

УДК 591.4

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 церулоплазмина обнаружен у человека (¹), свиней (^{2, 3}), крупного рогатого скота (⁴), домашней птицы (⁵), причем в ряде случаев он носит наследственный характер. Какие-либо сведения о полиморфизме церулоплазмина у овец в литературе отсутствуют.

Обмен меди в организме человека и животных тесно связан с уровнем церулоплазмина 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 церулоплазмина в крови, причем установлено, что животные с высоким уровнем этого элемента в первую очередь подвержены гибели при медной недостаточности (⁶).

Учитывая важное значение церулоплазмина 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 церулоплазмина, обнаруженные нами у каракульских овец.

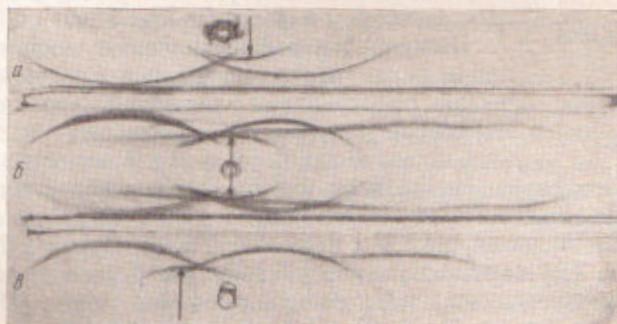


Рис. 1. Иммуноэлектрофорограмма типов церулоплазмина.
а — медленнодвижущийся (ММ), б — промежуточный (ВМ), в — быстродвижущийся (ВВ)

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

Иммуноэлектрофорез проводили по методу, описанному нами ранее (⁷), 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 (⁸). Электрофорез проводили при градиенте потенциала

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

Диск-электрофорез в полиакриламидном геле проводили по ⁽⁹⁾, в некоторой нашей модификации применительно к разделению церулоплазмина. Для получения геля использовали цианагам-41. Рабочие растворы и смеси готовили по следующей схеме: I. 1 N HCl 48 мл, трис 46 г, ТЕМЕД 0,1 мл, H₂O до 1 л, pH 8,9. II. 1 N HCl 48 мл, трис 7,5 г, ТЕМЕД 0,1 мл, H₂O 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, сахароза 4 г, персульфат аммония 30 мг, буфер II — до 100 мл, pH 6,7.



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

Полимеризацию проводили в 1-миллиметровых трубках от шприцев чешской фирмы «Chirana». 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 (протеинограмму 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 протеинограмму отмывали буферным раствором и фотографировали.

Иммуноэлектрофоретический анализ сыворотки крови каракульских овец и последующее специфическое окрашивание показали, что перулоплазмин идентичен с дугой преципитации а-2-3-глобулина. Дуга преципитации церулоплазмина присутствовала

на всех иммуноэлектрофрагммах, но имела различия в электрофоретической подвижности, которые можно подразделить на 3 типа: быстродвигущийся, медленнодвигущийся и промежуточный. Центр дуги быстродвигущегося типа (B) церулоплазмина расположен ближе к анодной части иммуноэлектрофрагммы, медленнодвигущегося типа (M) — ближе к катодной части и центр промежуточного типа (BM) — над стартом. Дуга преципитации гомозигот по быстрому или медленному типу церулоплазмина находится впереди или позади, а дуга гетерозигот — над лункой с исследуемой сывороткой (рис. 1).

Различия в расположении дуги преципитации церулоплазмина 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 церулоплазмина, представило интерес выяснить, различаются ли они между собой по антигенным свойствам. Для выяснения этого вопроса нами был прове-

ден комбинированный иммуноэлектрофорез: диск-электрофорез в поликариламидном геле с последующей иммуноадсорбцией в агаровом геле. Этот метод позволяет использовать лучшую разрешающую способность поликариламидного геля при разделении сывороточных белков и агарового геля, как удобную среду для иммуноадсорбции. После электрофореза колонки с гелем помещали на стеклянные пластиинки (5×8 см) и заливали 1% раствором агарового геля вровень с их поверхностью. Когда гель затвердевал, на расстоянии 0,5 см от каждой колонки вырезали траншии, куда вносили антисыворотку (20–25 мк) и проводили иммуноадсорбцию. На полученных таким образом иммуноэлектрофрагммах мы наблюдали на уровне зон церулоплазмина одну двойную дугу преципитации, что говорит о иммунологической идентичности обеих фракций церулоплазмина.

При электрофорезе в крахмальном геле удается четко отделить церулоплазмин овец от других сывороточных белков. Зона церулоплазмина всегда находится между трансферриновой и гантоглобиновой 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 оксидазной активности упомянутые виды церулоплазмина располагаются в следующий ряд: свинья > человек > овца > крупный рогатый скот.

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

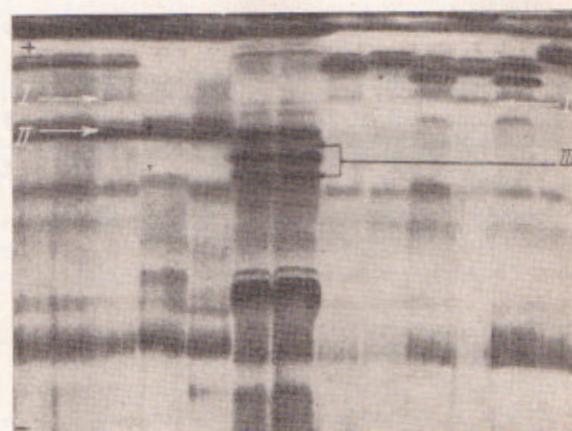


Рис. 3. Протеинограмма расположения церулоплазмина в крахмальном геле. I — у каракульских овец, II — у человека, III — у свиньи

Таблица 1

Генная частота церулоплазминов каракульских овец

Фенотипы	Наблюдающее f	Ожидаемое, f_1	$f - f_1$	$(f - f_1)^2$	$(f^X - f_1)^2$
СрAA	8	6,384	1,616	2,624	0,41
СрBB	40	38,380	1,620	2,624	0,06
СрAB	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 церулоплазмина хорошо соответствует ожидаемому ($P < 0,95$). Наиболее часто у каракульских овец встречается аллель B и редко аллель A.

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

Самаркандский государственный университет
им. А. Навои

Поступило
3 VII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

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