

УДК [591.477.33:576.312.2]597

А. В. Чайковская, Е. Т. Ускова, К. И. Сытенко

ОСОБЕННОСТИ БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТОВ СЛИЗИСТЫХ ПОКРЫТИЙ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ЧЕРНОМОРСКИХ РЫБ

Известно, что слизь, покрывающая тело рыб, играет многообразную функциональную роль. Сложный биохимический состав слизи морских и речных рыб (Ускова, Чайковская, 1975, 1976; Лебедева, Бурлаков, 1973) позволяет заключить, что имеется коррелятивная зависимость между функциональной ролью слизистого вещества и его биохимическим составом. Нами была предпринята попытка выяснения некоторых особенностей белковых компонентов слизистого вещества кожи рыб, отличающихся условиями обитания и скоростью передвижения.

Материал и методика. Объектом исследования были черноморские рыбы: пелагические — кефаль (*Mugil auratus* Risso), ставрида (*Trachurus mediterraneus ponticus* Aleev) и придонные — камбала (*Pleuronectes platessa* L.). Эти виды различны по образу жизни и по скорости передвижения.

Исследовали как нефракционированное, так и фракционированное слизистое вещество, которое получали по методу, описанному ранее (Ускова и др., 1970). Фракционирование проводили хроматографированием на сефадексе Г-25, Г-50, Г-200. Анализ кислотного гидролизата белковых компонентов осуществляли методом микротонкослойной хроматографии (Нестеров, Беленький, 1968), а исследование белков — методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле (7,5%), в щелочном триглициновом буфере (рН 8,9) и в кислом буфере (рН 4,3) по Девису (Davis, 1964). Сила тока 2 ма на трубочку, напряжение 200 в, через 30 мин доводили силу тока до 5 ма. Для стабилизации тока применяли охлаждение камеры, для чего последнюю помещали в холодильник. Белки окрашивали 0,1%-ным раствором амидо черного 10 В. Сравнение электрофоретических картин различных белков представляет при диск-электрофорезе значительную трудность в виду большого разброса данных. Это было преодолено путем большого количества повторностей и соответствующей математической обработки полученных результатов относительной электрофоретической подвижности, что и позволило нам представить с достаточной достоверностью картину расположения дискретных полос у рыб различных видов. Чтобы проверить, что число полученных полос соответствует числу белков, мы вырезали из полиакриламидного геля некоторые индивидуальные полосы и подвергали их повторному электрофорезу. Новых полос при этом не наблюдалось. В связи с этим агрегация малого количества различных белковых субъединиц не должна дать сложную серию молекул с различными электрофоретическими подвижностями, т. е. агрегирование белков маловероятно.

Результаты исследований. Электрофоретическое исследование слизистых веществ показало высокую сложность состава их белков. На рис. 1 схематически изображены результаты электрофоретического разделения в основном буфере (рН 8,9) белков нефракционированной слизи кефали, ставриды и камбалы. Эти электрофореграммы не идентичны и отличаются как по количеству, так и по расположению дискретных полос. У кефали обнаружено 19, у ставриды — 18, у камбалы — 14 белковых фракций.

На основании данных электрофореза сывороточного альбумина быка была получена кривая зависимости молекулярного веса от относительной электрофоретической подвижности с целью разделения полу-

чаемых электрофореграмм на зоны с разным молекулярным весом (рис. 2). Были выделены три зоны: I — быстродвижущиеся белки с молекулярным весом 10 000—30 000; II — среднедвижущиеся белки с молекулярным весом 30 000—200 000 и III — медленнодвижущиеся белки с молекулярным весом более 200 000.

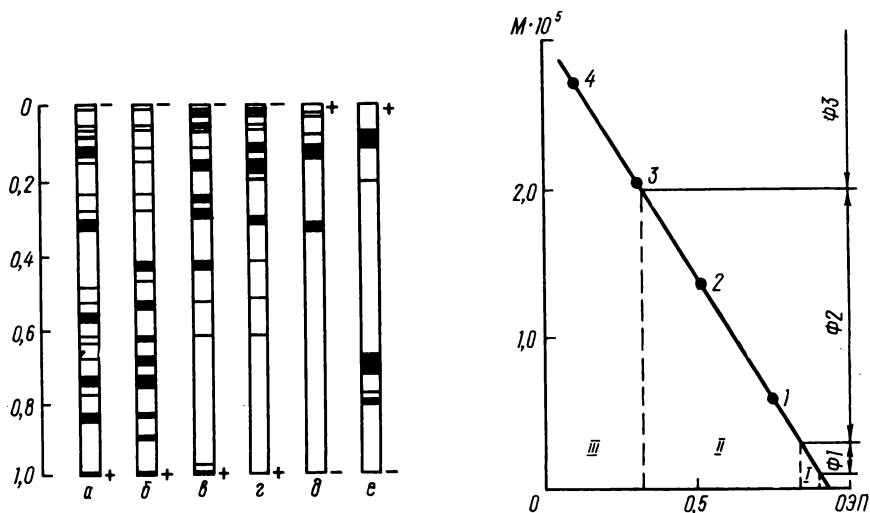


Рис. 1. Схема электрофореграммы белков слизистого вещества рыб:

I — нефракционированная слизь (pH 8,9, гель 7,5%); а — кефаль; б — ставрида; в — камбала; II — фракционированная слизь; г — ставрида (pH 8,9, гель 7,5); д — ставрида (pH 4,3, гель 7,5); е — нефракционированная слизь кефали (pH 4,3, гель 15%).

Рис. 2. Зависимость молекулярного веса от относительной электрофоретической подвижности, полученная для сыровоточного альбумина быка:

1 — мономер; 2 — димер; 3 — тример; 4 — тетрамер.

В I зоне слизистого вещества у кефали отмечена лишь 1 полоса, у ставриды и камбалы — по 2; во II зоне у кефали — 9 полос, у ставриды — 7, а у камбалы — 3. Таким образом, в I и II зонах наблюдаются различия в количестве дискретных полос для разных видов рыб. В III зоне обнаружено 9 полос, причем количество фракций в ней для слизей всех исследованных видов рыб одинаково.

Таким образом, электрофореграммы белков слизи пелагических рыб отличаются от таковых придонных рыб большим количеством дискретных полос. При этом различие проявляется за счет разницы числа быстродвижущихся и среднедвижущихся фракций.

При сопоставлении относительной электрофоретической подвижности отдельных фракций белков обнаружено 10 общих белковых фракций для трех исследованных видов рыб, 13 общих для кефали и ставриды, 12 общих для ставриды и камбалы и 10 общих для кефали и камбалы. В то же время в слизистом веществе кефали нам удалось обнаружить 6 белковых фракций, которые не встречаются ни у ставриды, ни у камбалы. У ставриды таковых 3, у камбалы — 2. В I зоне индивидуальные белки отмечены только у ставриды и камбалы (по 1 полосе), во II зоне — у кефали (4) и у ставриды (1), в III зоне — у кефали (2), ставриды (1) и камбалы (1). Таким образом, наблюдается отчетливо проявляющаяся специфичность белковых компонентов слизи рыб. Кроме того, можно отметить, что у быстродвигающихся рыб (кефаль) состав белков сложнее, чем у менее подвижных рыб.

Известно, что относительная электрофоретическая подвижность белков при диск-электрофорезе во многом определяется величиной молекулярного веса. Кроме того, здесь существенное значение имеет заряд макромолекул, который зависит от соотношения положительно и отрицательно заряженных боковых групп белков. Это соотношение можно определить исходя из данных аминокислотного состава. На примере слизистого вещества ставриды было установлено изменение аминокислотного состава белков в зависимости от молекулярного веса, и эти данные были использованы для объяснения электрофореграмм. На сфадексах Г-25, Г-50, Г-200 из слизистого вещества ставриды были выделены следующие фракции белков: Φ_1 с молекулярным весом 10 000—30 000, Φ_2 с молекулярным весом 30 000—200 000 и Φ_3 с молекулярным весом более 200 000. По молекулярным весам можно считать, что к I зоне относится Φ_1 , ко II зоне — Φ_2 и к III зоне — Φ_3 .

В таблице показан аминокислотный состав этих фракций и некоторые количества характеристики белков.

Характеристика аминокислотного состава слизистого вещества кожи ставриды *

| Аминокислота и количественный показатель | Нефракционированное вещество | Фракция | | |
|--|------------------------------|----------|----------|----------|
| | | Φ_1 | Φ_2 | Φ_3 |
| Аргинин | 66 | 157 | 213 | 250 |
| Лизин | 300 | 133 | 200 | 178 |
| Гистидин | 66 | 72 | 13 | 36 |
| Аспарагиновая кислота | 66 | 133 | 39 | 36 |
| Глутаминовая кислота | 200 | 157 | 100 | 71 |
| Серин | 33 | 97 | 75 | 36 |
| Треонин | 100 | 97 | 113 | 107 |
| Аланин | 100 | 108 | 75 | 107 |
| Валин | 33 | 12 | 39 | 36 |
| Метионин | 33 | 36 | 100 | 143 |
| Лейцин | + | + | + | + |
| Пролин | + | + | + | + |
| Сумма основных аминокислот | 432 | 362 | 476 | 464 |
| Сумма кислых аминокислот | 266 | 290 | 139 | 107 |
| Основные аминокислоты | | | | |
| Кислые аминокислоты | 1,6 | 1,1 | 3,4 | 4,3 |
| <u>Лизин</u> | | | | |
| Аргинин | 4,5 | 0,84 | 0,94 | 0,71 |
| <u>Аргинин</u> | | | | |
| Кислые аминокислоты | 0,24 | 0,54 | 1,5 | 2,3 |

* Аминокислотный состав белков выражен числом аминокислотных остатков на 1000 общих остатков.

При электрофорезе белков слизи в основном буфере суммарный электрический заряд белковых макромолекул определяется отношением содержания аргинина к сумме аспарагиновой и глутаминовой кислот. Это связано с тем, что при pH 8,9 основные группы лизина и гистидина находятся в недиссоциированном состоянии. Согласно данным таблицы, в данных условиях белки Φ_1 имеют отрицательный заряд, а белки Φ_2 и Φ_3 должны быть положительно заряженными. Между тем на электро-

фореграммах имеются дискретные полосы не только в I зоне, но и в двух остальных. Эта несогласованность данных может быть объяснена тем, что высокомолекулярные фракции слизистого вещества кожи рыб, которые, по-видимому, следует отнести ко II и III зонам электрофореграмм, представлены не чистыми белками, а надмолекулярными образованиями типа нуклеопротеидов и мукополисахаридов.

Межмолекулярное взаимодействие белков и нуклеиновых кислот, белков и кислых мукополисахаридов сопровождается блокированием положительных зарядов белковых составляющих и тем самым обуславливает возникновение в растворе надмолекулярных образований, имеющих суммарный отрицательный заряд (Богданов, 1974; Бычков, 1968; Iwai K., 1972).

Для доказательства того, что биоконплексы высокомолекулярной фракции располагаются во II и III зонах электрофореграмм, была исследована фракция Φ_3 . При электрофорезе фракционированного слизистого вещества было получено всего 12 полос. Сравнивая электрофоретическую подвижность белков Φ_3 (рис. 1, *з*) с электрофоретической подвижностью белков нефракционированной слизи (рис. 1, *б*), отмечаем как в первом, так и во втором случаях в III зоне 9 белков, во II зоне в фракции Φ_3 наблюдаются только 3 минорные полосы, в то время, как в нефракционированном веществе их 7, а в I зоне дискретные полосы вообще отсутствуют.

Таким образом, при электрофорезе фракции Φ_3 не обнаруживаются белки I зоны и частично II. Это является подтверждением того, что I зона, действительно, состоит из низкомолекулярных (10 000—30 000) белковых составляющих слизи. Полученные минорные полосы во II зоне можно считать результатом частичного разложения биоконплексов в процессе опыта.

Если в слизистом веществе, действительно, содержатся биоконплексы, то в кислом буфере (рН 4,3) они не должны перезарядиться, и следовательно, не смогут двигаться к отрицательному электроду несмотря на то, что белки всех фракций слизи рыб по данным аминокислотного состава в условиях такого электрофореза должны обладать положительным зарядом, согласно отношению суммы основных к сумме кислых аминокислот, которое везде больше единицы. Электрофорез слизи фракции Φ_3 ставриды в кислом буфере (рис. 1, *д*) показал, что в таких условиях обнаруживается всего 5 фракций вместо 12, найденных в основном буфере. Следовательно, можно считать, что необнаруженные 7 дискретных полос являются, действительно, надмолекулярными структурами биополимеров. По-видимому, те дискретные полосы, которые были все же найдены при электрофорезе, так же следует отнести к белкам, освобожденным из биоконплексов в результате их разложения в условиях опыта.

Из аминокислотного состава, который был изучен ранее, следует, что белковые составляющие слизистого вещества кожи ставриды представлены гистоноподобными белками (Ускова, Чайковская, 1975). Наше предположение о том, что слизистые вещества кожи рыб содержат гистоны, на первый взгляд, не согласуется с общепринятым положением, что гистоны являются ядерными белками. Появление их в слизистом веществе рыб можно связать с тем, что формирование слизи происходит в клетке, где на начальном этапе существует ядро, которое затем исчезает, т. е. в процессе образования слизи протоплазма и ядро перерождаются (Суворов, 1948). Это дает основание согласиться с тем, что сформировавшаяся слизистая клетка может содержать гистоны или гистоноподобные белки.

Электрофоретическая разгонка слизистого вещества кожи рыб в условиях рН 8,9, гель 15%, принятая для гистонов, показала, что белковые составляющие секрета железистых клеток содержат в своем составе гистоны (рис. 1, *e*). Известно, что гистоны разделяются по крайней мере на 3 типа: лизин-гистоны, умеренно богатые лизином гистоны и аргинин-гистоны. К какому типу относятся гистоны можно судить по отношению лизина к аргинину. С этих позиций нами и была предпринята попытка рассмотреть белковые составляющие слизистого вещества исследованных рыб. Согласно аминокислотному составу, слизистое вещество ставриды богато лизин-гистонами и аргинин-гистонами, а также гистонами с умеренным содержанием лизина (таблица). Причем нефракционированное слизистое вещество представлено в основном лизин-гистонами, фракционированное — аргинин-гистонами. Поскольку белки с молекулярным весом менее 10 000 присутствуют только в суммарном слизистом веществе кожи ставриды, а у последних отношение лизин/аргинин более 4, то можно утверждать, что эти низкомолекулярные белковые компоненты являются лизин-гистонами. Это хорошо согласуется с литературными данными, из которых следует, что лизин-гистоны имеют обычно молекулярный вес до 10 000, в то время, как аргинин-гистоны до 130 000 (Сидорова, 1967). Поэтому помимо белков Φ_1 в I зоне располагаются также белки с молекулярным весом ниже 10 000. Это белки, которые при гель-фильтрации слизистого вещества на сефадексе Г-25 выходят раньше свободного объема, т. е. фракция богата лизин-гистонами. Исходя из этих представлений можно предположить, что у отрицательного электрода (в III зоне) должны концентрироваться белки Φ_3 , поскольку это, во-первых, самая высокомолекулярная фракция, а, во-вторых, она представлена аргинин-гистонами, которым свойственна способность к агрегированию макромолекул, что, очевидно, также существенно с точки зрения образования комплексов с другими биополимерами. Во II зоне находятся аргинин-гистоны более низкомолекулярной фракции Φ_2 .

На основании выводов, сделанных для слизистого вещества ставриды, можно оценить и белковые фракции электрофореграмм слизистого вещества кефали и камбалы. В I зоне у них находятся низкомолекулярные аргинин и лизин-гистоны. Во II и III зонах, по-видимому, располагаются главным образом биоконплексы белков с имеющимися в слизи углеводами и нуклеиновыми кислотами (Комарова, 1969; Ускова, Чайковская, 1976).

Таким образом, проведенные исследования показали, что в составе слизистого вещества кожи рыб содержатся как свободные белки, так и белки, по-видимому, связанные в комплексе с другими биополимерами. Белковые составляющие представлены в основном гистоноподобными белками типа аргинин-гистонов. Причем последние, связанные в комплекс, концентрируются у отрицательного электрода, а свободные и лизин-гистоны располагаются главным образом у положительно заряженного полюса. Гистоноподобные белки слизи рыб гетерогенны по своему составу. В то же время набор гистоноподобных белков специфичен для каждого изученного вида рыб, что в частности проявляется в зависимости его от скоростной характеристики рыб.

ЛИТЕРАТУРА

- Богданов А. А. Современное состояние проблемы нуклеиново-белковых взаимодействий.— Усп. совр. биол., 1974, 77, № 2, с. 48—67.
Бычков С. М. Новые данные о гликозаминогликанах.— Усп. совр. биол., 1968, 65, № 3, с. 323—340.

- Комарова М. А. О химическом составе слизи щуки и налима.— Бионика, 1969, № 3, 84—90.
- Лебедева Н. Е., Бурлаков А. Б. Липопротеиды, мукополисахариды и изоферменты в коже и слизи речного голяна *Rhinichthys rhinichthys*.— Журн. эвол. биох. и физиол., 1973, 9, № 5, с. 527—529.
- Нестеров В. В., Беленький Б. Г., Эрастов Д. П. Количественный анализ тонкослойных хроматограмм по размерам хроматографических пятен.— Биохимия, 1968, 33, № 3, с. 537—541.
- Сидорова Е. В. Строение и биологическая функция гистонов.— Усп. биол. химии, 1967, 8, с. 117—137.
- Суворов Е. К. Основы ихтиологии.— М.: Сов. наука, 1948.— 579 с.
- Ускова Е. Т., Чайковская А. В., Устинович Д. А. О химическом составе слизистого вещества кожи некоторых видов черноморских рыб.— Гидробиол. журн., 1970, 6, № 4, с. 91—95.
- Ускова Е. Т., Чайковская А. В. Гетерогенность и химическая природа белковых компонентов слизистых покрытий морских рыб.— Гидробиол. журн., 1975, 11, № 3, с. 38—42.
- Ускова Е. Т., Чайковская А. В., Давиденко С. И. К вопросу о связи химического состава слизистых веществ кожи рыб с их гидродинамической эффективностью.— Гидробиол. журн., 1976, 12, № 1, с. 91—94.
- Davis B. I. Disc electrophoresis. *Ann. V.— Acad. Sci.*, 1964, 121, p. 404—410.
- Iwai K. I., Hayashi H. Calf thymus lysine- and serine-rich histone. Complete amino acid sequence and its implication for interactions of histones with DNA.— *J. Biochem.*, 72, p. 375—367.

Институт зоологии
АН УССР

Поступила в редакцию
27.IV 1978 г.