

ИЗУЧЕНИЕ СРАВНИТЕЛЬНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ И НЕКОТОРЫХ ИЗОФЕРМЕНТОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЖИВОТНЫХ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА АГАРЕ

*Кандидат биологических наук
В.В. ПИЛЬКО*

**Кафедра разведения и генетики
Вит. вет. ин-та**

**Зав. кафедрой заслуженный деятель
науки БССР профессор
О. А. ИВАНОВА**

Разработка научно обоснованных методов совершенствования пород сельскохозяйственных животных требует дальнейшего изучения ряда вопросов и, в частности, интерьера животных. В связи с этим возникает вопрос о приложимости данных энзимологии и особенно исследований изоферментов в практике селекционно-племенной работы с животными.

Термин изоферменты появился в 1959 году и обозначает группу ферментов из одного источника, обладающих одним типом субстратной специфичности, но отличающихся по своим физико-химическим и другим свойствам.

Интерес к изучению изоферментов не случаен. К настоящему времени известно, что изоферменты отличаются друг от друга по химическим свойствам, спектр изоферментов изменяется при различных физиологических и патологических состояниях. Оказалось, что характер распределения изоферментов каким-то образом связан с направлением метаболизма и, возможно, играет при этом определяющую роль. Связь множественных форм ферментов с регуляторными системами также обусловила интенсивное изучение изоферментов (Дж. Уилкинсон, 1968).

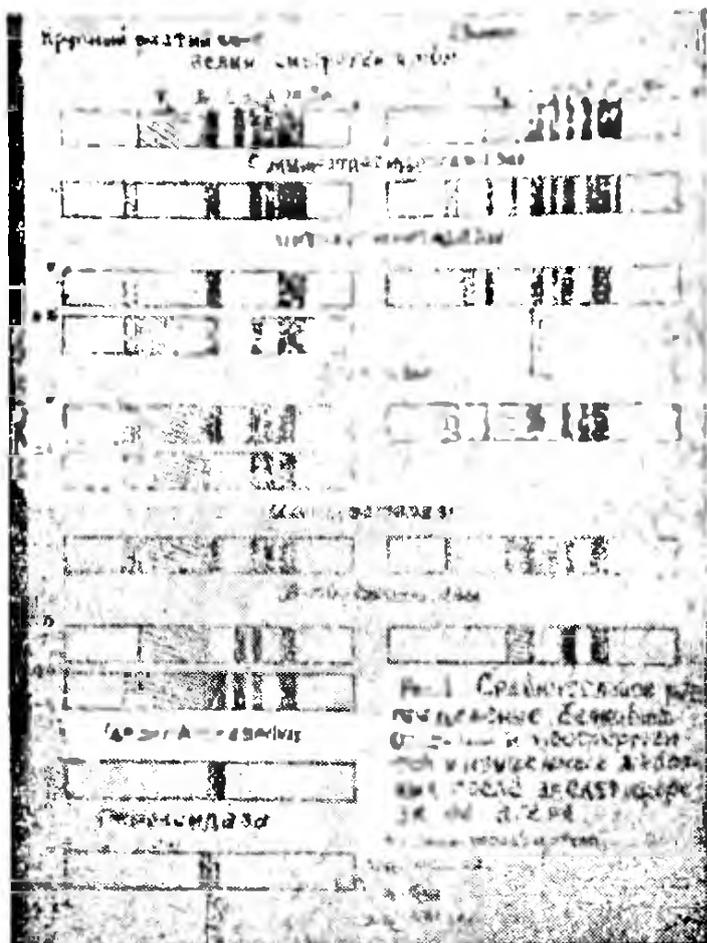
Успехи энзимологии в изучении изоферментов связаны, главным образом, с разработкой и совершенствованием электрофоретических методов исследования ферментов, однако эти успехи в малой степени касаются сельскохозяйственных животных.

Исходя из всего сказанного, нами изучалось распределение изоферментов сукцинатдегидрогеназы, цитохромоксидазы, эстераз, холинэстераз, бета-глюкуронидаз сыворотки крови крупного рогатого скота и свиней после электрофореза ее на охлажденной пластине агара. Кроме этого выявлялась активность церрулоплазмينا и пероксидазы сыворотки крови крупного рогатого скота таким же методом. Эти же образцы сыворотки крови крупного рогатого скота и свиней были подвергнуты также фракционированию этим же методом электрофореза для проведения сравнения распределения белковых фракций и изучаемых изоферментов, что приведено на рисунке.

Сыворотка крови была изучена от здоровых 15 быков-про-

изводителей, 20 бычков и 20 телок в возрасте 4—5 месяцев и 38 голов свиней весом 60—100 кг в июне 1971 года.

Для проведения электрофореза был использован аппарат, описанный Б. П. Суриновым и др. (1970) в некоторой модификации. Разделение сыворотки производилось в 1% агаре на боратно-щелочном буфере с рН 9,6. При напряжении 240 в и силе тока 40 ма на рабочую ширину пластины 90 мм процесс элект-



рофореза заканчивали на 35—40 мин. После этого пластина агара извлекалась из прибора и дальнейшая ее обработка зависела от целей исследования.

Для выявления активности ферментов пластинки агара помещали в кювету из органического стекла, куда заливали 100 мл раствора соответствующего субстрата (М. Берстон, 1965).

Сукцинатдегидрогеназы: 25 мл фосфатного буфера 0,1 М, рН 7,6, 25 мл 0,2 М сукцината натрия, 50 мл нитросинего тетразолия водный раствор (1 мг/мл), 10 мг фенозинметасульфата в

в 2,5 мл воды. Время инкубации 4 часа при температуре 37°.

Цитохромоксидазы: 100 мл фосфатного буфера 0,1 М, рН 7,6, 4 мл 1% раствора альфа-нафтола в 40° спирте, 4 мл 1% водного раствора диметилпарафенилендиамина. Инкубация при комнатной температуре 12 часов.

Эстеразы: 100 мл воды, 10 мл фосфатного буфера 0,2 М, рН 7,6, 40 мг нафтилацетата в 1 мл ацетона и непосредственно перед употреблением 40 мг прочного синего В. Инкубация при комнатной температуре 1—2 часа.

Холинэстеразы: 100 мл воды, 10 мл фосфатного буфера 0,2 М, рН 7,6, 40 мг ацетилтиохолинидида и непосредственно перед употреблением 40 мг прочного синего В. Время инкубации 2—3 часа при комнатной температуре.

Бета-глюкуронидазы: 75 мл воды, 20 мл фосфатно-цитратного буфера 0,15 М, рН 4,95, 30 мг бета- (6-бром-2-нафтил-Д-глюкопиранозид) в 5 мл метанола. Инкубировать 4—6 часов

при 37°. После этого пластина ополаскивается водопроводной водой, помещается на 1—2 часа в раствор прочного синего В в холодном фосфатном буфере 0,02М, рН 7,6 (1мг/мл).

Обнаружение церрулоплазмينا с помощью парафенилендиамина проводилось по П. Грабарю и П. Буртэну (1963) и пероксидаз с использованием орто-дианипидина по Н. Buschmann, D. Schmid, 1968.

Во всех случаях после инкубирования пластины агара промывались проточной водой 1—2 мин. и заливались на 3—4 часа фиксирующим 10% раствором глицерина на 2—3% растворе уксусной кислоты.

Пластины агара с полученными энзимограммами на них переносили на чистое стекло и сушили под слоем фильтровальной бумаги. Белковые фракции определяли в высушенных таким образом электрофореграммах, окрашивая амидовым черным по способу, предложенному Е. А. Чуркиным (1965).

Сравнительное распределение белковых фракций и изоферментов у изучаемых животных после электрофореза на агаре представлено на рисунке. Идентификация белковых фракций сыворотки крови крупного рогатого скота и свиней произведена по шаблону, предложенному В. М. Красовым в 1963 году (цит. по А. М. Ахмедову, 1966).

Распределение изоферментов относительно белковых фракций определялось путем наложения агаровых пластинок с энзимограммами на высушенные электрофореграммы.

Рисунок иллюстрирует встречаемость, подвижность и распространение изучаемых ферментов у крупного рогатого скота и свиней. Из рисунка видно, что изученные ферменты, кроме церрулоплазмينا и пероксидазы у крупного рогатого скота, имеют множественную форму. Почти во всех случаях наблюдается совпадение зон энзиматической активности разных изоферментов с основными белковыми фракциями у каждого вида. По распределению изоферментов сукцинатдегидрогеназы, цитохромоксидазы, эстераз, холинэстераз и бета-глюкуронидаз наблюдаются четкие межвидовые различия по числу и по относительной подвижности зон в электрическом поле.

В преальбуминовой зоне у обоих видов выражена активность сукцинатдегидрогеназы и у крупного рогатого скота цитохромоксидазы.

В зоне альбуминов имеется хорошо выраженная активность всех изучаемых изоферментов. В остальных белковых фракциях проявление энзиматической активности не всегда совпадает.

Так сукцинатдегидрогеназная активность у крупного рогатого скота кроме преальбуминовой и альбуминовой зон наблюдается также в альфа-1, альфа-2, бета-2-глобулинах и за областью гамма-глобулинов. У свиней помимо этого в зонах — между альбуминами и альфа-1-глобулинами, а также две узкие полосы в области гамма-глобулинов.

Активность цитохромоксидазы у быков-производителей выражена в четырех зонах, у телят — в шести, за счет дополнительно наблюдаемых в альфа-₂ и гамма-глобулинах. У свиней активность этого фермента наблюдается в шести зонах, наиболее массивная из них альбуминовая.

Изоферменты эстераз у обоих видов оказались совпадающими с одноименными белковыми фракциями и представлены у быков-производителей и свиней шестью, а у телят пятью зонами при отсутствии у них одной полосы в бета₂-глобулинах.

Распространение изоферментов холинэстеразы у крупного рогатого скота отличается от их распространения у свиней. У крупного рогатого скота активность холинэстеразы наблюдается в альбуминовой зоне, а также в альфа₁, альфа₂-и бета₂-глобулинах и значительная в гамма-глобулинах. У свиней помимо альбуминовой зоны лишь области альфа₂-и бета₁-глобулинов и незначительная в гамма-глобулинах.

Активность изоферментов бета-глюкуронидаз наблюдается у телок в шести зонах, у быков в четырех, а у свиней всего лишь в трех. Распространение активности изоферментов бета-глюкуронидаз таким образом подчеркивает видовые и половые различия между животными.

Активность церрулоплазмينا сыворотки крови крупного рогатого скота после электрофоретического разделения ее наблюдается в виде одной полосы в области бета-глобулинов, а пероксидазы — на месте нанесения образца сыворотки крови.

Таким образом после электрофореза сыворотки крови крупного рогатого скота на охлажденной пластине агара из семи изученных ферментов пять оказались представленными множественными формами. У свиней все пять изученных ферментов также оказались представленными множественными формами.

По встречаемости, подвижности и распространению изученных изоферментов наблюдаются межвидовые различия, а у крупного рогатого скота помимо этого в связи с полом по бета-глюкуронидазам и возрастом — цитохромоксидазам. Кроме того наблюдаются хорошо видимые индивидуальные различия в интенсивности окрашивания различных изоферментов.

ЛИТЕРАТУРА

А х м е д о в А. М. Белки сыворотки крови при инфекционных болезнях животных. 1966.

Б е р с т о н М. Гистохимия ферментов, М. 1965.

Г р а б а р П., Б у р т э н П. Иммуноэлектрофоретический анализ. М. 1963.

С у р и н о в Б. П., К а ш к и н К. П., Б о ч к о в а Д. Н., К у з и н а А. А. Определение активности изоферментов при помощи электрофореза в агаровом геле. Ж. Лаб. дело. № 4. 1970.

Чуркин Е. А. Определение протеинов и липопротеидов сыворотки крови методом электрофореза на агаре. Ж. Лаб. дело № 4, 1965.

Уилкинсон Дж. Изоферменты. Из-во «Мир», 1968.

Buschmann H., Schmid D. Serumgruppen bei Tieren, Berlin, 1968.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНОГО ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СУЯГНЫХ И ОКОТИВШИХСЯ ОВЦЕМАТОК НА УРОВЕНЬ ЛЖК И КОНЦЕНТРАЦИЮ ВОДОРОДНЫХ ИОНОВ СОДЕРЖИМОГО РУБЦА

Ассистент В. А. СИНКЕВИЧ
Кафедра клин. диагностики Вит.
вет. ин-та

Зав. кафедрой профессор
И. Я. КОНОПЕЛЬКО

В доступной литературе нет сведений о влиянии гипо- и гипертериоза на процесс брожения и уровень рН содержимого рубца суягных овцематок. При этом следует отметить, что Витебская область относится к зоне эндемического зоба, а срок второй половины беременности приходится на период зимнего стойлового содержания, когда иодная недостаточность очень часто усиливается односторонним кормлением овцематок.

В связи с важностью указанного вопроса мы поставили задачу изучить влияние различного функционального состояния щитовидной железы суягных и окотившихся овцематок в условиях эксперимента на уровень летучих жирных кислот (ЛЖК) и рН содержимого рубца.

Для выполнения поставленной задачи было подобрано 9 голов клинически здоровых суягных овцематок латвийской темно-головой породы средней упитанности, находившихся в конце первой и начале второй половине беременности. В течение всего периода исследований условия кормления и содержания были одинаковыми и соответствовали принятым в зоотехнии нормам.

Содержимое рубца получали методом зондирования, один раз в неделю натошак, после 14—16 часового голодания. В жидкой части содержимого, профильтрованного через 2 слоя марли, учитывали: общее количество ЛЖК — методом паровой дистилляции в аппарате Маргама и рН — потенциометром типа ЛП — 58 у 9 животных в течение 5 недель.

С учетом полученных данных овцы были разделены на 3 группы (по 3 головы в каждой): первую группу составили клинически здоровые животные (контроль), вторую — животные с