чением эмбриоспецифических белков, по своему белковому составу отличается от сыворотки взрослых животных только в количественном, а не в качественном отношении. Эффект «отсутствия» таких белков, как α_2-макроглобулин, гаптоглобины, ν-глобулины, при использовании методов электрофореза на бумаге, агаре или даже иммуноэлектрофореза, объясняется не действительным их отсутствием, а очень низкой концентрацией их в сыворотке.

Находясь в небольшом количестве, эти белки не могут в достаточной степени обеспечивать нормальные физиологические потребности организма. Так, присутствие следов ν-глобулина в сыворотке крови плодов и новорожденных телят не может обеспечить надежную защиту от инфекции, поэтому практические выводы, сделанные на основе более ранних работ, сохраняют свое значение.

НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

ХОЛОД В. М.

Метод иммуноэлектрофореза является точным и высокоспецифическим методом исследования. Однако и до настоящего времени он не получил такого широкого распространения, как, например, электрофорез белков на бумаге. Это объясняется, с одной стороны, более сложной техникой выполнения, а с другой, — трудностями, с которыми приходится встречаться при расшифровке электрофореграммы. Довольно часто расшифровка иммуноэлектрофореграмм вообще не проводится, а просто описываются количество и взаиморасположение образовавшихся линий преципитации или они просто нумеруются в порядке увеличения электрофоретической подвижности. В настоящей работе мы приводим описание иммуноэлектрофоретической кар-

тины сыворотки крови крупного рогатого скота и даем идентификацию некоторых линий преципитации.

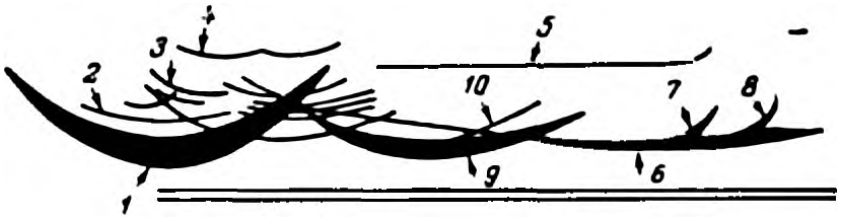
Материал и методика исследования. Для исследования использовали сыворотку крови крупного рогатого скота черно-пестрой породы. Антисыворотку получали путем длительной иммунизации кроликов смесью сывороток, взятых от 20—25 животных. Качество полученной антисыворотки проверяли путем определения титра антител реакцией кольцепреципитации или преципитацией в агаре. Кроме того, иммуноэлектрофоретически определяли спектр антител. Антисыворотки высокого титра, дающие наиболее богатый набор антител к белкам сыворотки крови крупного рогатого скота, использовали в работе.

Для постановки иммуноэлектрофореза использовали 1%-ный агаровый гель — агар Дифко на вероналмединаловом буфере с pH 8,6 и ионной силой 0,05. Электрофорез проводили на фотопластинках размером 9×12. Нами были изготовлены из плексиглаза электрофоретическая камера, подложка для стекол и штамп-матрица, с помощью которой формировалась траншея для иммунной сыворотки. Резервуары антигена диаметром 1,5 *мм* вырезали на расстоянии 1,5 *см* друг от друга. В качестве свидетеля электрофоретической подвижности использовали сывороточный альбумин, окрашенный синькой Эванса.

Электрофорез проводился при градиенте потенциала 4 *в/см* в течение 2—3 часов. После окончания электрофореза в траншеи заливали иммунную сыворотку и помещали пластинки во влажную камеру при температуре 37°С на 24—36 часов. Для удаления белков, не участвующих в специфической реакции преципитации, пластинку промывали в физиологическом растворе в течение 2 дней и затем высушивали под хроматографической бумагой при 37°С. Белки окрашивали амидочерным 10 В, липопротеиды — суданом черным, железосодержащие протеиды — бензидиновым реактивом.

Истощение антисыворотки против сыворотки крупного рогатого скота проводили, добавляя к ней сыворотку из расчета (5 : 1). Смесь инкубировали при 37°С в течение 1 часа, а затем выдерживали сутки при 4°С, центрифугировали, проверяли на полноту осаждения и использовали в иммуноэлектрофорезе.

Результаты исследования. Основными ориентирами при чтении иммуноэлектрофореграмм являются белки альбумин и γ^G -глобулин. Альбумин образует массивную, сильно изогнутую дугу преципитации, лежащую в анодной части фореграммы (рис. 1). Настолько же характерна и линия преципитации γ^G -глобулина. Наиболее характерной линией в средней части иммуноэлектрофореграммы является трансферрин. Линия преципи-



Иммуноэлектрофореграмма белков сыворотки крови крупного рогатого скота:
1 — альбумин; *2* — кислый серомукоид; *3* — железосодержащий α_1-глобулин; *4* — α_2-липопротеид; *5* — $\gamma M(\beta_2 M)$-глобулин; *6* — γG-глобулин; *7* — $\beta_2{}^B$-глобулин; *8* — $\gamma A(\beta_2 A)$-глобулин; *9* — трансферрин; *10* — гаптоглобин.

тации трансферрина образована группой белков, обладающих различной электрофоретической подвижностью (по результатам исследования в крахмальном и акриламидном геле), но имеющих одинаковую антигенную структуру. Функциональное значение этих белков в организме заключается в способности связывать и переносить железо (E. Giblef, 1959; Ogden и др., 1962). Присутствие железа в молекуле трансферрина позволяет идентифицировать его путем специфической покраски бензидиновым реактивом.

В человеческой сыворотке обнаруживается два вида белка, электрофоретическая подвижность которых превышает подвижность альбумина — преальбумин P_1 и P_2 (П. Грабар и П. Буртен, 1963). Иммуноэлектрофоретически с использованием разных антисывороток мы не обнаружили в сыворотке крупного рогатого скота белков с такой электрофоретической подвижностью. Возможно, это объясняется исключительно небольшим содержанием этих белков в сыворотке крови, лежащим или за пределами разрешающей способности данного метода или за пределами ответной реакции организма на введение антигена. Нужно отметить, что при электрофорезе в акриламидном геле иногда удается наблюдать очень тонкую фракцию впереди альбумина.

Следующую за альбумином группу белков — α-глобулины можно разделить на 2 подгруппы — α_1- и α_2-глобулины.

В зоне α_1-глобулинов обнаруживается тонкая и длинная линия преципитации, лежащая внутри дуги альбумина. При обычной технике иммуноэлектрофореза она почти всегда скрыта альбумином, но при разделении сыворотки крупного рогатого скота в агаровом блоке можно выделить фракцию, в которой она хорошо заметна. Этот белок идентифицирован в человеческой сыворотке как кислый серомукоид (П. Грабар, П. Буртен, 1963). В этой же группе белков обнаруживается тонкая линия преципитации, образуемая железосодержащим протеидом, что устанавливается покраской бензидиновым реактивом.

Вблизи от лунки с антигеном находится линия преципитации, окрашивающаяся суданом черным, — липопротеид. По своей электрофоретической подвижности он также может быть отнесен к α_1-глобулинам.

В α_1-глобулиновой области обнаруживается еще один-два вида белка (в зависимости от используемой иммунной сыворотки), химическая природа которых неизвестна.

В зоне α_2-глобулинов четко обнаруживаются 4—6 видов белков, хотя в действительности их, очевидно, больше, так как картина маскируется взаимным наложением дуг преципитации. Многие авторы (П. Грабар и П. Буртен, 1963; I. Moretti и др., 1959) относят к этой фракции и дугу преципитации гаптоглобина (по результатам исследования человеческой сыворотки). Согласно нашим данным, его правильнее причислить к β_1-глобулинам. Авторы иммуноэлектрофоретической классификации белков П. Грабар и П. Буртен сами отмечают, что эта классификация довольно условная, так как часто трудно решить, к какой группе относится изучаемое вещество, а многие соединения обладают промежуточной подвижностью. Кроме того, известно, что подвижность белков зависит от условий опыта, в частности, от качества агара, используемого для иммуноэлектрофореза. В связи с этим решать вопрос о причастности того или иного белка к данной группе правильнее всего на основе его химической идентификации.

В зоне β_1-глобулинов располагается обычно три белка, один из которых легко поддается идентификации (трансферрин). Несколько меньшей электрофоретической подвижностью обладает гаптоглобин. Определение положения гаптоглобина становится возможным вследствие его специфической способности образовывать комплексы гаптоглобин-гемоглобин, что дает возможность окрашивать эту дугу преципитации как и другие железосодержащие белки.

При истощении антисыворотки против сыворотки взрослого крупного рогатого скота сывороткой эмбриона или новорожденных телят и использовании такой антисыворотки в иммуноэлектрофорезе мы никогда не обнаруживали линии преципитации гаптоглобина. Это говорит за то, что в фетальный период он содержится в сыворотке в достаточных количествах, в отличие от сыворотки крови человека, где он появляется только через несколько недель после рождения.

В группе β_2-глобулинов также обнаруживается три линии преципитации β_2^B, β_2^A, β_2^M -глобулины, хотя по своим функциональным свойствам последние два белка принадлежат к иммуноглобулинам и согласно иной классификации обозначаются как γ^A и γ^M -глобулины. β_2^M (γ^M) -глобулин формирует тонкую линию преципитации, располагающуюся недалеко от резервуара с антигеном, вследствие высокого молекулярного веса и малой скорости диффузии. Дуги преципитации β_2^B и особенно β_2^A (γ^A) -глобулина в значительной своей части перекрываются массивной линией γ^G -глобулина. Некоторые авторы даже ставят под сомнение существование β_2^A -глобулинов (В. П. Кузнецов, 1968). Действительно, вследствие близкой электрофоретической подвижности и одинакового молекулярного веса (160 000) γ^G и β_2^A -глобулинов линия преципитации β_2^A-глобулина видна только в виде малозаметного «хвостика» в катодной части иммунофореграммы. Однако при препаративном разделении сыворотки крупного рогатого скота в агаре в катодных фракциях эта линия преципитации уже хорошо заметна.

И, наконец, γ-глобулины представлены длинной и массивной линией преципитации, γ^G-глобулина, на долю которых и приходится основная масса антител, имеющихся в сыворотке крови.

Линии преципитации γ^G, γ^A и γ^M -глобулинов обнаруживаются в сыворотке крови только в постэмбриональный период. Точно так же при использовании в иммуноэлектрофорезе иммунной сыворотки против сыворотки взрослого крупного рогатого скота, истощенной сывороткой плодов, мы всегда обнаруживали линии преципитации, соответствующие вышеуказанным γ-глобулинам.

ПРИБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАТАЛАЗЫ В ПРОДУКТАХ

СТЕПАНОВА М. А.

Совершенствование методов ветеринарно-санитарной оценки мяса, как и других продуктов животноводства, имеет чрезвычайно важное значение. Важность решения этой задачи объясняется тем, что рекомендованные и используемые методы экспертизы мяса сложны, требуют определенных условий и продолжительного времени на их выполнение, а получаемые результаты иногда дают противоречивые показатели.

Учитывая изложенное, мы разработали методику и технику определения качества мяса по активности каталазы с одновременным определением pH индикатором бромтимолблау в мясе здоровых и больных животных, используя для этой цели каталазник Функе (рис. 1).

Конструкция каталазника Функе проста в применении, но при бурнопротекающей реакции трудно отметить первоначальный объем исследуемого субстрата. Кроме этого, когда в трубку каталазника быстро вытесняется значительный объем исследуемой жидкости, в которой еще не закончилось разложение перекиси водорода, выделяющийся кислород поступает в окружающую среду и не учитывается. Недостатком каталазника Функе является то, что в нем можно определить каталазное число только до 10 единиц.

Чтобы избежать отмеченных недостатков, мы изготовили простой и более удобный в работе прибор