

Н. А. ГОЛУБЬ

**ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВОГО СОСТАВА ВОДНОГО ЭКСТРАКТА
ИЗ МИДИИ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAM.**

Методами гель-фильтрации и электрофореза в системе Леммли установлены молекулярные массы водорастворимых белков, экстрагированных из гомогената мягких тканей мидии (*Mytilus galloprovincialis* Lam.). Показано, что белок с молекулярной массой 96 кДа дает реакцию гемагглютинации. Установлено, что данный белок относится к белкам гемолимфы мидии.

Известно, что экстракты из различных моллюсков, в том числе и экстрагируемые белки, проявляют противоопухолевую, иммуностимулирующую, антибактериальную и другие виды биологической активности [1, 6 и др.]. Мидии (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) также содержат биологически активные вещества белковой природы [7 и др.], но до сих пор нет полных данных о составе водорастворимой фракции белков, их биологической активности и тканевой принадлежности.

Задачей настоящей работы было изучение спектра водорастворимых белков *M. galloprovincialis*, определение молекулярных масс и гемагглютинирующей способности отдельных фракций и их тканевой принадлежности.

Материал и методика. Материалом для работы служила мидия, собранная в районе г. Севастополя с коллекторов в бухте Казачьей (декабрь 1998 г.) и мидия естественных поселений из бухты Карантинной (октябрь 1999 г.).

Фракцию водорастворимых белков экстрагировали из мягких тканей мидий, гомогенизированных на холоду, и ступенчато осаждали сульфатом аммония при 30, 65 и 100% насыщении раствора, а также этанолом при -2 - 0°C до 80% концентрации спирта.

Для определения спектра молекулярных масс использовали метод гель-фильтрации [4] и электрофореза в градиенте 5-17% ПААГ с ДСН [5]. Молекулярные массы белков определяли по калибровочному графику, построенному в координатах: по оси абсцисс — коэффициент распределения белка, по оси ординат — логарифм молекулярной массы [5]. Для определения молекулярной массы белков в денатурирующих условиях использовали колонку с Sephadex G-200 (0,9 x 25 см, скорость элюции 10 мл/ч) и элюирующий буфер — 0,05М трис·HCl с 0,1М NaCl и 8М мочевины с pH 8,5. Для получения фракций нативных белков использовали колонку с Sephadex G-200 (1,5x36 см, скорость элюции 6 мл/ч) и элюирующий буфер — 0,05М фосфатный буфер с 0,15М NaCl с pH 7,4.

Реакцию гемагглютинации проводили по [3]. Для уточнения принадлежности белков к определенной ткани, межстворчатую жидкость и гемолимфу отделяли от мягких тканей. Из межстворчатой жидкости исследовали нативный образец после замораживания при -20°C и водорастворимые белки, осажденные сульфатом аммония при 100% насыщении раствора. Образец мидийного бульона получали растворением порошка высушенного бульона в забуференном физиологическом растворе (ЗФР), нерастворимый материал отделяли центрифугированием. Из гомогената мягких тканей белок ступенчато осаждали сульфатом аммония при 30 и 65%-ом насыщении раствора. Перед нанесением в лунки планшета образцы диализовали против ЗФР.

Результаты и обсуждение. Показано, что водорастворимые белки (ВРБ), осажденные сульфатом аммония при 100% насыщении раствора, разделенные на колонке с Sephadex G-200, включают 15 фракций со следующими молекулярными массами (м.м.) (рис. 1).

Электрофоретическое разделение показало наличие полос соответствующих белкам с м.м.: 96, 66, 54, 45, 30, 21, 18, 14 кДа. Отсутствие высокомолекулярной

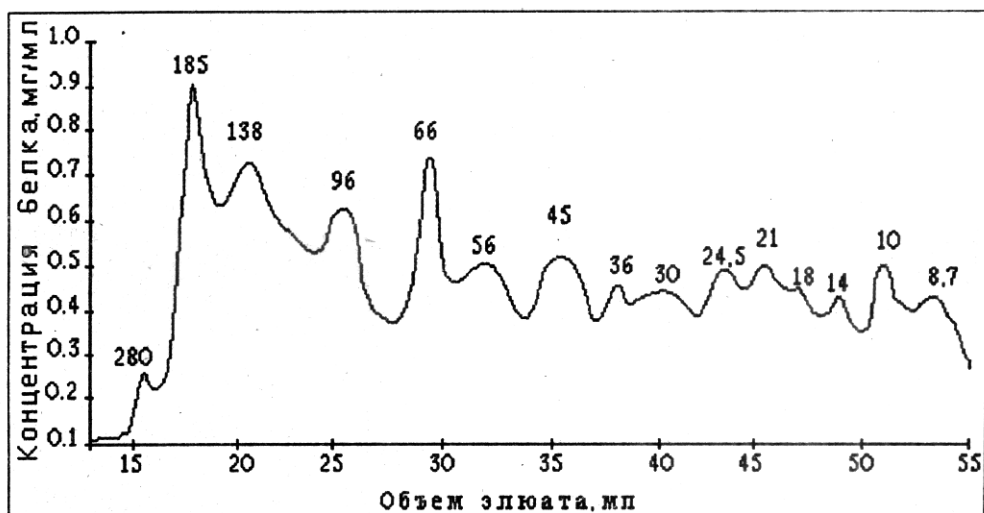


Рис. 1 Фракционирование нативных водорастворимых белков мягких тканей мидии на колонке с Sephadex G-200 (1,5x31 см). Молекулярные массы белков указаны цифрами над пиками, в кДа.

Fig. 1 Fractionation of the native water-soluble protein from the mussels soft tissue on column of Sephadex G-200 (1.5x36 cm). Molecular weight was indicated in kD.

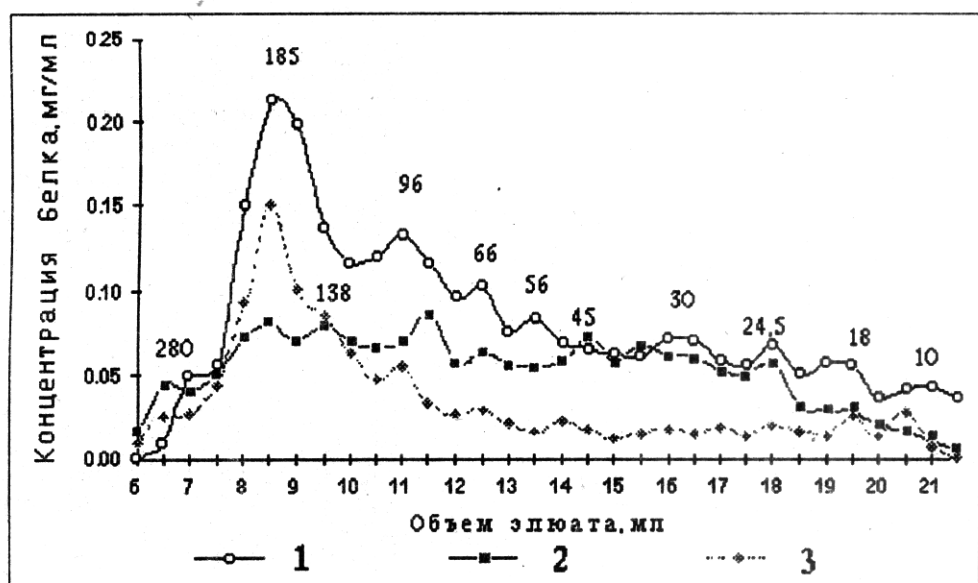


Рис. 2 Сравнение спектров молекулярных масс фракции водорастворимых белков, полученных различными способами. Образцы фракционировали на колонке с Sephadex G-200 (0,9x25 см). Кривые 1, 2, 3 — пояснения см. в тексте.

Fig. 2 Comparison of molecular weight spectra of the water-soluble protein of mussels extracted with different protocols. 1 — precipitated proteins from a soft tissue homogenate with ammonium sulphate for 65% saturation degree; 2 — same sample with preliminary precipitated proteins with ammonium sulphate for 30% saturation degree; 3 — precipitated proteins with alcohol. Samples were fractionated on column of Sephadex G-200 (1.5x36 cm with a flowrate 10 ml/h, 0.05M Tris-HCl buffer with 0.15M sodium chloride with 8M carbamide, pH 8.5.

фракции при электрофоретическом разделении связано либо с распадом нативного белка на субъединицы, либо с наличием большого углеводного остатка, имеющего свой заряд или препятствующего связыванию с ДСН [5].

Установлено, что при 30%-ом насыщении раствора сульфатом аммония в осадок выпадают белок с массой 185 кДа и пептиды с массой 8,7 и 6,8 кДа. Это хорошо заметно при хроматографическом разделении белков после осаждения их сульфатом аммония при 65%-ом насыщении раствора (рис. 2, кривая 1) и при таком же насыщении, но с предварительным отделением осадка белка при 30%-ом насыщении раствора (рис. 2, кривая 2). При осаждении белка из раствора этанолом наибольшая концентрация белка отмечена во фракциях с молекулярными массами 185, 138 и 96 кДа (рис. 2, кривая 3).

Полученные данные, согласуются с полученными ранее результатами для коллекторных мидий из Каламитского залива [2].

Для поиска биологически активных фракций пробы отбирали после разделения на колонке с Sephadex G-200 (1,5 x 36 см, ЗФР, pH 7.4). Реакция гемагглютинации отмечена в лунках, соответствующих диапазону белков с молекулярными массами 107000-76000 кДа, в середине которого находится белок с м. м. 96 кДа. В лунках соответствующих фракциям белков с м. м. 24500 и 10000 Да отмечен гемолиз эритроцитов.

Препарат митилан, выделенный из мидийного бульона и проявляющий иммуномоделирующую активность, представляет собой пептидо-глюкан с молекулярной массой около 100 кДа [1].

Результаты уточнения принадлежности белков, проявляющих гемагглютинирующую и литическую активность, к определенной ткани приведены в таблице.

Таблица 1 Тест на гемагглютинацию фракций водорастворимых белков из различных тканей мидии *Mytilus galloprovincialis*

Table 1 Haemagglutination test of fractions of the watersoluble proteins from various tissue of mussel, *Mytilus galloprovincialis*

Образец	Титр гемагглютинирующей активности					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	Контроль
Нативная гемолимфа после размораживания С _{белка} =1.79 мг/мл	+++	++	—	—	—	—
Белки гемолимфы, осажденные сульфатом аммония при 100% насыщении раствора С _{белка} =1.95 мг/мл	++	+	—	—	—	—
Мидийный бульон С _{белка} =1.40 мг/мл	+	—	—	—	—	—
Белки гомогената мягких тканей, осажденные сульфатом аммония при 30% насыщении раствора С _{белка} =1.83 мг/мл	ЧГ	ЧГ	ЧГ	—	—	—
Белки гомогената мягких тканей, осажденные сульфатом аммония при 65% насыщении раствора С _{белка} =3.22 мг/мл	ЧГ	ЧГ	ЧГ	—	—	—

Примечания: 1. Реакцию гемагглютинации оценивали по трехбалльной шкале: +++ — ярко выраженная, ++ — заметно отличающаяся от контроля, + — слабо выраженная. 2. Гемолиз оценивали по двубалльной шкале: ПГ — полный гемолиз; ЧГ — частичный гемолиз

Полученные результаты показывают, что способность агглютинировать эритроциты проявляют только белки гемолимфы. Обработка солями и термическая обработка межстворчатой жидкости снижают способность белков связывать эритроциты. Наличие гемагглютинирующей способности белков гемолимфы может быть

связано с защитной функцией данной ткани. Подобные термолabile белки и пептиды с антимикробной и цитотоксической активностью обнаружены в мидиях и других двухстворчатых моллюсках [6, 7 и др.].

Гомогенат мягких тканей проявляет гемолитическую активность, что связано с экстрагированием либо водорастворимых лизосомальных ферментов, либо литических ферментов из пищеварительных желез. Вероятно, что белки с м.м. 24500 и 10000 Да относятся к одной из указанных групп.

Выводы. 1. Фракция водорастворимых белков насчитывает от 11 (при 65%-ом насыщении раствора сульфатом аммония) до 15 белков (при 100%-ом насыщении раствора сульфатом аммония). 2. Наибольшее количество белка наблюдалось во фракциях с м. м. 185, 138 и 96 кДа. 3. Гемагглютинирующую активность проявляют только белки гемолимфы. Реакцию гемагглютинации дает белок с м. м. 96 кДа. 4) Белки с м.м. 24500 и 10000 Да обладают литической активностью и относятся к гомогенату мягких тканей.

1. Глазкова В.Е., Молчанова В.И., Михайская Л.В. и др. Дальневосточная мидия — источник биологически активных веществ //Биологически активные вещества при комплексной утилизации гидробионтов. Тез. докл. Всесоюз. совещ., 24-26 мая, 1988. — М.— 1988. — С. 77 - 78.
2. Голубь Н.А. Некоторые данные о молекулярных массах водорастворимых белков мидии //Проблемы рационального использования биоресурсов водохранилищ: Тез. докл. междунар. науч. конф., Киев, 6-8 сент., 1995. — Киев. — 1995. — С. 251 - 252.
3. Методы исследования углеводной специфичности. (Методические рекомендации) Под ред. Луцка М.Д. — Львов, 1983. — С. 6 - 9.
4. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. — М.: Мир, 1985. — С. 126 - 154.
5. Практическая химия белка. — М.: Мир, 1989. — С. 39 - 43.
6. Charlet M., Chernysh S., Philippe H. et al. Innate immunity : Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis* //J. Biol. Chem. — 1996. — 271, № 36. — P. 21808 - 21813.
7. Hubert F., Noel T., Roch P. A member of the arthropod defenish family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) //Eur. J. Biochem. — 1996. — 240, №1. — P. 302 - 311.

Институт биологии южных морей НАНУ,
г. Севастополь

Получено 29.11.1999

N. A. GOLUB

STUDIES OF PROTEIN COMPOSITION OF AQUEOUS EXTRACT FROM MUSSELS,
MYTILUS GALLOPROVINCIALIS LAM.

Summary

Molecular weight of the water-soluble proteins extracted from homogenate of a soft tissue of the mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) was determined by methods of gel chromatography and gradient gel electrophoresis. It was shown that the protein with molecular weight 96 kD induct haemagglutination reaction. It was found this protein belongs to the mussels hemolymph proteins.