

УДК 577.112:001.36:597.55:544.638.3:57.017.5:636.064

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ СПЕКТРОВ МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ МОРСКОГО ЕРША (*SCORPAENA PORCUS L.*) РАЗЛИЧНОГО ПОЛА И ВОЗРАСТА

Королёва А.В., Залевская И.Н.

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: inz3@mail.ru*

Проведены исследования возрастных и половых особенностей электрофоретических спектров белков мышечной ткани морского ерша. Установлены различия электрофоретического состава мышечных белков особей разного возраста. В ходе анализа электрофоретических спектров белков мышечной ткани скорпен разного пола не было выявлено существенных отличий.

Ключевые слова: морской ерш, электрофоретические спектры, белки, мышечная ткань, пол, возраст.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время все больше накапливается данных о проявлении генетически детерминированного полиморфизма белков; установлены дискретные электрофоретические варианты отдельных белковых фракций. Однако не исключается возможность постсинтетического образования конформационных изомеров белков, например, в результате комплексообразования с низкомолекулярными загрязняющими веществами и изменения, в силу этого, электрофоретической картины белков. Системы белков, которые отличаются высокой полиморфностью, могут быть использованы в качестве теста для оценки состояния организма [1-4].

Эволюция органического мира связана, прежде всего, с эволюцией белкового обмена, а в основе различий между отдельными особями животных в первую очередь лежат биохимические различия. Современные представления и методы белковой химии нашли широкое применение в исследованиях по биохимической систематике и генетике рыб [5].

Показано, что рыбы, как верхнее трофическое звено водной экосистемы, являются индикаторами загрязнения, и по изменению их физиолого-биохимического состояния можно оценивать и прогнозировать последствия действия на организм токсических веществ, находящихся в воде [6]. Установлено, что при хроническом воздействии вредных химических веществ на организм выявляемые изменения отдельных показателей его жизнедеятельности достоверно отличаются от соответствующих показателей физиологической нормы [7, 8].

Важным направлением в исследовании рыб является поиск биохимических маркёров состояния организмов рыб и среды их обитания. Наибольший интерес

представляет изучение мышечных белков рыб в силу того, что мышечная ткань способна аккумулировать токсические соединения такие, как тяжелые металлы, нефтепродукты и т. д. При хроническом загрязнении среды обитания с возрастом происходит все большее накопление токсических веществ [9].

В связи с этим представляло интерес изучить возрастные и половые особенности электрофоретического состава белков мышечной ткани рыб, обитающих в акватории Черного моря вблизи Севастополя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования был выбран донный вид рыб – морской ерш (*Scorpaena porcus L.*), отловленный в апреле 2009 года в прибрежной части Черного моря в районе г. Севастополя. Данный вид полностью отвечает требованиям, предъявляемым к биомониторным объектам: повсеместное распространение в водоеме, хорошо изученная биология, не совершает длительных миграций [10]. Материалом для исследования служил гомогенат мышечной ткани морского ерша.

Фракционный состав мышечных белков изучали методом диск-электрофореза в 7%-ном полиакриламидном геле [11]. Окрашивание электрофореграмм на общие белки проводили 1%-ным раствором амидочерного В в 7%-ной уксусной кислоте.

Стандартные среднестатистические электрофоретические спектры (ЭФ-спектры) рассчитывали с учетом относительной электрофоретической подвижности фракций [4]. Сравнивали как стандартные ЭФ-спектры, так и статистические показатели ЭФ-состава мышечной ткани.

Сравнительный анализ полученных спектров осуществляли качественно и количественно. Статистическая обработка данных производилась с помощью стандартной программы «EXCEL».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что мышцы донных видов рыб в большей степени по сравнению с другими экологическими группами рыб способны аккумулировать тяжелые металлы, хлорорганические соединения и другие загрязняющие вещества. В частности, у биомониторного вида морского ерша, наблюдается наибольшая протеолитическая активность лизосом в мышечной ткани, отражающих степень загрязнения акватории, а также обнаружены достоверно высокие показатели содержания продуктов окислительной модификации белков мышц (также отражающие уровень загрязнения ихтиоценозов) этого же вида рыб из более загрязненных акваторий [12].

Проведенные исследования показали, что среднестатистические электрофоретические спектры белков мышечной ткани морского ерша (скорпены) различного возраста содержат разное количество белковых фракций. Так, ЭФ-спектры особей в возрасте 2(+3) года имели в своем составе 15 фракций; 3(+4) года – 16; 4(+5) года – 19; 5(+6) лет – 14; 6(+7) лет – 18; 7(+8) лет – 18.

Известно, что к водорастворимым мышечным белкам относятся белки группы миогенов (миоальбумины, глобулин X и т.д.), а истинно сократительные, такие как актин и миозин, растворяются в средах с высокой концентрацией солей ($\mu=0,6$ и

больше), поэтому в полученных мышечных гомогенатах присутствовали главным образом белки первой группы [5].

В общей картине электрофоретических спектров белков мышечной ткани рыб разного возраста отмечены определенные различия. Фракции миоальбуминовой зоны среднестатистического белкового спектра мышечной ткани особей всех возрастов обладали практически одинаковой электрофоретической подвижностью и степенью яркости, только лишь у рыб в возрасте 4(+5) лет отмечена гетерогенная и неякая миоальбуминовая зона. Наиболее гетерогенная преальбуминовая зона отмечена в ЭФ-спектре у особей в возрасте 6(+7) лет и содержит 3 фракции (таблица 1). Картина постальбуминовой зоны ЭФ-спектров белков мышечной ткани рыб всех возрастов сходны между собой. Наиболее гетерогенной трансферриновой зоной (5 фракций) является область электрофоретического белкового спектра у самых старых особей (7(+8) лет) в исследуемом возрастном диапазоне. Высокая гетерогенность посттрансферриновой зоны ЭФ-спектров белков мышечной ткани отмечена у рыб в возрасте 4(+5) лет, 6(+7) лет – 5 фракций, а также в возрасте 7(+8) лет – 4 фракции. Предстартовая зона скорпен всех исследуемых возрастов отличается высокой гетерогенностью (4 – 5 фракций). Таким образом, качественный анализ возрастных особенностей ЭФ-спектров белков мышечной ткани морского ерша показал различную картину распределения фракций по зонам.

Таблица 1.
Распределение фракций в электрофоретических спектрах белков мышечной ткани морского ерша

Зоны эф-подвижности	Пределы Кэф белковых фракций	Количество фракций в ЭФ-спектре					
		Возраст, года					
		2(+3)	3(+4)	4(+5)	5(+6)	6(+7)	7(+8)
Преальбуминовая	1,1-0,90	2	1	2	1	3	1
Миоальбуминовая	0,90-0,80	1(я)	1(я)	2	1(я)	1(я)	1(я)
Постальбуминовая	0,80-0,60	1(я),1	1(я),1	1(я),1	1(я),1	1(я),1	1(я),1
Трансферриновая	0,60-0,40	3	4	3	3	3	5
Посттрансферриновая	0,40-0,20	1(я),1	1(я),2	5	3	5	4
Предстартовая	0,20-0,00	5	5	5	4	4	5

Примечание: я - яркая фракция

Изучение статистических показателей ЭФ-спектров выявило различные пределы числа электрофоретических фракций (n) в спектрах белков мышечной ткани рыб разного возраста. Так, минимальное количество фракций в спектре

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ

наблюдается у особей в возрасте 3(+4) года – 9 фракций, а максимальное – у особей в возрасте 4(+5) лет – 18 фракций (таблица 2).

Наименьшее среднее количество фракций ($M \pm m$) отмечено у рыб в возрасте 5(+6) лет – $11,75 \pm 0,44$, а наибольшее – у особей в возрасте 6(+7) лет – $14,37 \pm 0,45$. Остальные значения $M \pm m$ колеблются в пределах доверительного интервала. В ходе статистической обработки данных выявлены различные пределы относительной электрофоретической подвижности (Кэф) белковых фракций мышечной ткани скорпен разного возраста. Как видно на таблице 2, скорпен можно разделить на две группы, различающиеся по подвижности анодных фракций: ЭФ-спектры с более подвижными анодными фракциями – это особи в возрасте 4(+5) лет, 6(+7) лет и 7(+8) лет; и ЭФ-спектры с менее подвижными анодными фракциями – это рыбы в возрасте 2(+3) года, 3(+4) года и 5(+6) лет. Таким образом, в основном белки ЭФ-спектров рыб более старшего возраста обладают большей относительной электрофоретической подвижностью.

Таблица 2.

Статистические показатели электрофоретических спектров белков мышечной ткани особей морского ерша различного возраста

Возраст, года	Показатели						
	Количество белковых фракций				Пределы Кэф		Cv, %
	min	max	$M \pm m$	σ	min	max	
2(+3)	10	17	$13,25 \pm 0,51$	2,12	0,00	1,13	16
3(+4)	9	15	$12,37 \pm 0,43$	2,0	0,00	1,17	16
4(+5)	10	18	$13,5 \pm 0,41$	2,56	0,00	1,22	19
5(+6)	10	14	$11,75 \pm 0,44$	1,58	0,00	1,16	13
6(+7)	10	16	$14,37 \pm 0,45$	2,27	0,00	1,26	16
7(+8)	11	16	$14,12 \pm 0,45$	1,82	0,00	1,2	13

Примечание: Cv – коэффициент вариации (варьирование считается слабым при Cv до 10%, при Cv=11-25% - среднее варьирование, а если Cv>25% - сильное) [1].

При вычислении коэффициента вариации (Cv) оказалось, что белковые спектры рыб исследуемых групп обладают средним варьированием числа фракций (от 13% до 19%). При сравнении среднестатистических электрофоретических спектров белков мышечной ткани рыб разного возраста выяснилось, что они подобны. Наибольший коэффициент подобия [14] имеют белковые спектры особей в возрасте 3(+4) года и 7(+8) лет – 97%, наименьший – 2(+3) года и 3(+4) года – 71%. Таким образом, статистический анализ ЭФ-спектров белков мышечной ткани скорпен разного возраста также указывает на наличие возрастных различий.

Установленные возрастные особенности электрофоретического состава белков мышечной ткани морского ерша могут быть связаны с накоплением в мышцах рыб модифицированных и поврежденных белков вследствие аккумуляции у этого

донного вида загрязняющих веществ, которые могут образовывать комплексы с белками и таким образом изменять электрофоретическую картину белков.

Исследования половых особенностей показали, что среднестатистические электрофоретические спектры белков мышечной ткани самок и самцов морского ерша содержат одинаковое количество фракций – 24. Общая картина электрофоретических спектров белков мышечной ткани морского ерша разного пола похожа, однако отмечаются незначительные отличия. К примеру, в миоальбуминовой зоне белкового спектра самцов проявились две фракции: одна яркая и практически совпадает по относительной электрофоретической подвижности (Кэф) с яркой миоальбуминовой фракцией самок (Кэф=0,82-0,88 и Кэф=0,81-0,87 соответственно), а вторая неяркая с Кэф=0,88. Преальбуминовая зона в ЭФ-спектре самцов и самок одинаково гетерогенна – по 4 фракции (таблица 3).

Таблица 3.

Распределение фракций в электрофоретических спектрах белков мышечной ткани морского ерша разного пола

Зоны эф-подвижности	Пределы Кэф белковых фракций	Количество фракций в ЭФ-спектре	
		Самки	Самцы
Преальбуминовая	1,1-0,90	4	4
Миоальбуминовая	0,90-0,80	1 (я)	1 (я), 1
Постальбуминовая	0,80-0,60	4	4
Трансферриновая	0,60-0,40	3	2
Посттрансферриновая	0,40-0,20	6	6
Предстартовая	0,20-0,00	6	6

Примечание: я - яркая фракция

В постальбуминовой зоне ЭФ-спектров обеих групп рыб также отмечалось одинаковое количество фракций (4). А вот трансферриновая зона ЭФ-спектра самок морских ершей содержит в себе большее количество фракций (3), чем ЭФ-спектр самцов (2). Наиболее гетерогенными зонами ЭФ-спектров обеих групп являются посттрансферриновая и предстартовая зоны (по 6 фракций в каждой зоне и группе). Таким образом, качественный анализ ЭФ-спектров белков мышечной ткани скорпен разного пола показал, что они не имеют четких отличий.

Изучение статистических показателей ЭФ-спектров не выявило резких отличий в пределах числа электрофоретических фракций (n) в спектрах белков мышечной ткани рыб разного пола: минимальное число белковых фракций совпадает (10), максимальное же у самок составило 17, а у самцов 16 (таблица 4).

Среднее число фракции ($M \pm m$) электрофоретических спектров обеих групп различается в пределах доверительного интервала. Показатели среднеквадратичного отклонения (σ) практически совпадают. Электрофоретические спектры белков

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ

мышечной ткани самок имеют меньшие пределы относительной электрофоретической подвижности ($K_{эф}=0,00-1,12$) по сравнению с пределами $K_{эф}$ электрофоретические спектров самцов ($K_{эф}=0,00-1,15$), однако эти различия также незначительны. При вычислении коэффициента вариации (C_v) оказалось, что белковые спектры обеих групп скорпен обладают средним варьированием (23-25%). При сравнении среднестатистических электрофоретических спектров белков мышечной ткани рыб разного пола выяснилось что они подобны ($K_p=95\%$). Таким образом, статистический анализ электрофоретических спектров белков мышечной ткани самок и самцов скорпен также подтверждает отсутствие резких отличий между ними.

Таблица 4.
Статистические показатели электрофоретических спектров белков мышечной ткани особей морского ерша разного пола

Пол	Показатели							
	Количество белковых фракций				Пределы $K_{эф}$		$C_v, \%$	$K_p, \%$
	min	max	$M \pm m$	σ	min	max		
Самки	10	17	$13,54 \pm 0,35$	3,14	0,00	1,12	23	95 ¹
Самцы	10	16	$12,58 \pm 0,36$	3,16	0,00	1,15	25	

Примечания: C_v – коэффициент вариации (варьирование считается слабым при C_v до 10%, если $C_v=11-25\%$ - среднее варьирование, а если $C_v>25\%$ - сильное) [13]; K_p – коэффициент подобия [14] среднестатистических спектров самок и самцов скорпен.

Отсутствие резких отличий электрофоретических спектров белков мышечной ткани особей морского ерша разного пола может быть связано с активизацией метаболических процессов, вызванной подготовкой организма самок и самцов к размножению, так как рыбы были отловлены весной в период нереста. Возможно, при изучении электрофоретические спектров организмов рыб в период покоя будут выявлены более резкие отличия, это и будет изучаться в ходе дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. Установлены возрастные особенности белкового состава мышечной ткани морского ерша, проявившиеся в увеличении количества фракций и относительной электрофоретической подвижности в электрофоретических спектрах у рыб более старшего возраста, в значительной гетерогенности предстартовой и трансферриновой зон у рыб самых старших групп. Качественные различия подтверждены статистическими данными.
2. В ходе качественного и количественного анализа электрофоретических спектров белков мышечной ткани скорпен разного пола не было выявлено существенных

половых отличий, что может быть связано с особенностями метаболических процессов в организме рыб, который готовится к размножению.

Список литературы

1. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции / Созинов А.А. – М.: Наука, 1985. – 273 с.
2. Солонченко А.И. Систематическое положение цестоды “*Bohicephalus scorpii*” от камбал Черного и Азовского морей и ее генетический вариации / А.И. Солонченко, И.И. Руднева // Экология моря. – 1997. – Вып. 46. – С. 75–77
3. Соркина Д.А. Полиморфизм белков сыворотки крови у гибридных животных / Д.А. Соркина // Вестник сельскохозяйственной науки. – 1983. – № 4 (319). – С. 96–100
4. Соркина Д.А. Сравнительная характеристика белковых и липопротеидных спектров сыворотки крови черноморских рыб / Д.А. Соркина, И.И. Руднева // Труды КМИ. – 1975. – Т. 66. – Вып. 1. – С. 61–63.
5. Смирнов Л.П. Сравнительная оценка белковых спектров печени и мускулатуры рыб, птиц и млекопитающих, получаемых методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле / Л.И. Смирнов, Н.Н. Немова // Сравнительная биохимия рыб и их гельминтов. – 1977. – Вып. 84. – С. 85–92.
6. Моисеенко Т.И. Экотоксикологический подход к оценке качества вод / Т.И. Моисеенко // Водные ресурсы. – 2005. – Т. 32., №2 – С. 184–195.
7. Немова Н.Н. Биохимическая индикация состояния рыб / Н.Н. Немова, Р.И. Высоцкая. – М.: Наука, 2004. – 215 с.
8. Филенко О.Ф. Задачи и приемы биотестирования токсичности водной среды / О.Ф. Филенко // Методы биотестирования качества водной среды. – М.: Из-во МГУ, 1989. – С.3–9.
9. Влияние хронической интоксикации ацетатом свинца на фракционный состав белков и некоторые показатели липидного обмена скелетных мышц сеголеток карпа (*Cyprinus carpio* L.) / Б.С. Мусаев, Г.Р. Мурадова, А.И. Рабаданова [и др.] // Известия Самарского научного центра РАН. – 2009. – Т. 11, № 1(2). – С. 11–113.
10. Комплексная оценка качества водной среды с помощью биомаркеров разного уровня / И.И. Руднева, Н.Ф. Шевченко, Л.С. Овен [и др.] // Актуальные вопросы водной токсикологии. – 2004. – С. 124–145
11. Маурер Г. Диск-электрофорез / Маурер Г. – М.: Мир, 1971. – 200 с.
12. Подунай Ю.А. Экологические особенности изменения некоторых показателей белкового обмена в мышечной ткани черноморских рыб / Ю.А. Подунай, И.Н. Залевская, И.Н. Руднева // Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана. – 2009. – Вып. 19. – С. 184–190.
13. Лакин Р.Ф. Биометрия / Лакин Р.Ф. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
14. Ромоданова Э.А. Влияние малых доз гамма-облучения на множественные молекулярные формы каталазы и пероксидазы инбредных линий кукурузы / Э.А. Ромоданова, Е.Ю. Львова // Радиобиология. – 1993. – Т. 33. – Вып. 3. – С. 415–418.

Корольова Г.В. Порівняльна характеристика електрофоретичних спектрів м'язових білків морського йоржа (*Scopelogadus roscus* L.) різної статі та віку” / Г.В. Корольова, І.М. Залевська // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2010. – Т. 23 (62). – № 2. – С. 108-115.

Зроблені дослідження вікових і статевих особливостей електрофоретичних спектрів білків м'язової тканини морського йоржа. Установлена відмінність електрофоретичного складу м'язових білків особней різного віку. В ході аналізу електрофоретичних спектрів білків м'язової тканини морського йоржа різної статі суттєвих відмін не виявлено.

Ключові слова: морський йорж, електрофоретичні спектри, білки, м'язова тканина, стать, вік.

Korolyova. A.V. The comparative characteristic of the electrophoretic spectres of muscle protein of *Scorpaena porcus* with different sex and age / A.V. Korolyova, I.N. Zalevskaya // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2010. – V.23 (62). – № 1. – P. 108-115.

The investigation of age and sexual particularity of the electrophoretic protein spectres of muscle tissue of *Scorpaena porcus* were made. The differences of electrophoretic composition of muscle proteins from species with dissimilar age were ascertained. The sharp differences between electrophoretic spectres of muscle proteins were not obtained

Keywords: *Scorpaena porcus*, electrophoretic spectres, proteins, muscle tissue, sex, age.

Поступила в редакцию 16.04.2010 г.