

УДК 591.1

БИОХИМИЯ

Н. Х. МЕХТИЕВ, Ю. П. ШАЛИМОВ, М. А. РИШ

### БИОХИМИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА КАРАКУЛЬСКИХ ОВЕЦ

(Представлено академиком Г. М. Франком 6 VII 1970)

Церулоплазмин — единственный белок сыворотки крови, обладающий оксидазной активностью. Полиморфизм церулоплазмينا обнаружен у человека (<sup>1</sup>), свиней (<sup>2, 3</sup>), крупного рогатого скота (<sup>4</sup>), домашней птицы (<sup>5</sup>), причем в ряде случаев он носит наследственный характер. Какие-либо сведения о полиморфизме церулоплазмينا у овец в литературе отсутствуют.

Обмен меди в организме человека и животных тесно связан с уровнем церулоплазмينا в плазме крови, так как скорость синтеза этого белка регулирует отложение меди в печени и ее выделение из организма. В последние годы у овец обнаружены генетические различия уровня меди и церулоплазмينا в крови, причем установлено, что животные с высоким уровнем этого элемента в первую очередь подвержены гибели при медной недостаточности (<sup>6</sup>).

Учитывая важное значение церулоплазмينا в обмене микроэлемента меди, мы поставили перед собой цель изучить возможную роль его генетического полиморфизма в адаптации овец к различному уровню меди в окружающей среде. В настоящем сообщении рассматриваются генетические варианты церулоплазмينا, обнаруженные нами у каракульских овец.

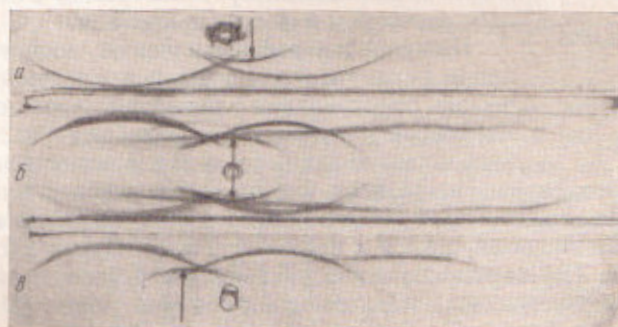


Рис. 1. Иммуноэлектрофореграмма типов церулоплазмينا.  
а — медленнодвижущийся (ММ), б — промежуточный (ВМ), в — быстродвижущийся (ВВ)

Для выявления полиморфизма церулоплазмينا были проведены исследования сыворотки крови каракульских овец из племенных заводов «Карнаб» и «Нурата» Самаркандской области.

Иммуноэлектрофорез проводили по методу, описанному нами ранее (<sup>7</sup>), с некоторыми изменениями. В частности, электрофорез проводили на стеклянных пластинках размером 5 × 8 см, что позволяет одновременно исследовать образцы сыворотки крови 4 животных. Для приготовления агарового геля и проведения электрофореза пользовались кальций-лактатным буферным раствором (<sup>8</sup>). Электрофорез проводили при градиенте потенциала



6—7 в/см в течение 2 час. Для идентификации дуги церулоплазмينا проводили ее специфическое окрашивание О-дианизидином.

Диск-электрофорез в полиакриламидном геле проводили по (°), в некоторой нашей модификации применительно к разделению церулоплазмينا. Для получения геля использовали цианагам-41. Рабочие растворы и смеси готовили по следующей схеме: I. 1 N HCl 48 мл, трис 46 г, TEMED 0,1 мл, H<sub>2</sub>O до 1 л, pH 8,9. II. 1 N HCl 48 мл, трис 7,5 г, TEMED 0,1 мл, H<sub>2</sub>O до 1 л, pH 6,7. III. Мелкопористый гель (7,5%), цианагам-41 7,89 г, персульфат аммония 30 мг, буфер I — до 100 мл, pH 8,9. IV. Крупнопористый гель (3,5%), цианагам-41, 3,7 г, сахара 4 г, персульфат аммония 30 мг, буфер II — до 100 мл, pH 6,7.

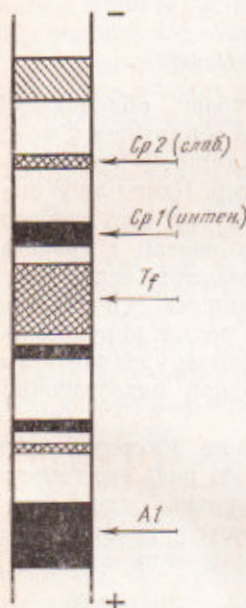


Рис. 2. Схема расположения типов церулоплазмينا после диск-электрофореза

Полимеризацию проводили в 1-миллиметровых трубках от шприцев чешской фирмы «Chigana». Продолжительность электрофореза 60—90 мин., при силе тока 3—5 ма на трубку и напряжении от 80 до 120 в. Процесс останавливали, когда зона индикаторной краски оказывалась в 5—6 мм от нижнего конца колонки геля. Затем гель извлекали из трубок, фиксировали и окрашивали на оксидазную активность О-дианизидином и на белок — кумаси синим.

Электрофорез проводили в крахмальном геле, для приготовления которого использовали 13% частично гидролизованный крахмал на трис-цитратном буфере с pH 7,4, а для электродных кювет — боратный буфер с pH 8,6. Электрофорез проводили при силе тока 60 ма и напряжении 260 в в течение 3—3,5 час. После электрофореза гель разрезали на две половинки, одну из которых окрашивали на белок, вторую — на оксидазную активность (протейнограмму инкубировали при 37—40° в течение 1—2 час. в 0,1 M ацетатном буфере, pH 5,7, содержащем 0,10 г/л О-дианизидина). После окрашивания протейнограмму отмывали буферным раствором и фотографировали.

Иммуноэлектрофоретический анализ сыворотки крови каракульских овец и последующее специфическое окрашивание показали, что церулоплазмин идентичен с дугой преципитации  $\alpha$ -2-3-глобулина. Дуга преципитации церулоплазмينا присутствовала

на всех иммуноэлектрофореграммах, но имела различия в электрофоретической подвижности, которые можно подразделить на 3 типа: быстро движущийся, медленно движущийся и промежуточный. Центр дуги быстро движущегося типа (В) церулоплазмينا расположен ближе к анодной части иммуноэлектрофореграммы, медленно движущегося типа (М) — ближе к катодной части и центр промежуточного типа (ВМ) — над стартом. Дуга преципитации гомозигот по быстрому или медленному типу церулоплазмينا находится впереди или позади, а дуга гетерозигот — над лункой с исследуемой сывороткой (рис. 1).

Различия в расположении дуги преципитации церулоплазмينا объясняются неодинаковой электрофоретической подвижностью найденных типов этого белка в агаровом геле и сходством их антигенных свойств.

При помощи дискового электрофореза в полиакриламидном геле и последующего окрашивания О-дианизидином у овец найдены две церулоплазминовые зоны: одна сильноокрашенная, бедна белком и расположена непосредственно за трансферрином, а другая — слабоокрашенная, находящаяся несколько выше первой зоны (рис. 2).

Поскольку диск-электрофорез показал две зоны локализации церулоплазмينا, представило интерес выяснить, различаются ли они между собой по антигенным свойствам. Для выяснения этого вопроса нами был прове-



ден комбинированный иммуноэлектрофорез: диск-электрофорез в полиакриламидном геле с последующей иммунодиффузией в агаровом геле. Этот метод позволяет использовать лучшую разрешающую способность полиакриламидного геля при разделении сывороточных белков и агаровый гель, как удобную среду для иммунодиффузии. После электрофореза колонки с гелем помещали на стеклянные пластинки ( $5 \times 8$  см) и заливали 1% раствором агарового геля вровень с их поверхностью. Когда гель затвердевал, на расстоянии 0,5 см от каждой колонки вырезали траншеи, куда вносили антисыворотку (20—25  $\mu$ л) и проводили иммунодиффузию. На полученных таким образом иммуноэлектрофореграммах мы наблюдали на уровне зон церулоплазмينا одну двойную дугу преципитации, что говорит о иммунологической идентичности обеих фракций церулоплазмينا.

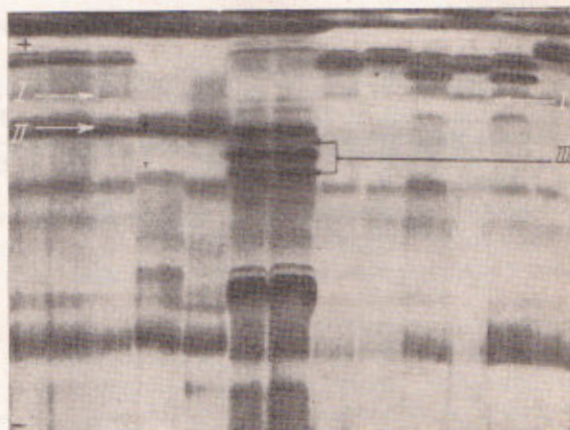


Рис. 3. Протеинограмма расположения церулоплазминов в крахмальном геле. I — у каракульских овец, II — у человека, III — у свиньи

При электрофорезе в крахмальном геле удается четко отделить церулоплазмин овец от других сывороточных белков. Зона церулоплазмينا всегда находится между трансферриновой и гаптоглобиновой зонами. Она довольно четкая и легко читается (рис. 3). Церулоплазмин каракульских овец обладает большей электрофоретической подвижностью в крахмальном геле, чем церулоплазмин человека, крупного рогатого скота и свиней. По окислительной активности упомянутые виды церулоплазмينا располагаются в следующий ряд: свинья  $>$  человек  $>$  овца  $>$  крупный рогатый скот.

У каракульских овец электрофорезом в крахмальном геле обнаружено три фенотипа церулоплазмينا: быстрый (А), медленный (В) и их комбинация (АВ), которые идентичны обнаруженным трем иммунологическим типам. У 76 исследованных овец найдено: церулоплазмин типа А — 8 голов, типа В — 40 голов, типа АВ — 28 голов. Данные о генной частоте церулоплазмينا и о наблюдаемом и ожидаемом распределении фенотипов приведены в табл. 1.

Таблица 1

Генная частота церулоплазминов каракульских овец

Фенотипы	Наблюдаемое $f$	Ожидаемое, $f_1$	$f - f_1$	$(f - f_1)^2$	$(f - f_1)^2$
СрАА	8	6,384	1,616	2,624	0,41
СрВВ	40	38,380	1,620	2,624	0,06
СрАВ	28	31,236	3,236	10,498	0,39
					$X^2 = 0,80$

Найденная нами величина  $X^2$  говорит о том, что наблюдаемое распределение фенотипов церулоплазмينا хорошо соответствует ожидаемому ( $P < 0,95$ ). Наиболее часто у каракульских овец встречается аллель В и редко аллель А.



Таким образом, обнаруженные типы церулоплазмينا каракульских овец генетически детерминированы и контролируются двумя аллеломорфными генами.

Самаркандский государственный университет  
им. А. Навои

Поступило  
3 VII 1970

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> A. Morell, J. Scheinberg, Science, 131, 930 (1960). <sup>2</sup> P. Imlah, Nature, 203, 658 (1964). <sup>3</sup> M. A. Graetzer, M. Hesselholt et al., Blood Groups of Animals, Prague, 1965, p. 279. <sup>4</sup> R. von Ebertus, Fortpflanzung, Besamung und Aufzucht der Haustiere, 3, № 3/4, 265 (1967). <sup>5</sup> B. Starcher, C. H. Hill, Biochim. et biophys. acta, 127, № 2, 400 (1966). <sup>6</sup> G. Wiener, A. C. Field, J. Comp. Pathol., 79, 7 (1969). <sup>7</sup> Н. Х. Мехтиев, Ветеринария, № 12, 65 (1966). <sup>8</sup> C. B. Laurell, S. Laurell, N. Skoog, Clin. Chem., 2, 99 (1956). <sup>9</sup> L. Ornstein, B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 321, 404 (1964).