

8. Универсальная установка для жидкостного колоночного электрофореза биополимеров / Л. Е. Король, Н. И. Коньшин, Г. Ю. Ажицкий, В. И. Андриенко // Молекулярная биология. — 1984. — Вып. 36. — С. 70—71.

Рост. гос. ун-т им. М. А. Суллова
Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 21.10.85

УДК 543.545

ОПЫТ АНАЛИТИЧЕСКОГО ИЗОЭЛЕКТРОФОКУСИРОВАНИЯ В СВЕРХТОНКИХ БЛОКАХ ПОЛИАКРИЛАМИДНОГО ГЕЛЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ АЛМАЛИТОВ — АМФОЛИТОВ-НОСИТЕЛЕЙ *

А. В. Шурхал, Г. Т. Азимбаева, А. В. Подогаз,
К. Б. Мусабеков, В. А. Пасечник

Введение. Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) является одним из наиболее распространенных и прогрессивных методов анализа свойств биологических полимеров. Принципиальная идея метода сформулирована в работах Колина и Свенсона (Рилби) (цитировано по [1]) и заключается в том, что макромолекулы, несущие заряд, под действием электрического поля мигрируют вдоль градиента рН, пока не достигнут соответствующего значения изоэлектрической точки (рI). В настоящее время успешно развиваются вопросы общей теории ИЭФ [2] и разработан широкий диапазон его методических модификаций [3]. В качестве субстрата для формирования градиента рН используются разнообразные химические агенты, однако наибольшее распространение получили синтетические амфолиты-носители, из которых более предпочтительными являются амфолиты, известные под коммерческими названиями «амфолины» производства «ЛКВ» (Швеция); «сервалиты» и «фармалиты», выпускаемые соответствующими фирмами «Seriva» (ФРГ) и «Pharmacia» (Швеция). В Советском Союзе ранее были предприняты попытки синтезировать собственные амфолиты [4, 5]. В данном сообщении представлены результаты опытов по аналитическому ИЭФ в сверхтонких слоях полиакриламидного геля (ПААГ), где амфолитами-носителями служили препараты, синтезированные в Казахском государственном университете им. С. М. Кирова.

Материалы и методы. Амфолит-носитель синтезирован в Казахском государственном университете им. С. М. Кирова на кафедре коллоидной химии и получил название «Алмалит». Синтез проведен на основе взаимодействия промышленных смесей полиэтилениполиаминов (ПЭПА) с непредельными карбоновыми кислотами при соотношении амино- и карбоксильных групп (N/COOH) в исходных реагентах 2:1. Реакцию проводили в круглодонной колбе, снабженной мешалкой, путем взаимодействия кислоты с водным раствором ПЭПА в течение 1 ч в токе инертного газа. Для завершения реакции смесь термостатировали при 70 °С в течение 5 ч. Синтезированный продукт получали в виде 40 %-ного водного раствора. Синтезированные таким образом алмалиты были исследованы методом ИЭФ в градиенте плотности сахарозы в колонке «ЛКВ» объемом 110 мл. В ходе опыта одновременно измеряли градиент рН, электропроводность и поглощение в УФ-части спектра при 280 нм. Свойства алмалитов в режиме ИЭФ исследованы методом аналитического ИЭФ в сверхтонких гелях полиакриламида. Техника приготовления растворов гелей, содержащих алмалиты-носители, формирование сверхтонких гелевых блоков и основные параметры режима ИЭФ описаны нами ранее [6]. В опытах использованы источники питания фирмы «Desaga» «Desatronic-2000», а также источники, разработанные в СКБ БФА, ИПЭ-2000-02 с режимом стабилизации по мощности. Префокусирование и разделение проводили при 4 °С. Распределение гради-

* Амфолиты-носители синтезированы в Казахском госуниверситете.

ента рН определяли с помощью поверхностного электрода фирмы «Ingold» при той же температуре. Продолжительность режима ИЭФ контролировали по количеству Вольт-часов, которое в опытах на тонких слоях составляло 3500. В качестве исследуемых образцов сложных белковых смесей применяли следующие материалы: водорастворимые экстракты семян нескольких видов хвойных из рода сосна — с целью изучения спектров ряда ферментов и определения изоэлектрических точек изоферментов, а также для изучения общего спектра водорастворимых белков растений; экстракты лизис-буфером (9,5 М мочевины, 2 %-ный меркаптоэтанол и 2 %-ный тритон X-100) для изучения спектров мембранных белков и белков цитоскелета; водные и лизис-буферные экстракты мышц близкородственных видов копытных млекопитающих для исследования спектров водорастворимых и мембранных белков мышечной ткани. Фиксацию, окрашивание электрофореграмм (ИЭФ) исследуемых ферментов и общих спектров белков проводили по ранее описанным методам [6, 7].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены результаты колоночного ИЭФ алмалита. Анализ этих данных показывает, что синтезированные алмалиты не обладают тем оптическим пропусканием при 280 нм, которое характерно для амфолинов «ЛКВ». Однако применение многократной очистки алмалитов активированным углем позволяет значительно снизить поглощение в указанном спектре (рис. 2). Здесь уместно заметить, что для целей аналитического ИЭФ в гелевых блоках этот параметр не является существенным.

Молекулярно-массовое распределение (ММР) для синтезированных алмалитов определяли методом гель-фильтрации на сефадексе G-25. Для калибровки использовали белки с различной молекулярной мас-

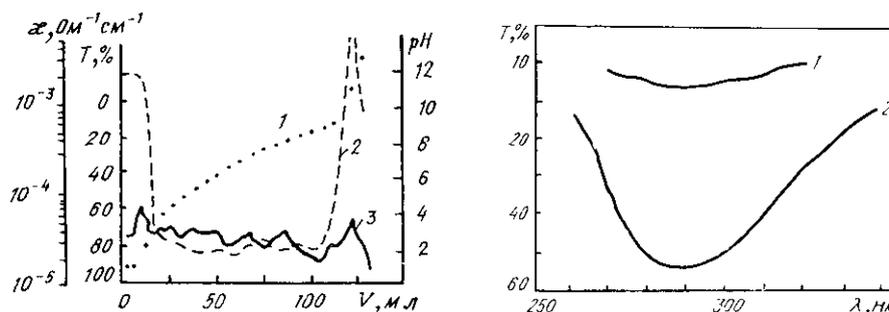


Рис. 1. Результаты ИЭФ амфолига-носителя (алмалита) в колонке: 1 — градиент рН 4—9; 2 — изменение пропускания (T , %) вдоль градиента рН; 3 — изменение удельной электропроводности (κ , $\text{Ohm}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) при E_{230} вдоль градиента рН.

Fig. 1. Results of isoelectrofocusing of carrier-ampholyte (almalite) in column: 1 — pH gradient of 4-9; 2 — change of transmission (T , %) along pH gradient; 3 — change of conductivity (κ $\text{ohm}^{-1} \text{cm}^{-1}$) at E_{280} along pH gradient.

Рис. 2. УФ-спектры алмалита: 1 — необесцвеченный; 2 — обесцвеченный многократной обработкой активированным углем.

Fig. 2. UV patterns of almalyte: 1 — undestained; 2 — destained by manifold treatment with activated carbon.

сой. Установленная в этом опыте форма ММР соответствует требованиям, предъявляемым к амфолигам-носителям, диапазон распределения составляет 500—1000.

Для определения буферной емкости готовили элюаты девяти последовательных фракций после проведения ИЭФ в полиакриламидном блоке. Выделенные фракции исследовали потенциометрическим титрованием для определения буферной емкости амфолига-носителя вдоль градиента рН. Как показали результаты анализа (рис. 3), буферная емкость синтезированных алмалитов в диапазоне рН 4—9 имеет тот же порядок, что и у амфолинов «ЛКВ» и приблизительно равна $4 \mu\text{-экв/рН} \cdot \text{мл}$. Поскольку цель настоящего сообщения обобщить опыт ИЭФ в тонких слоях ПААГ, то более подробное описание анализа алмалитов на колонке и приготовления элюатов будет опубликовано в дальнейшем.

Для изучения свойств алмалитов в условиях ИЭФ на блоках полиакриламидных гелей были проведены опыты по разделению сложных смесей белков. В качестве исследуемых образцов применяли тестерные смеси маркерных белков с известными значениями изоэлектрических точек, а также экстракты водорастворимых и мембранных белков нескольких видов растений и животных. На рис. 4, А представлены спек-

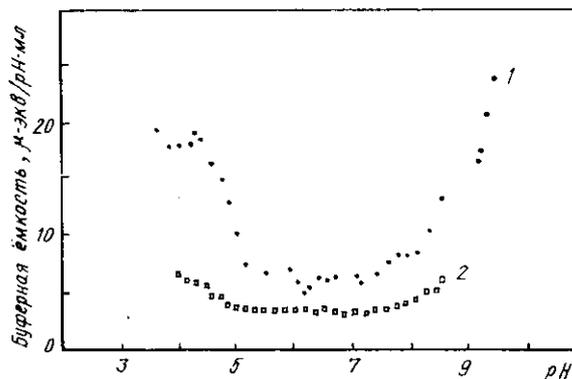


Рис. 3. Изменение буферной емкости в градиенте pH 4—9: 1 — амфолин «ЛКВ»; 2 — алмалит.

Fig. 3. Change of buffer capacity in pH gradient of 4—9: 1 — «ЛКВ» ampholine, 2 — almalite.

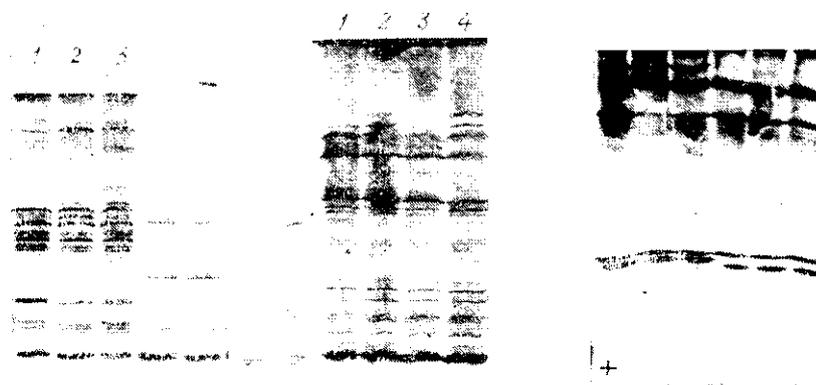


Рис. 4. ИЭФ-спектры маркерных белков и белков сыворотки крови баранов: 1—4 — разные препараты сыворотки крови. А — на амфолинах «ЛКВ»; Б — на алмалитах. Минус сверху.

Fig. 4. IEF patterns of marker proteins and serum blood proteins of sheep (minus on the top): 1—4 — sera of sheep. А — gel with «ЛКВ» ampholines; Б — with almalites.

Рис. 5. ИЭФ-спектры экстрактов водорастворимых белков мышечной ткани косули. Минус сверху.

Fig. 5. IEF patterns of soluble proteins extracted from roe muscle tissue (minus on the top).

ры маркерных белков и белков сыворотки крови баранов на амфолинах «ЛКВ», на рис. 4, Б — на алмалитах, синтезированных в Казахском госуниверситете. По распределению фракций маркерных белков разделение в градиенте pH на алмалитах достаточно надежно воспроизводит спектр тех же белков на амфолинах «ЛКВ» с незначительной поправкой на различие в диапазонах pH. Имеющиеся в нашем распоряжении данные позволяют предположить, что некоторое искривление фракций на алмалитах (рис. 4, Б) и более четкое разделение белковых зон на амфолинах «ЛКВ» (рис. 4, А) обусловлено не вполне оптимальным для алмалитов подбором растворов электролитов. На рис. 5 представлен спектр ИЭФ экстрактов водорастворимых белков мышечной ткани одного из наиболее распространенных видов копытных млекопитающих —

косули. В рамках программы по изучению генетической структуры географических форм проведена серия исследований с применением алмалитов, на рисунке проиллюстрирован один из вариантов, когда метод позволяет выявить различия по изоэлектрическим точкам между водорастворимыми белками.

Как известно, разделение смесей белков растительного происхождения в отличие от экстрактов из тканей животных сопряжено с известными трудностями, в частности вследствие насыщенности первых

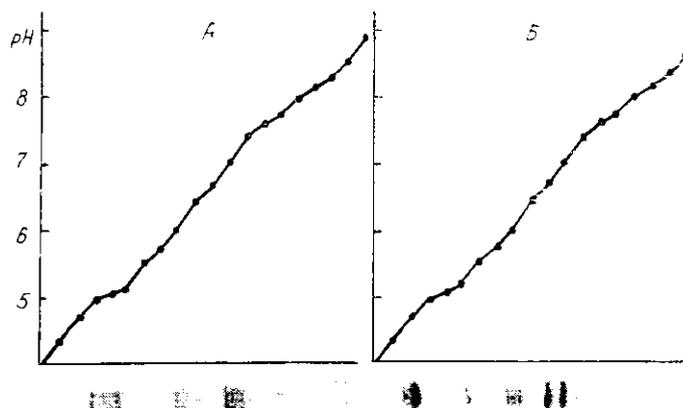


Рис. 6. ИЭФ-спектры ферментов эндосперма сосны сибирской и градиенты рН в геле: А — глюкозофосфатизомераза; В — эстераза.

Fig. 6. IEF patterns of enzymes from cedar pine endosperm, and pH gradient in gel: A — glucose-phosphate isomerase; B — esterase.

фенольными соединениями. Именно по этой причине особое значение имеют такие методы, которые позволяют достаточно надежно дифференцировать биохимические генные маркеры растений, в том числе множественные наследственные изоформы ферментов. Для того чтобы изучить, в какой мере пригодны алмалиты для решения этих проблем, нами были предприняты попытки исследовать водорастворимые экстракты растительных тканей с последующим гистохимическим окрашиванием ИЭФГ для выявления различных классов ферментов: гидролаз, изомераз и дегидрогеназ. На рис. 6, А представлена ИЭФГ глюкозофосфатизомеразы (ГФИ) из тканей эндосперма сосны сибирской. В конце опыта построена форма градиента рН с помощью поверхностного электрода, что позволило охарактеризовать выявленные изоферментные формы ГФИ по их изоэлектрическим точкам. Было выявлено пять фракций изоферментов ГФИ, которые кодируются тремя локусами и обладают значениями pI соответственно: 4,8; 5,2; 5,3; 5,8; 6,7. Аналогичным методом изучен ИЭФ-спектр другого класса ферментов-гидролаз — эстеразы (ЭС) (рис. 6, В). Обнаружено восемь фракций изоферментов ЭС, кодируемых четырьмя локусами. Значения pI изоферментов ЭС распределены соответственно: 4,6; 4,8; 5,3; 5,9; 6,05; 6,2; 6,6 и 6,95. Таким же образом был изучен ИЭФ-спектр одного из ферментов класса дегидрогеназ ФГД. Что касается характера распределения градиента рН, создаваемого алмалитами в плоских нормальных и сверхтонких гелях, то форма градиента во всех изученных партиях алмалитов была прямой и достаточно надежно воспроизводилась, а форма градиента одной партии воспроизводится даже в деталях. Все упомянутые опыты по ИЭФ с помощью алмалитов были проведены по разделению смесей водорастворимых белков, между тем в последнее время все большее внимание исследователей уделяется классу мембранных белков, как наиболее важным биологическим макромолекулам в функциональном и эволюционном аспектах. С этой целью нами были подобраны условия для исследования мембранных белков методом ИЭФ с применением

алмалинов. На рис. 7 представлены спектры мембранных белков некоторых видов хвойных и цветковых растений. Препараты мембранных белков растений готовили из тканей семян сосны и стебля примулы, для этой цели применяли лизис-буфер, содержащий 9 М мочевины и 2 %-ный меркаптоэтанол. Результаты разделения с помощью алмалинов воспроизводятся в достаточно высокой степени и на представленной ИЭФГ можно обнаружить определенные различия в спектрах мембранных белков исследованных видов.

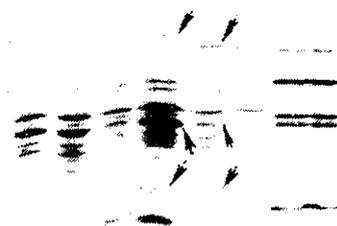


Рис. 7. ИЭФ-спектры мембранных белков некоторых видов хвойных и цветковых растений (стрелками показаны различия). Минус сверху.

Fig. 7. IEF patterns of membrane proteins of some species of coniferous and flower plants (differences are indicated by (↑)) (minus on the top).

Таким образом, результаты нашего опыта по применению алмалинов для целей ИЭФ сложных смесей белков в нормальных и сверхтонких гелях позволяют заключить, что при использовании алмалинов-носителей, синтезированных в Казахском госуниверситете для целей ИЭФ в плоских гелях, по всей длине пластины формируется ровный градиент pH. Форма и характер градиента pH на алмалитах имеют равномерное и прямолинейное распределение значений pH. Инфраструктура формы градиента pH воспроизводится в опытах одной серии синтеза, а также в разных партиях алмалинов. Кроме того, можно сделать заключение о том, что в градиенте pH, образованном на алмалитах, эффективно распределяются сложные смеси водорастворимых и мембранных белков из тканей различных видов растений и животных. Существенно, что алмалины не обладают ингибирующим эффектом в отношении трех основных классов ферментов: гидролаз, изомераз и дегидрогеназ, поскольку для соответствующих ферментов этих классов (эстеразы, фосфоглюкозонизомеразы и б-фосфоглюконатдегидрогеназы) выявлены спектры активных фракций в присутствии алмалинов. Таким образом, на основании представленных данных можно утверждать, что в Казахском госуниверситете отработаны методы синтеза амфолитов-носителей, способных создавать устойчивые формы градиента pH, для аналитического ИЭФ в плоских блоках ПААГ.

EXPERIENCE OF ANALYTICAL ISOELECTROFOCUSING IN ULTRATHIN-LAYER PAGE USING ALMALITES, CARRIERS-AMPHOLYTES

A. V. Shurkhal, G. T. Azimbaeva, A. V. Podogas, K. B. Musabekov, V. A. Pasechnik
N. I. Vavilov Institute of General Genetics,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

Results obtained from examination of carriers-ampholytes (hereafter named «almalite») prepared at the Kazakh State University by IEF in column of sucrose density are presented: pH gradient is constructed, conductivity and absorption of 280 nm UV light are measured. Almalite is used for analytical IEF in thin-layer PAGE. Linearity and stability of the formed pH gradient are shown. Isoelectric separation of enzymes, soluble and membrane proteins of various plants and animals is conducted. Conclusions are made that almalites do not inhibit some enzymes and effectively separate complex mixtures of soluble and membrane proteins of plants and animals.

1. Righelli P. G., Drysdale J. W. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: isoelectric focusing. — Amsterdam: North Holland Publ. Co., 1976.—260 p.
2. Бабский В. Г., Жуков М. Ю., Юдович В. И. Математическая теория электрофореза. — Киев: Наук. думка, 1983.—204 с.
3. Kolin A. Evolution of ideas in electrophoretic developments—selected highlights // Electrophoresis'82. — Berlin—New York: Walter de Gruyter and Co., 1983. — P. 3—48.
4. А. с. 802310 СССР, С08 G 73/02. Синтетический амфолит-носитель для разделения биополимеров методами изоэлектрофокусирования и изотахофореза // А. П. Мурель, Ю. Р. Сийгур // Открытия. Изобретения. — 1981. — № 5. — С. 90.
5. Мурель А. П. Синтез улучшенных и недорогих амфолитов-носителей для изоэлектрофокусирования // Известия АН ЭССР. — 1980.—29, № 3. — С. 201—209.
6. Шурхал А. В., Подогаз А. В., Алухов Ю. П. Генетический полиморфизм и редкие варианты α_1 -антитрипсина в населении Москвы. Исследование с помощью изоэлектрофокусирования в сверхтонком геле // Генетика. — 1984.—20, № 12. — С. 2066—2069.
7. Алухов Ю. П., Хильчевская Р. И., Шурхал А. В. Уровни полиморфизма и гетерозиготности русского населения Москвы: данные о 22 генных локусах, кодирующих белки крови // Там же. — 1981.—17, № 3. — С. 548—555.

Ин-т общ. генетики им. Н. И. Вавилова АН СССР,
Москва

Получено 21.10.85

УДК 578.087.9

ИЗОТАХОФОРЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ БИОСИНТЕЗА CoA КУЛЬТУРОЙ *STREPTOMYCES LAVENDOFUSEUS*

А. Х. Жагарс, А. А. Зелтиньш, Д. Я. Павловича,
Ю. А. Земитис, Я. Я. Дрегерис

Введение. Капиллярный аналитический изотахофорез (ИТФ) имеет ряд важных преимуществ перед другими аналитическими электрофоретическими и хроматографическими методами. Изотахофоретическое разделение происходит в капилляре из непроводящего материала с внутренним диаметром 0,4—0,6 мм, на одном конце которого находится неподвижный детектор, в капилляре устранен гидродинамический поток и нет опорной среды. Это дает высокую воспроизводимость анализа, возможность проведения разделения при любых значениях рН от 2 до 12 и анализа белков без денатурации и предварительного обесцвечивания. Применение в качестве электролитов таких популярных веществ, как трис, β -аланин, глицин, HCl, CH_3COOH и др., и малый расход (~ 1 мл) разбавленных (0,01—0,001 М) растворов делают этот метод очень экономичным. По времени анализа (10—20 мин), объему образца ($\sim 0,5$ —50 мкл) и количеству детектируемого вещества (10^{-9} — 10^{-10} моль) капиллярный ИТФ особенно пригоден в биохимии для исследования хода и продуктов ферментативных реакций [1—3].

Проблема получения биологически активных веществ путем микробиологического синтеза связана с несколькими этапами исследования: получение культуры продуцента, подбор наиболее подходящих условий культивирования, выделения необходимого продукта. Очень важно наличие удобной и легко осуществимой методики анализа для контроля биосинтеза.

Культура *Streptomyces lavendofuscus* является продуцентом кофермента А (CoA): при росте стрептомицета на простой минеральной среде без предшественников биосинтеза в культуральной жидкости выделяется CoA [4]. По-видимому, у *Streptomyces lavendofuscus* существует активный CoA-синтезирующий ферментный комплекс, способный осуществить биосинтез CoA из предшественников с высоким выходом, что необходимо было проверить.

В работе с продуцентом CoA неизбежно возникает проблема определения кофермента. В практике обычно используют традиционные ферментативные методы определения [5, 6], вполне пригодные в скрининг-