

вої фізики робиться спроба визначити роль біополімерів в організації нативної структури клітин та їх захисну функцію при зміні температури і вологості. Показано, що білки можуть утворювати структурний каркас клітини і зберігати внутрішні резерви для переходу до життєдіяльного стану при поверненні у фізіологічні умови.

Summary

Unlike membranes which limit the size of a cell, the problems on the principle of inside structure organization of a cell under unfavourable conditions of the environment, in particular during the change of cell or organism in the state of a xero- or kryoanabiosis have not examined yet. An attempt to determine the role of biopolymers on organizing of nature structure cells and their protective function while changing the temperature and the humidity is being done from the point of view of statistical physics. It is shown that proteins are able to form the structure skeleton of a cell and to keep inside reserves for coming back to a vital state when it is placed in physiological conditions.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Голдовский А. М. Анабиоз и его практическое значение.— Л.: Наука, 1986.— 168 с.
2. Де Дюв К. Путешествие в мир живой клетки.— М.: Мир, 1987.— 255 с.
3. Тарусов Б. Н. Биофизика.— М.: Высш. шк., 1968.— 567 с.
4. Tanaka T. Gels // Sci. Amer.— 1981.— 244, N 1.— P. 110—127.
5. Де Жен П. Иден скейлинга в физике полимеров.— М.: Мир, 1982.— 368 с.
6. Займан Дж. Модели беспорядка.— М.: Мир, 1982.— 591 с.
7. Шкловский Б. И., Эфрос А. Л. Электронные свойства легированных полупроводников.— М.: Наука, 1979.— 416 с.
8. Flory P. J. Elasticity activity the incomplemente networks // Macromolecules.— 1982.— 15.— P. 99—100.
9. Хохлов А. Р. Статистическая физика макромолекул.— М.: Изд-во МГУ, 1985.— 192 с.
10. Tanaka T. Collaps of gels and the critical endpoint // Phys. Rev. Lett.— 1978.— 40, N 12.— P. 820—823.
11. Hochberg A., Tanaka T., Nicoli J. Spinodal line and critical point of a acrylamide gels // Ibid.— 1979.— 43, N 3.— P. 217—219.
12. Grussley W. Elasticity and chain size in gauss networks // Macromolecules.— 1975.— 8.— P. 865—868.
13. Кузьмин Е. В., Кузьмина Р. И., Новошинский Г. Г. Модельное исследование анабиотических свойств протоплазмы // Гелеобразование и клеточный анабиоз.— Красноярск: Изд-во Ин-та физики Сиб. отд-ния АН СССР, 1989.— Ч. 3—54 с.

Краснояр. гос. ун-т

Получено 22.05.90

УДК 547.963.4

С. В. Коношенко, С. И. Чмелева

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ГЕМОГЛОБИНОВ ДВУХ ВИДОВ РЫБ: КАРПА (*CYPRINUS CARPIO L.*) И ТОЛСТОЛОБА (*HYBORHTHALMICHTHYS MOLITRIX*)

Методом изоэлектрофокусирования в градиенте рН 6:8 изучена микрогетерогенность гемоглобина карпа и толстолоба. Установлены видовые различия гемоглобинов в характере изоэлектрических спектров и в аминокислотном составе двух электрофоретически гомогенных фракций. Определены показатели сродства фракций гемоглобинов к кислороду.

Введение. Гемоглобин является одним из компонентов общей системы молекулярных механизмов адаптации, действие которых направлено на поддержание оптимального уровня жизнедеятельности организма в различных условиях существования. Имеющиеся в литературе данные

© С. В. КОНОШЕНКО, С. И. ЧМЕЛЕВА, 1991

ISSN 0233-7657. БИОПОЛИМЕРЫ И КЛЕТКА. 1991. Т. 7. № 3

73

[1—3] свидетельствуют о важном приспособительном значении структурно-функциональной гетерогенности гемоглобинов в регуляции кислородного режима у животных. В связи с этим большой интерес представляет сравнительное изучение гетерогенной системы гемоглобина у различных представителей позвоночных, в том числе у рыб, обитающих в условиях частого перепада давления кислорода.

Целью настоящей работы явилось сравнительное исследование видовой специфичности и гетерогенной системы гемоглобина двух видов прудовых рыб с одинаковыми условиями обитания. Были изучены осо-

Таблица 1

Характеристика (pI) изоэлектрических компонентов гемоглобинов карпа и толстолоба ($M \pm m$)

Characteristic (pI) of isoelectric components in *C. carpio* and *H. molitrix* hemoglobins

Объект исследования	Изоэлектрические компоненты				
	I	II	III	IV	V
Карп	6,8±0,03	7,27*±0,04	7,39*±0,03	7,62±0,02	—
Толстолоб	6,45±0,06	6,65±0,11	7,26±0,12	7,47±0,04	7,62*±0,08

* Компоненты с наиболее высоким содержанием белка.

бенности изоэлектрической гетерогенности, аминокислотный состав и сродство к кислороду гемоглобинов карпа и толстолоба, представителей семейства *Cyprinidae*.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили гемоглобины двух видов прудовых рыб: карпа (*C. carpio* L.) и толстолоба (*H. molitrix*). Кровь брали из хвостовой вены от 45—50 особей каждого вида. Гемоглобин выделяли из-под стромы по [4], гемолизируя эритроциты в присутствии дистиллированной воды и толуола. Фракционный состав гемоглобина изучали с помощью диск-электрофореза в 7 %-ном ПААГ [5]. Фракции гемоглобина выделяли препаративным электрофорезом в блоках 7 %-ного ПААГ [6]. Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере (рН 8,3) при напряжении 50 В и силе тока 10—20 мА на блок геля.

Изоэлектрофокусирование свежeweделенного оксигемоглобина осуществляли в колонках объемом 50 мл в градиенте рН 6,0 : 8,0, создаваемом сорбитом в различных концентрациях в борно-боратном буфере (рН 8,0) и в градиенте плотности сахарозы [7]. Изоэлектрофокусирование проводили в течение 24 ч в холодильнике при напряжении 400 В и силе тока 2,5 мА. В каждой пробе (1,5 мл) определяли рН и содержание белка (спектрофотометрически).

Аминокислотный состав белка изучали, применяя распределительную хроматографию на бумаге [8]. Белок гидролизovali в 6 н. НСI в запаянных ампулах при 105 °С в течение 24 ч.

Сродство электрофоретически гомогенных фракций гемоглобина к кислороду изучали с помощью построения кривых кислородной диссоциации [9]. Содержание метгемоглобина в растворах определяли по [10]; во всех исследуемых пробах уровень его не превышал 3 %.

Результаты и обсуждение. Методом диск-электрофореза в 7 %-ном ПААГ гемоглобины карпа и толстолоба разделяются на две электрофоретически гомогенные фракции: минорную (Нв-1) и главную (Нв-2), соотношение которых составляет в среднем 1 : 2.

При изоэлектрофокусировании в градиенте рН 6,0 : 8,0 проявляется более выраженная гетерогенность гемоглобинов. Гемоглобин карпа разделяется на четыре изоэлектрических компонента: два главных с рI 7,27 и 7,39 и два минорных с рI 6,8 и 7,62. Аналогичный спектр гемоглобина толстолоба представлен пятью изоэлектрическими компонентами: тремя главными с рI 7,27; 7,47; 7,62 и двумя минорными с рI 6,45 и 6,55 (табл. 1).

В изоэлектрических спектрах гемоглобинов прослеживаются как сходство, так и некоторые различия, связанные с количеством компонентов и величинами их pI . Общими являются компоненты с pI 7,26; 7,27 и 7,62.

Существует широкий диапазон изменений генетически детерминированной гетерогенности гемоглобина на постсинтетическом уровне. Причиной микрогетерогенности гемоглобинов могут быть различные модификации белка, например, гликозилирование, диссоциация тетрамерных молекул или их полимеризация [3].

Таблица 2

Количественное содержание аминокислот в электрофоретически гомогенных фракциях гемоглобина карпа и толстолоба ($M \pm m$)

Amino acid composition of electrophoretically homogeneous fractions in *C. carpio* and *H. molitrix* hemoglobins

Аминокислота	Карп		Толстолоб	
	Нв-1	Нв-2	Нв-1	Нв-2
Цистин	4,57±0,36	5,2±0,50	4,77±0,51	5,5±0,36
Лизин	6,38±0,21	3,98±0,30	6,69±0,27	4,02±0,14
Гистидин	3,39±0,22	3,15±0,50	3,23±0,24	3,27±0,30
Аргинин	2,4±0,14	2,55±0,20	4,63±0,30	3,03±0,15
Аспарагиновая кислота	10,4±0,25	9,25±0,30	12,3±0,18	9,9±0,30
Серин	5,68±0,49	5,69±0,25	5,98±0,51	6,0±0,17
Глицин	16,9±0,50	12,09±0,22	14,8±0,12	8,0±0,21
Глутаминовая кислота	7,46±0,48	9,76±0,44	7,2±0,40	9,49±0,11
Треонин	2,77±0,20	3,1±0,30	3,7±0,35	3,5±0,10
Аланин	7,6±0,30	7,32±0,20	7,8±0,40	6,65±0,10
Тирозин	5,5±0,45	5,0±0,50	5,3±0,45	4,96±0,33
Валин+Метионин	9,5±0,40	9,12±0,50	9,1±0,35	9,9±0,32
Фенилаланин	5,7±0,20	8,5±0,49	6,1±0,23	8,83±0,18
Лейцин+Изолейцин	10,7±0,50	9,84±0,50	10,0±0,48	9,32±0,21

В гетерогенной системе гемоглобина могут быть фракции, которые появляются в результате конформационных перестроек молекул вследствие окисления атома железа в гем-группах или же изменения остатков цистеина, расположенных на поверхности белка [11].

В табл. 2 представлены данные, полученные при изучении аминокислотного состава двух электрофоретически гомогенных фракций гемоглобинов карпа и толстолоба.

Результаты аминокислотного анализа свидетельствуют о различиях в химической структуре электрофоретически гомогенных фракций гемоглобинов, а также об их видовой специфичности, которая наглядно проявляется в содержании Arg, Asp и Gly. Общим для гемоглобинов данных видов рыб является достоверно большее содержание Glu и Phe и меньшее — Lys, Asp и Gly в главной фракции (Нв-2) по срав-

Таблица 3

Показатели полунасыщения кислородом и константы Хилла электрофоретически гомогенных фракций гемоглобина карпа и толстолоба

Oxygen semisaturation (P_{50} , mm Hg) and Hill constants (n) of electrophoretically homogeneous fractions in *C. carpio* and *H. molitrix* hemoglobins

Объект исследования	P_{50} , мм рт. ст.			
	Нв-1		Нв-2	
Карп	12±0,60	2,1±0,06	17±0,75	2,1±0,07
Толстолоб	13±0,64	1,7±0,05	18±0,70	1,4±0,09

нению с минорной, а также преобладание в главной фракции отношения дикарбоновых аминокислот к основным (1,99; 1,88 в Нв-2 и 1,47; 1,34 в Нв-1 у карпа и толстолоба соответственно). Существенно, что различия в аминокислотном составе главной и минорной фракций являются более выраженными, чем видовые различия между аналогичными фракциями гемоглобинов. Следует также отметить значительное сходство в аминокислотном составе главных электрофоретических фракций.

Методом построения кривых кислородной диссоциации были определены показатели полунасыщения кислородом (P_{50}) и константы Хилла (n) предварительно выделенных фракций Нв-1 и Нв-2 (табл. 3).

Согласно полученным данным, показатели полунасыщения кислородом гемоглобина карпа и толстолоба являются практически одинаковыми. Достоверно более высокое сродство к кислороду проявляет минорная фракция гемоглобинов ($P_{50}=12-13$ мм рт. ст.).

Вместе с тем имеются некоторые видовые различия в величинах константы Хилла, являющейся мерой кооперативного эффекта гемоглобинов. Наиболее высокий уровень кооперативности показан для главной фракции гемоглобина толстолоба ($n=2,4$).

Резюме

Методом изоэлектрофокусирования у градиенті рН 6:8 вивчена мікрогетерогенність гемоглобіну коропа та товстолоба. Виявлені видові розбіжності гемоглобіну в характері ізоелектричних спектрів та в амінокислотному складі двох електрофоретично гомогених фракцій. Визначені показники спорідненості фракцій гемоглобіну з киснем.

Summary

Microheterogeneity of hemoglobins in two fish species: *C. carpio* and *H. molitrix* has been studied by isoelectrofocusing within the pH gradient of 6:8. Species differences of these hemoglobins are shown in isoelectric spectra and amino acid composition of electrophoretically homogeneous fractions. The affinity to oxygen of hemoglobins fractions has been determined.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дударев В. П. Роль гемоглобина в механизмах адаптации к гипоксии и гипероксии.— Киев: Наук. думка, 1979.— 150 с.
2. Иржак Л. И. Гемоглобины и их свойства.— М.: Наука, 1978.— 235 с.
3. Стародуб Н. Ф. Гетерогенная система гемоглобина. Структурные особенности, физико-химические и функциональные свойства отдельных форм гемоглобина и их роль в биохимической адаптации организма к условиям жизни // Успехи соврем. биологии.— 1985.— 99, № 3.— С. 385—400.
4. Drabkin D. The crystallographic and optical properties of the haemoglobin of man in the comparison with those of other species // J. Biol. Chem.— 1946.— 164.— P. 703—706.
5. Davis B. Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1964.— 121, N 11.— P. 404—406.
6. Ажицкий Г. Ю., Багдасарьян С. Н. Возможность выделения мономерного иммунохимически чистого сывороточного альбумина // Лаб. дело.— 1985.— № 12.— С. 712—714.
7. Троицкий Г. В., Ажицкий Г. Ю., Малый К. Д. Изоэлектрофокусирование в системе борно-боратный буфер — маннит // Вопр. мед. химии.— 1976.— 22, № 4.— С. 282—286.
8. Пасхина Т. С. Количественное определение аминокислот на хроматограммах при помощи реакции с нингидрином // Биохимия.— 1954.— 19, № 5.— С. 702—705.
9. Шорохов Ю. А. Спектрофотометрический метод определения кривой диссоциации оксигемоглобина в кювете десатураторов // Физиол. журн.— 1974.— 9, № 4.— С. 654—657.
10. Benesch R. E., Benesch R., Yung S. Equations for the spectrophotometric analysis for haemoglobin mixtures // Anal. Biochem.— 1973.— 55, N 3.— P. 245—248.
11. Стародуб Н. Ф., Назаренко В. И. Гетерогенная система гемоглобина.— К.: Наук. думка, 1987.— 199 с.

Симфероп. гос. ун-т им. М. В. Фрунзе

Получено 21.06.90