УДК 596. 537:576. 8. 06

П.А. Красочко, А.С. Шашенько, И.А. Красочко, В.В. Титок, С.И. Юренкова

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИЗОФЕРМЕНТНЫХ СПЕКТРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВНУТРИ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ЗУБРА

В последние годы благодаря использованию современной электрофоретической техники интенсивно развивается изоэнзимология – перспективное направление биохимической генетики, которое по сравнению с традиционной оценкой на морфологическом и физиологическом уровнях представляет собой широкие возможности для решения многих фундаментальных и частных вопросов генетики. Полученные в результате исследований данные позволяют выявлять не только число генов, детерминирующих отдельные ферментативные системы, их взаимодействие, тканевую и внутривидовую специфичность, локализацию ферментных локусов в группах сцепления и т. д., но и получать информацию о различных свойствах биологических систем от молекулярного до популяционного уровня. Основным методом изучения изоферментов является электрофоретическое разделение экстрактов в различных гелевых носителях: крахмальном, полиакриламидном, полиацетатном, агаровом – с последующей специфической гистохимической окраской для непосредственного выявления в гелях зон локализации фермента.

Изоферментные спектры, благодаря тому, что их состав в одних и тех же органах на определенных этапах развития организма определяется только генотипом, служат основой для установления степени гетерозиготности природных популяций. Так, исследования Lewontin and Hubby (1966) различных популяций дрозофилы при использовании в качестве маркеров 10 ферментов показали, что в среднем популяции гетерогенны по 30% локусов. При этом оказалось, что число полиморфных локусов в различных популяциях приблизительно одинаковое. В среднем большинство видов полиморфно по 30–50% исследованных локусов, а средняя гетерогенность генома составляет 7–15% (Аронштам и др., 1977). Было также показано, что уровень изменчивости млекопитающих (к примеру, у крыс и бурундуков) очень низкий, а некоторые их популяции полностью мономорфны. В настоящее время известно множество примеров мономорфизма биохимических локусов. У древесной лягушки восемь из двадцати белков, в том числе лактатдегидрогеназа, аспартат-аминотрансфераза, глютаматдегидрогеназа, малатдегидрогеназа инвариантны. Аналогичные данные получены для 6-фосфоглюконатдегидрогеназа человека. Опираясь на имеющиеся результаты Алтухов (1983) показал, что для биохимических признаков, связанных с жизненно важными функциями организма, изменчивость которых недопустима, характерен мономорфизм.

Задача настоящей работы заключалась в сравнительном анализе изоферментных спектров некоторых ферментов для оценки внутрипопуляционной изменчивости зубров.

Материал и методы.

Биохимические эксперименты были проведены на 61 образцах сыворотки и 15 гемолизатах эритроцитов зубров (Bos bonasus, L). Сыворотка и эритроциты хранились при -18°С.

7,5% полиакриламидный гель (концентрирующий pH 6. 8 и разделяющий pH 8. 9) готовили по Davis (1964). В качестве электродного буфера использовали трис-глициновый буфер pH 8.3. Электрофорез вели 30 мин при 10 мА на пластинку 9x11x0.3 см и 3 ч. 30 мин при 20 мА на вертикальном аппарате ПВ-15 фирмы "Биотех" (Минск), который помещали в холодильную камеру с температурой 4°С. Перед нанесением на гель сыворотку смешивали с 50%-ным глицерином для увеличения плотности раствора. Гемолизаты эритроцитов разбавляли в 2–3 раза трис-глициновым буфером pH 8.3, содержащем 0.005 М ЭДТА и 0.001 М b-маркаптоэтанол в качестве защитных добавок, и соединяли с 50%-ным глицерином. Для характеристики электрофоретической подвижности белка в данных условиях электрофореза рассчитывали относительную электрофоретическую подвижность (Rf) как отношение расстояния пройденного изоформой от начала рабочего геля к аналогичному расстоянию, пройденному красителями. После окончания электрофореза выявление ферментов проводили гистохимическими методами.

Для выявления изоферментов эстеразы и аспаратат-аминотрансферазы гели окрашивали диазометодом, основанном на образовании нерастворимого соединения (диазо-соль с нафтолом, освобождающимся при гидролизе субстратов ферментов) (Yeh, O 5, 0Nalley, 1980).

Электрофоретические фракции глюкозо-6-форсатдегидрогеназы (Г-6-ФД), малатдегидрогеназы (МДГ), алкогольдегидрогеназы (АДГ) и сорбитолдегидрогеназы (СДГ) определяли с помощью тетразолиевого метода, завершающая реакция которого состоит в восстановлении нитросинего тетразолия в присутствии феназинметосульфата до нерастворимого окрашенного формазана (Shaw, Prasad, 1970).

Результаты исследований.

Экстеразы – группа энзимов, катализирующих гидролиз сложных эфиров. Нами изучалась карбоксилэстераза (гидролаза эфиров карбоновых кислот. КФ 3.1.1.1) – гидролитический фермент, расщепляющий карбоксилэфирную связь в разнообразных органических соединениях. Как генетические маркеры эстеразы широко используются при исследовании популяций различных животных. У большинства видов эстеразный спектр контролируется многими неаллельными генами. В настоящее время известна хромосомная локализация генов, детерминирующих изоэстеразы.

Схемы электрофореграмм изоферментов эстеразы образцов сыворотки крови зубров представлены на рис. 1. Исследования

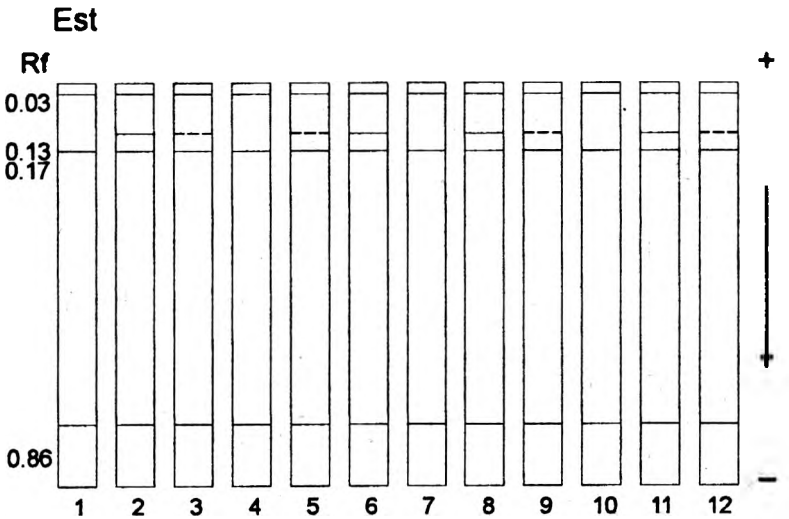
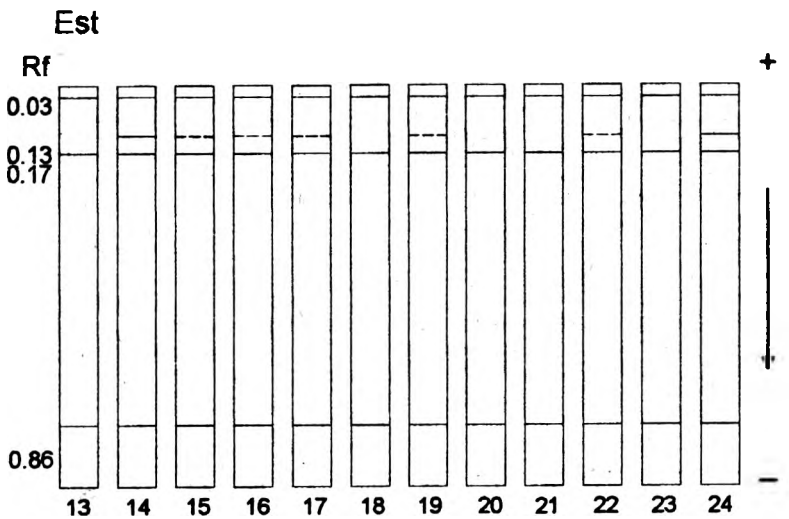
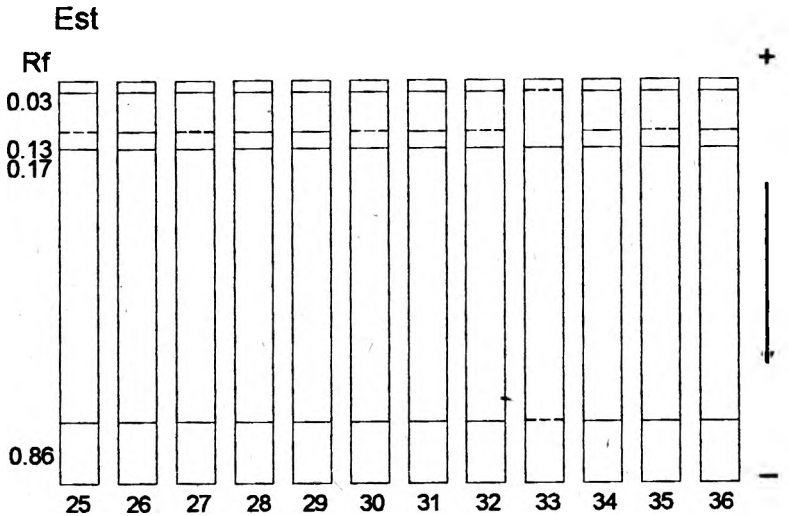


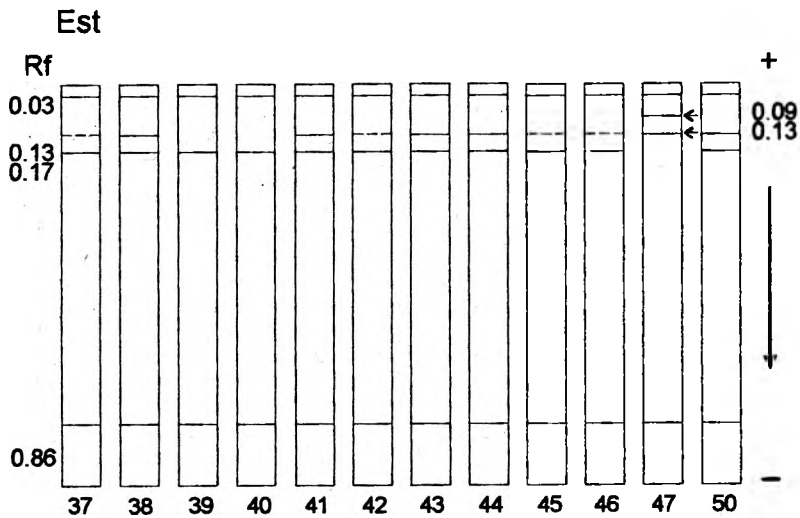
Рис. 1. Схема электрофореграммы изоферментов эстеразы сыворотки крови зубров



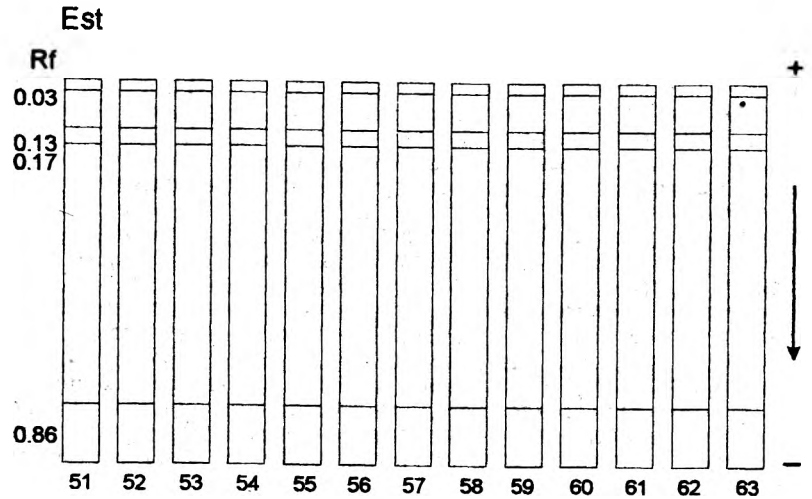
Продолжение рис. 1.



Продолжение рис. 1.



Продолжение рис. 1.



Продолжение рис. 1.

показали, что в сыворотке крови достаточно четко определяются несколько изоферментов эстеразы, а в гемолизатах эритроцитов обнаруживается только один компонент. Последний выявляется в медленной части спектра, что указывает на его относительно большой молекулярный вес. Rf этой фракции -0.17. Дальнейшие исследования для обнаружения различий между генотипами были проведены на сыворотке крови. Изоферментный спектр эстеразы, включающий три-четыре компонента, в зависимости от электрофоретической подвижности фракций условно можно разделить на две зоны (1, 11). В быстрой части спектра (1) обнаруживается только одна изоэстераза (Rf 0. 86), которая у всех анализируемых образцов имеет одинаковую электрофоретическую подвижность, однако по интенсивности ее проявления наблюдаются некоторые различия. У образцов 33 и 47 данная изоформа имеет низкую ферментативную активность, у 55 – высокую, судя по степени ее окрашивания на электрофореграммах. В медленной части (11) выявляется два-три компонента (Rh 0.03, 0.13 и 0.17). И именно в этой части электрофоретического спектра эстераз между анализируемыми образцами выявлены различия, которые выражаются в присутствии или отсутствии компонента с Rf 0.13. В сыворотке образцов 1, 4, 7, 10, 13, 18, 20, 21, 23, 33, 39 и 40 вышеназванного компонента не обнаружено. У остальных эта изоэстераза определяется, но имеет различную ферментативную активность. Так, у образцов 24, 38, 50, 53, 55 и 56 она представлена интенсивно окрашенным компонентом, у других – в виде минорной изоформы. По-видимому, локус, контролирующий синтез этого изофермента, имеет различную степень экспрессии в

зависимости от анализируемого образца. Следует отметить, что у образца 47 в этой части спектра две интенсивно окрашенные изоэстеразы обладают меньшей электрофоретической подвижностью (Rf 0.09 и 0.13), чем у остальных исследуемых генотипов (Rf 0.13 и 0.17). Возможно, локус, детерминирующий данные фракции эстеразы, состоит из нескольких аллелей, что и обуславливает полиморфизм фермента по электрофоретической подвижности.

Аспартат-аминотрансфераза (L-аспартат: 2-оксоглутарат-аминотрансфераза. КФ 2.6.1.1) катализирует обратимую реакцию переаминирования аминокислот и является частью ферментативной системы, с помощью которой утилизируется аспартат. Кроме того, этот фермент является связующим звеном между обменами аминокислот и углеводов. Многочисленные исследования показали, что ААТ находится в клетке в двух формах – митохондриальной и растворимой, которые отличаются друг от друга по молекулярной массе, аминокислотному составу и некоторым функциональным свойствам. Молекула фермента имеет димерную структуру, т. е. активные изоформы ААТ состоят из двух субъединиц.

В результате проведенного электрофоретического разделения ААТ из сыворотки и эритроцитов крови зубров не обнаружено каких-либо фракций фермента. Это может быть следствием как низкой активности ААТ, так и его невысоким содержанием в анализируемых тканях организма, в результате чего изоформы этого фермента не выявляются при данных условиях электрофореза.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Д-глюкозо-6-фосфат: НАДФ-1-оксидоредуктаза. КФ 1.1.1.49) – ключевой фермент пентозофосфатного цикла, в котором он катализирует реакцию дегидрирования глюкозо-6-фосфата. Г-6-ФД играет важную роль в метаболизме сахаров. Физиологическое значение пентозофосфатного цикла заключается в том, что в нем образуются пентозы, необходимые для синтеза рибонуклеиновых кислот, и НАДФН, который используется в различных пластических биосинтезах. В большей степени Г-6-ФД изучена у человека, в эритроцитах которого выявлен полиморфизм как по активности, так и по электрофоретической подвижности фракций фермента.

На рис. 2 приведены электрофореграммы Г-6-ФД эритроцитов крови зубров. В сыворотке крови фермент, по-видимому, имеет низкую ферментативную активность, в связи с чем он и не выявляется при гистохимическом окрашивании после электрофореза. Изоферментный спектр Г-6-ФД эритроцитов крови состоит из трех компонентов.

Сопоставление полученных электрофореграмм анализируемых образцов показало их идентичность по электрофоретической подвижности изоферментов. Были отмечены только количественные различия, которые выражались в степени проявления изоформ Г-6-ФД. таким образом, анализируемые образцы мономорфны относительно данного изоферментного признака. Из литературных данных известно, что уровень внутривидовой изменчивости Г-6-ФД у большинства изученных видов млекопитающих, за исключением человека, очень низкий (Аронштам и др., 1977).

Рис. 2. Схема электрофореграмм изоферментов глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы эритроцитов крови зубров.

Алкогольдегидрогеназа (Алкоголь: НАД-оксидоредуктаза. КФ 1.1.1.1) в организме животных и растений используется на последнем этапе спиртового брожения, восстанавливая ацетальдегид до этанола. Фермент имеет димерную структуру и контролируется несколькими локусами (Harris, Hopkinson, 1979). Продукты аллельных и неаллельных генов АДГ способны образовывать гетеродимеры.

Электрофоретическое разделение АДГ эритроцитов и сыворотки крови с последующим гистохимическим окрашиванием не позволило обнаружить спектр фермента, что может быть обусловлено специфичностью исследуемых тканей. Некоторые авторы (Хавкин, 1974) объясняют тканевую специфичность существованием специальной регулирующей системы, которая и определяет дифференциальное выражение генов, так как, по их мнению, в различных тканях организма присутствуют одни и те же белки и ферменты, но в неодинаковых количественных соотношениях.

Малатдегидрогеназа (L-Малат: НАД-оксидоредуктаза. КФ 1.1.1.37) присутствует в тканях животных и растений, участвуя в цикле Кребса, где она ответственна за перевод L-малата в оксалоацетат (Малер, Кордес, 1970). На разных видах показано, что у МДГ наблюдаются митохондриальные и цитоплазматические, или растворимые, формы, различающиеся по своей электрофоретической подвижности. Установлено, что в большинстве случаев

активная молекула фермента состоит из двух субъединиц (Harris, Hopkinson, 1978). У человека выявлен полиморфизм по митохондриальной и растворимой формам МДГ и обнаружены два неаллельных гена, контролирующих первичную структуру фермента.

На рис. 3 представлены схемы электрофореграмм изоферментов МДГ эритроцитов крови зубров. Поскольку в сыворотке этот фермент гистохимичееки не выявляется, эксперименты были проведены на гемолизатах эритроцитов. Спектр МДГ включает две-три, в большинстве случаев, высокоактивные фракции, среди которых доминируют быстроподвижные компоненты с Rf 0. 40 и 0. 48. В связи с тем, что данные фракции выявляются на энзимограммах всех анализируемых генотипов и имеют постоянную электрофоретическую подвижность, то это может указывать на отсутствие внутривидовой изменчивости по аллелям, контролирующим эти изоформы МДГ. Компонент с Rf 0. 35 обнаруживается только у образцов 5, 6, 7 и 14. Полученные результаты можно объяснить исходя из предположения о супрессии локуса, детерминирующего структуру этой изоформы МДГ у остальных генотипов.

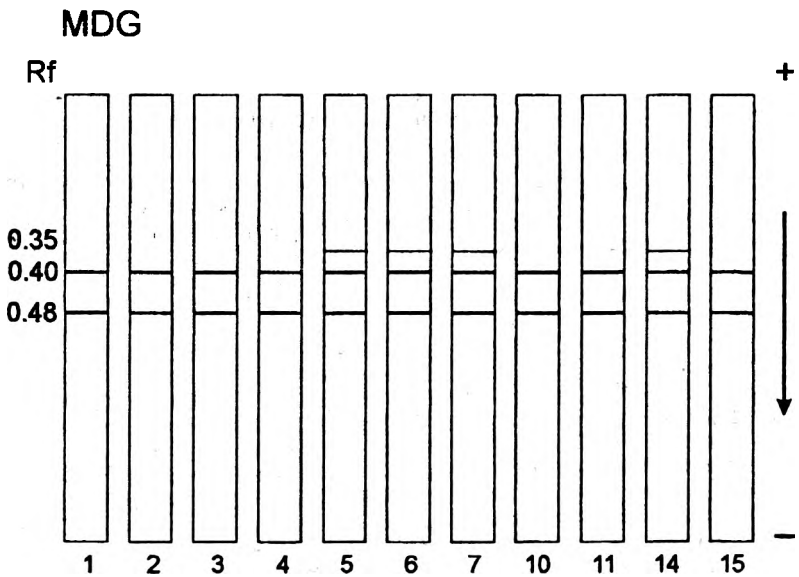


Рис. 3. Схема электрофореграмм изоферментов малат-дегидрогеназы эритроцитов крови зубров.

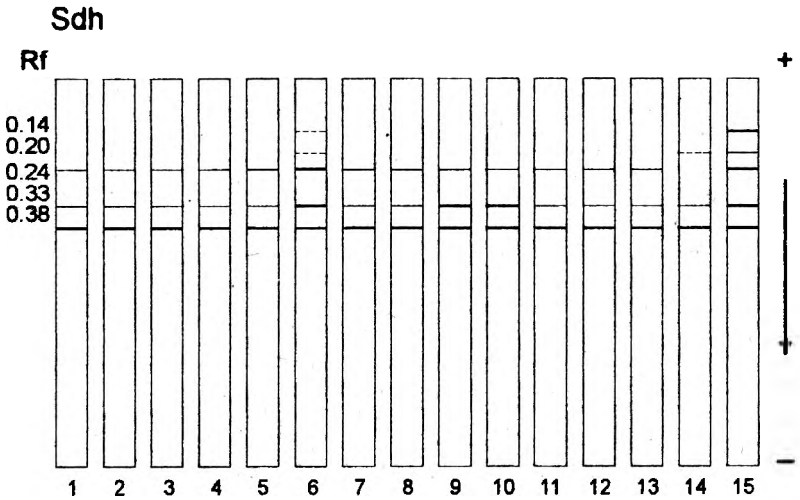
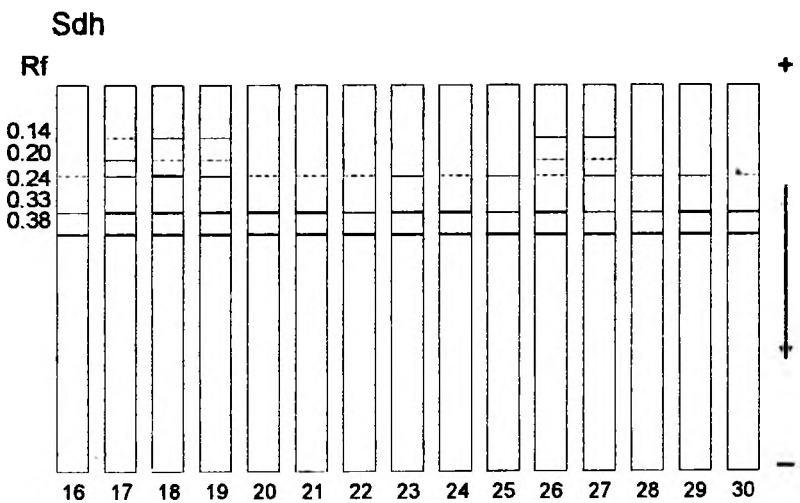
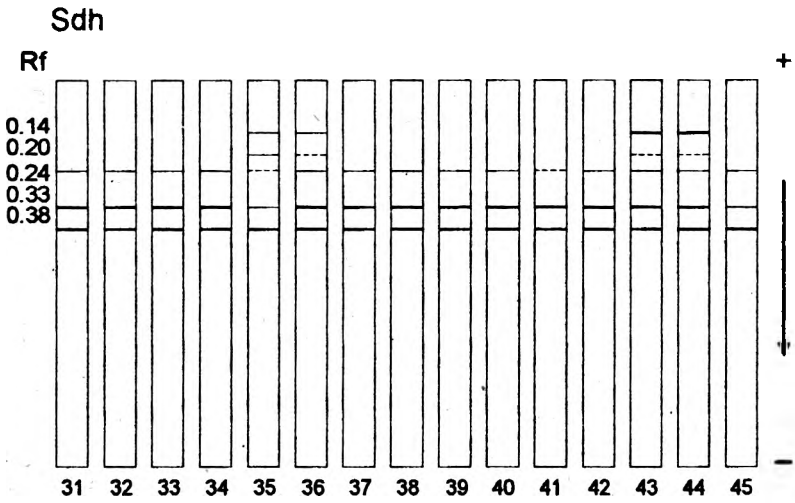


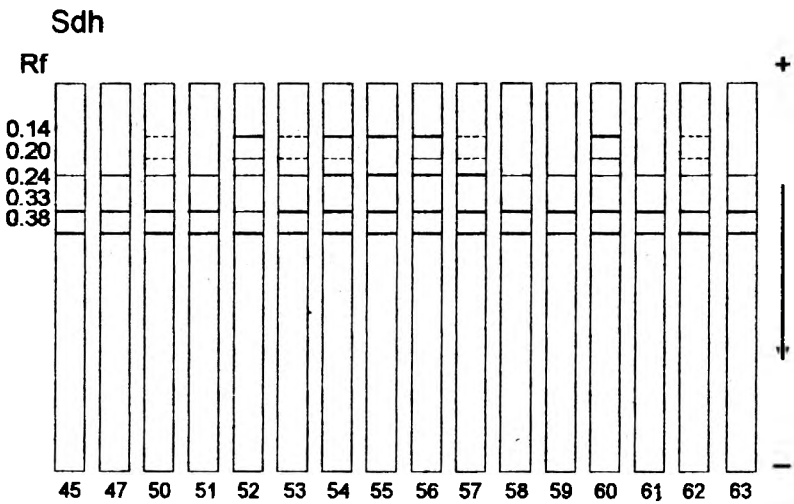
Рис. 4. Схема электрофореграмм изоферментов сорбитолдегидрогеназы эритроцитов крови зубров.



Продолжение рис. 4.



Продолжение рис. 4.



Сорбитолдегидрогеназа (L-Идитол: НАД-оксидоредуктаза. КФ 1.1.1.14) -(СДГ) -участвует в гексозном метаболизме,где катализирует реакцию превращения D-сорбитола в D-фруктозу. У свиней различных пород в тканях почек обнаружено два электрофоретических варианта фермента. У генорозисных животных спектр СДГ включает пять компонентов (Серов, 1977). Межвидовые различия по электрофоретической подвижности изоферментов СДГ были отмечены у крыс.

Энзимограммы изоформ СДГ анализируемых образцов сыворотки крови зубров, схематически представленные на рис. 4, состоят из трех–пяти последовательно расположенных фракций энзиматической активности (в эритроцитах этот фермент не обнаруживается). Три среднеподвижных компонента СДГ выявляются у всех изученных генотипов (Rf 0.24, 0.33 и 0,38). Причем по электрофоретической подвижности и относительной активности двух из них с относительной электрофоретической подвижностью 0.33 и 0.38 образцы не отличаются друг от друга. Это может указывать на отсутствие внутривидового полиморфизма по аллелям, контролирующим данные фракции.

Третий среднеподвижный компонент (Rf 0.24), также характерный для всех анализируемых генотипов, в зависимости от образца имеет неодинаковую интенсивность окрашивания в геле. В данном случае уровень ферментативной активности изоформы, возможно, обусловлен генетической экспрессией генов, ответственных за синтез этого изофермента. Компоненты, Rf которых составляет 0.14 и 0.20, обнаруживаются только у 19 образцов (6, 15, 17, 18, 19, 26, 27, 35, 36, 43, 44, 50, 52, 53, 54, 56, 57, 60 и 62), т. е. у последних электрофоретический спектр СДГ включает пять изоформ. По генетическим данным этот фермент – тетрамер. В связи с этим у гетерозиготных особей электрофоретический спектр должен включать шесть компонентов. Обнаруженный пятиполосный спектр СДГ также, на наш взгляд, указывает на то, что вышеперечисленные особи являются гетерозиготными в отношении данного изоферментного признака. Отсутствие же шестой фракции может быть следствием одинаковой электрофоретической подвижности одного из изоферментов СДГ родителей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате анализа шести ферментных систем у четырех были выявлены электрофоретические спектры ферментов сыворотки и эритроцитов крови зубров. Данные по электрофоретическому разделению Г-6-ФД эритроцитов крови показали инвариантность изоферментных спектров, что указывает на отсутствие генотипических различий между анализируемыми особями по этому ферменту. Сравнительное изучение изо-

ферментов эстеразы и МДГ сыворотки крови позволило обнаружить три и два соответственно типа спектра изоферментов, что может быть вызвано присутствием нескольких аллелей в локусах, детерминирующих эстеразу и МДГ, и обуславливает внутривидовой полиморфизм изоформ. Наблюдаемая внутривидовая изменчивость изоферментов СДГ сыворотки крови указывает на то, что, по-видимому, исследуемые образцы являются гомо- и гетерозиготными в отношении данного биохимического признака.

ЛИТЕРАТУРА

Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. -М.: Наука. -1983. -280 с.

Ароншгам А. А., Бояркин Л. Я., Пудовкин А. И. Изоферменты в популяционной и эволюционной генетике//Генетика изоферментов. -М. :Наука. -1977. -С. 199–249.

Малер Г., Кордес Ю. Основы биологической химии. -М.: Мир. -1970. -568 с.

Серов О. Л. Генетика изоферментов животных и человека//Генетика изоферментов. -М. :Наука. -1977. С. 80–135.

Хавкин Э. Е. Индуцированный синтез ферментов в процессе роста и морфогенеза растений. -М. :Наука. -1969. -385 с.

Davis J. Disc electrophoresis. Method and appication to human serum proteins//Ann. N. Y. Acad. Sci. -1964. -V. 121. -P. 404-427.

Harris H., Hopkinson D. A. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics (with supplements). -Amsterdam: Noth-Hol-land Publishing Co. ; N. Y. : Oxford American Elsevier Publishing Co., 1978. -325 p.

Lewontin R. C., Hubby J. L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. 11. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural population of Drosophila pseudoobscura//Genetics. -1966. -V. 54, N 2. -P. 595-609.

Shaw C. R., Prasad R. Starch gel electrophoresis of enzymes -a compilation of recipes//Biochem. Genet. -1970. -V. 4, N 2. -P. 297-320.

Yeh F. C. H., O 5, 0Malley D. Enzyme 'variation in natural populations of Douglasfir, Pseudotsuga menziesii (Mirb.) Franco,

from British Columbia. I. Genetic variation patterns in coastal populations//Silvae Genet. -1980. -V. 29, N 3-4. -P. 93-92.