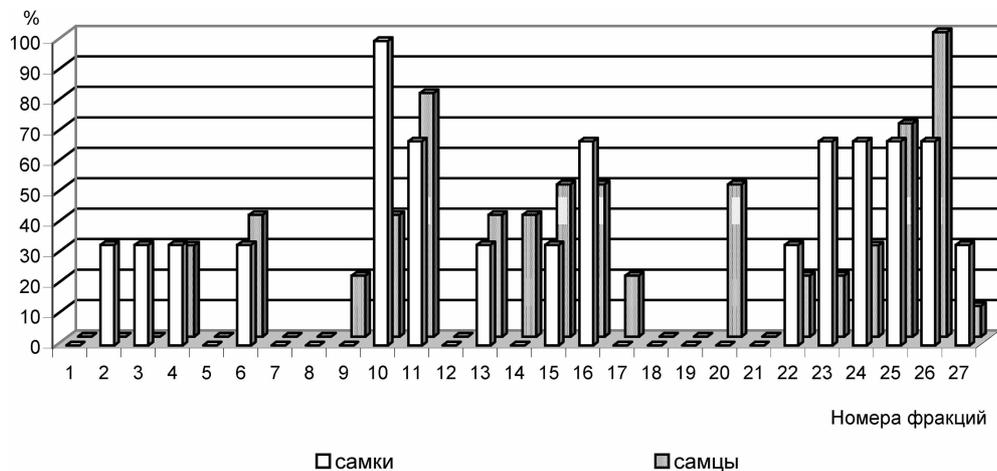


Рис. 3. Частота встречаемости белковых фракций в сыворотке крови бычка-ратана

Как видно, белковый спектр сыворотки крови бычков-ратанов является менее богатым по составу, чем у бычков-кругляков. Совпадение частот встречаемости отдельных фракций у самцов и самок менее выражено, чем у кругляков. Постоянные фракции, которые бы обнаруживались у всех особей бычков-ратанов, как у самцов, так и у самок, не выявлены. Таким образом фракции, частота встречаемости которых была бы достаточно высока для того, чтобы считать их характерными для данного вида, не выявлены.

Полученные данные свидетельствуют, что исследуемые виды бычковых рыб имеют весьма четкие различия по составу белков крови, благодаря чему их можно отличать друг от друга. Такая видоспецифичность, возможно, связана, с одной стороны, с особенностями биологии каждого вида, а с другой — является отражением генетических различий между представителями рода *Neogobius*.

Сопоставление белкового состава сыворотки крови у двух систематически близких видов указывает на более высокую гетерогенность белков крови бычка-кругляка. У бычка-ратана отмечается меньшее разнообразие сывороточных белков, в основном за счет отсутствия тех фракций, которые редко встречаются у бычка-кругляка (табл. 1, рис. 2, 3).

Высокая гетерогенность сывороточных белков, играющих исключительно важную роль в поддержании водно-солевого баланса, в обеспечении питания тканей и транспортировке биологически-активных веществ, металлов, метаболитов и др., может служить объяснением более высокого биологического потенциала и адаптационной пластичности бычка-кругляка — наиболее процветающего и многочисленного представителя рода *Neogobius* в Черном море.

Выводы

1. Электрофоретические спектры сывороточных белков исследованных представителей рода *Neogobius* характеризуются высокой гетерогенностью. Белковый состав сыворотки крови бычков-кругляков более разнообразен по сравнению с составом крови бычков-ратанов.

2. На протеинограммах крови самцов бычков-кругляков и бычков-ратанов, выловленных в июле, наблюдается большее количество полос, чем на протеинограммах крови самок.

3. В сыворотке крови бычков-кругляков выявлены альбуминовые и глобулиновые фракции, которые можно отнести к видоспецифичным. Фракций, характерных для всех особей бычка-ратана, не выявлено.

4. У бычков-кругляков и бычков-ратанов не обнаружено совпадения частот встречаемости одинаковых по электрофоретической подвижности белковых фракций сыворотки крови.

Литература

1. Голубцов А. С., Ильин И. И., Шайкин А. В. Электрофоретическая идентификация природных гибридов леща *Abramis brama* с плотвой *Rutilus rutilus* из Можайского водохранилища // *Вопр. ихтиологии*. — 1990. — Т. 30, вып. 5. — С. 870-874.
2. Лукьяненко В. И., Хабаров М. В., Лукьяненко В. В. Межгодовая внутривидовая изменчивость русского осетра северокаспийской популяции по количеству и частоте встречаемости различных фенотипов альбумина в речной период жизни // *Гидробиол. журн.* — 2003. — Т. 39, вып. 2. — С. 47-56.
3. Куликова Н. И. Электрофоретический анализ сывороточных белков некоторых видов бычков рода *Neogobius* Азовского моря // *Докл. АН СССР*. — 1965. — Т. 163, вып. 5. — С. 1285-1288.
4. Топтиков В. А., Дьяченко Л. Ф., Тоцкий В. Н. Влияние некоторых соединений на электрофоретические спектры множественных молекулярных форм пероксидаз // *Укр. біохім. журн.* — 1997. — Т. 69, № 1. — С. 41-49.
5. Davis B. F. Disk-elektroforesis. 2. Method and applikation to human serum protein // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — Vol. 121. — P. 404-427.
6. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. — М.: Наука, 1981. — 286 с.
7. Иваненков В. В., Камшилин И. Н. О возможности использования фракций альбумина осетровых рыб в качестве генетических маркеров для популяционных исследований // *Вопр. ихтиологии*. — 1991. — Т. 31, вып. 2. — С. 324-332.
8. Шубин П. Н. Электрофоретические исследования гемоглобина и белков сыворотки крови европейского хариуса *Thumallus thumallus* (L.) // *Вопр. ихтиологии*. — 1978. — Т. 18, вып. 2. — С. 371-373.
9. Паюсова А. Н. Электрофоретический анализ сыворотки крови двух видов иссык-кульских ельцов *Leuciscus smidti* (Herz) и *L. vergi kaschakarov* // *Вопр. ихтиологии*. — 1978. — Т. 18, вып. 5. — С. 900-906.

Л. П. Чумаченко¹, Т. В. Гладкій¹, Л. Ф. Дьяченко²

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,

¹ кафедра фізіології людини та тварин,

² кафедра генетики та молекулярної біології,

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

ФРАКЦІЙНИЙ СКЛАД БІЛКІВ СИРОВАТКИ КРОВІ ЧОРНОМОРСЬКИХ БИЧКІВ ((*PERCIFORMES*, *GOBIIDAE*))

Резюме

Електрофоретичні спектри сироваткових білків бичка-кругляка (*Neogobius melanostomus* (Pallas)) і бичка-ратана (*Neogobius ratan* (Nordmann)) характеризуються високою гетерогенністю. Білковий склад сироватки крові бичків-кругляків більш різноманітний у порівнянні з цим же показником бичків-ратанів. Припускається, що висока гетерогенність сироваткових білків бичка-кругляка може відображати його більш високий потенціал і адаптаційну пластичність.

Ключові слова: бичок-кругляк, бичок-ратан електрофорез, білки сироватки крові.

L. P. Chumachenko¹, T. V. Glagkyi¹, L. F. Diachenko²

Odessa National University,

¹ Department of Human Physiology,

² Department of Genetics and Molecular Biology,

Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

THE FRACTIONS OF SERUM PROTEINES IN BLOOD OF NEOGOBIUS MELANOSTOMUS AND NEOGOBIUS RATAN IN THE BLACK SEA

Summary

The electroforetical serum proteins spectrum of *Neogobius melanostomus* (Pallas) and *Neogobius ratan* (Nordmann) are rather heterogenic. *N. melanostomus* blood serum contains more different proteins, than blood in *N. ratan*. Possibly, high proteins heterogeneity in serum of *N. melanostomus* reflects their high potential and adaptational plasticity.

Keywords: *Neogobius melanostomus*, *Neogobius ratan*, electrophoresis, serum proteins.