



ИДК 543.545:547.96:591.481.1

Методы исследований

ДВУМЕРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ВОДОРАСТВОРИМЫХ
БЕЛКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА СОБАКИ

ВОЛОЩУК С. Г., АКУЛОВ И. Н., ЛАПТЕВ А. В., ДЕДУШКИН В. П.

Всесоюзный научный центр психического здоровья АМН СССР, Москва

Метод двумерного электрофореза (ЭФ), предложенный O'Farrell [1], широко используется в настоящее время для изучения белкового состава бактерий [2], биологических жидкостей, отдельных клеток и тканей человека и животных [3—6].

Существует множество вариантов двумерного ЭФ. Это объясняется тем, что для решения конкретных задач требуется определенный диапазон рН при изоэлектрическом фокусировании, определенные условия ЭФ в ПААГ и способы окрашивания [5—8].

В настоящей работе описана методика двумерного ЭФ, применяемая для анализа водорастворимых белков мозга собаки, и проведено сравнительное изучение белковых компонентов коры больших полушарий, коры мозжечка и хвостатого ядра.

Использовали ткань мозга пяти взрослых беспородных собак от 7.0 до 16 кг сразу после тrenaнкции черепа, проведенной под тиопенталовым наркозом.

Ткань гомогенизировали в соотношении 1:5 (вес/объем) 0.005 М натрий-фосфатном буфере (рН 7.0) ножевым гомогенизатором «Virtis—15» (США). Полученный гомогенат центрифугировали при 100000g в течение 1 ч при 4° в ультрацентрифуге «Beckman L8—55» (США). Супернатант лиофилизировали и хранили при —20°.

Двумерный ЭФ выполняли по методу O'Farrell [1] со следующими модификациями: а—для приготовления образца лиофилизат растворяли в диссоциирующем растворе, содержащем 9 М мочевины, 1%-ный тритон X-100 (вес/объем), 1%-ный негтергент 3—08 (вес/объем), 2%-ные амфолины (объем/объем), рН 3.5—10, рН 3.5—5, рН 4—6, рН 5—7 в соотношении 3:3:1:3 в 1 мМ дитиотреитол. Концентрация белка в образце составляла 5 мг/мл; б—ПААГ для ЭФ в 1-м направлении содержал 8 М мочевины, а тритон X-100, ивтергент 3—08 и амфолины—как в диссоциирующем растворе; в—ступенчатый ЭФ во 2-м направлении проводили в пластине размером 120×140×1.5 мм с 10 или 12%-ным разделяющим ПААГ.

Для определения величины M_r белков одновременно с фракционированием образца во 2-м направлении проводили ЭФ набора стандартных белков.

После ЭФ пластины окрашивали азотнокислым серебром [10]. Продолжительность рекомендуемых операций увеличивали с 30 до 45 мин, учитывая толщину пластины ПААГ.

ЭФ 15-и образцов (3 зоны мозга 5-и животных) проводили не менее двух раз. Электрофореграммы оценивали визуально. Индивидуальные особенности белкового состава мозга животных исключали путем сравнения воспроизводимых пятен нескольких электрофореграмм одного образца и образцов, полученных от разных животных.

Были использованы следующие реактивы: акриламид, бис-акриламид, дитиотрептол («Seiva», ФРГ), персульфат аммония, трис, ДДС-Na, тритон X-100 («Merck», ФРГ), 2-меркаптоэтанол («Fluka», ФРГ), циттергент 3—08 («Calbiochem-Behring Corp.», США), амфолины, агароза («LKB», Швеция), набор стандартных белков («Pharmacia», Швеция), глицин, глутаровый альдегид, ТЕМЕД («Reanal», Венгрия), остальные—«Союзхимреактив», СССР.

Все растворы готовили на деионизированной воде.

Для оптимизации анализа водорастворимых белков мозга собаки исследовали влияние различных интервалов pH, концентрации ПААГ для 2-го направления и способов окрашивания на общее число индивидуальных белковых компонентов.

Было показано, что высокие концентрации кислых амфолинов (pH 2,5—4 и 3,5—5) приводят к существенному уменьшению числа выявляемых белков и общему ухудшению их разделения за счет незначительного улучшения разделения белков с pI около 4,0. Кроме того, из-за практических трудностей получения стандартного градиента концентрации ПААГ использование во 2-м направлении градиентных гелей дает искажение фронта при ЭФ. В пластинках с 10%-ным ПААГ белковые пятна распределялись между верхней и нижней половинами геля неравномерно.

Наиболее удовлетворительные результаты и по числу разделенных компонентов, и по воспроизводимости общей картины разделения наблюдали при изоэлектрическом фокусировании в диапазоне pH 4,3—7,3 и ЭФ в 12%-ном ПААГ во 2-м направлении (рис. 1).

Использование дитиотрептола вместо 2-меркаптоэтанола после 1-го направления оказалось целесообразным, поскольку в таком варианте после окрашивания азотнокислым серебром появляется интенсивная горизонтальная полоса в области M_r около 20 кД и происходит искажение распределения белков этой зоны. Аналогичная замена в диссоциирующем растворе не влияет на распределение белковых фракций. В то же время слабоокрашенные горизонтальные полосы в области M_r 65 кД остаются в любом варианте. Горизонтальные полосы этой зоны, как правило, не мешают оценке результатов ЭФ и отмечены в работах других авторов [11]. Природа возникновения этих полос до сих пор остается неизвестной.

Разработанные нами условия ЭФ и окраски дают стандартные и хорошо воспроизводимые картины разделения. Общее содержание наблюдаемых индивидуальных белковых фракций—около 400.

Было проведено сравнительное исследование белковых компонентов некоторых отделов мозга собаки. На рис. 2 приведены два фраг-

мента двумерных электрофореграмм водорастворимых белков лобной коры полушарий, коры мозжечка и хвостатого ядра мозга.

Большинство белковых компонентов коры мозжечка совпадает с белками коры полушарий. Однако белок мозжечка с pI 5,0 и M_r 28 кД (5,0/28 К), выявленный на всех белковых картах этого отдела мозга, отсутствует на большинстве электрофореграмм других отделов, а на некоторых наблюдается в виде очень мелкого пятна. Возможно также, что это совершенно другой белок со сходными координатами. С другой стороны, белок с координатами 6,0/47К, присутствующий на всех белковых картах коры больших полушарий и хвостатого ядра, не обнаружен ни на одной из электрофореграмм мозжечка.

Белковая карта хвостатого ядра по составу близка к карте коры больших полушарий. Выявить достоверные количественные различия отдельных пятен путем визуальной оценки не представлялось возможным.

Можно предположить, что обнаруженные нами особенности в белковых картах коры больших полушарий, коры мозжечка и хвостатого ядра собаки являются следствием различий в нейронном составе этих отделов мозга.

Так, группа авторов описала белок, обнаруженный в цитозольной фракции мозжечка кролика [12—14], являющийся эндогенным субстратом GMP-зависимой протениназы, с M_r около 23 кД и pI в интервале 5,2—6,0 (три белковых пятна). Было установлено, что основное количество фермента и его субстрата находится в клетках Пуркинью, которые характерны именно для этого отдела мозга. Возможно, что обнаруженный нами характерный белок мозжечка собаки аналогичен белку из мозжечка кролика.

Подобные белки, характерные для различных зон мозга, могут иметь отношение к специфическим функциям этих зон и являться своеобразными структурными и функциональными маркерами. Изучение таких белков имеет большое значение для исследования как нормальных, так и патологических процессов, происходящих в мозгу.

TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS OF WATER-SOLUBLE DOG BRAIN PROTEINS

VOLOSHCHUK S. G., AKULOV I. N., LAPTEV A. V., DEMUSHKIN V. P.
All-Union Research Center of Mental Health, USSR Acad. Med. Sci., Moscow

A modification of the classical two-dimensional electrophoresis method (according to O'Farrell) has been developed. The composition of the dissociating solution and of the first dimension polyacrylamide gel (PAAG) have been changed. Electrophoresis in the second dimension was carried out in the 12% PAAG. Electrophoregrams were stained with silver. The conditions chosen made it possible to investigate proteins with molecular weight of 14—100 kDa in the pH range 4.3—7.3. The

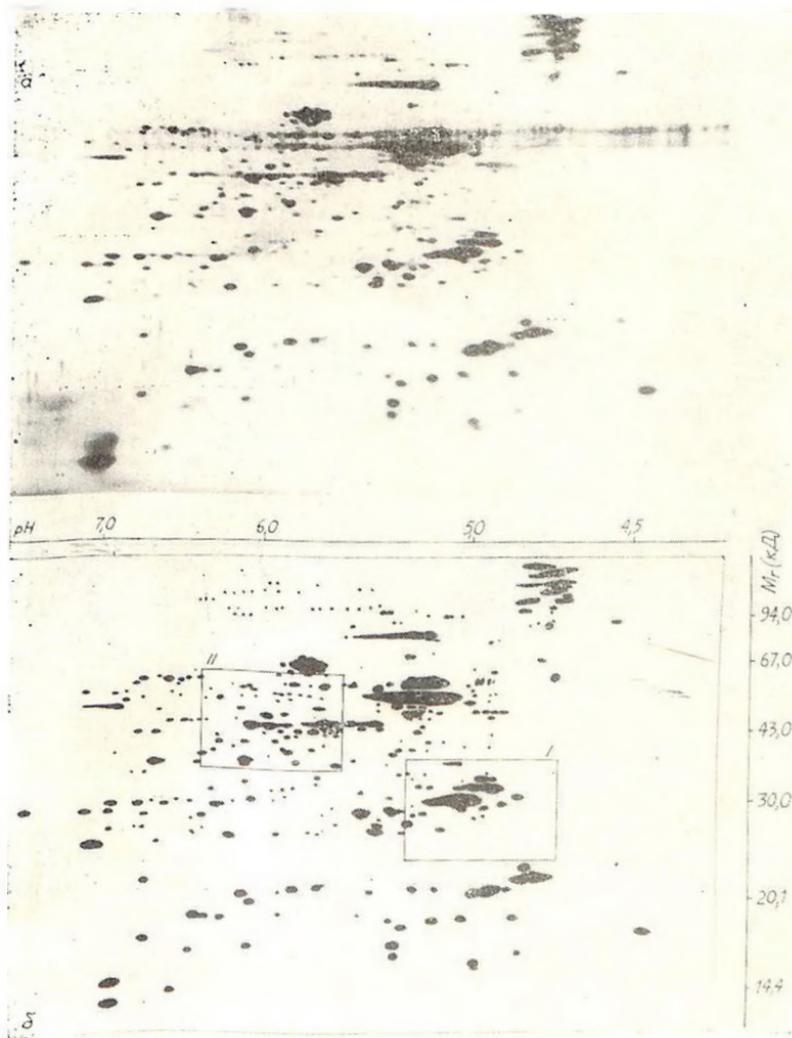


Рис. 1. Электрофоретграмма (а) и схема белковой карты (б) лобной коры больших полушарий мозга собаки. I и II—вариабельные участки, показанные на рис. 2

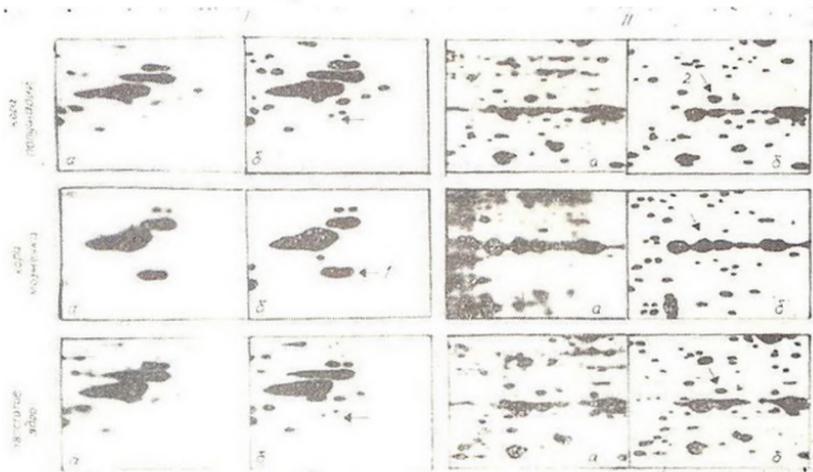


Рис. 2. Варибельные участки белковых карт лобной коры больших полушарий, коры мозжечка и хвостатого ядра мозга собаки. а—электрофореграмма, б—схема, I и II—соответствуют обозначению на рис. 1; 1—белок с координатами 5,0/28 к.Д., 2—белок с координатами 6,0/47 к.Д.

comparative analysis of the protein maps of the frontal cortex of brain hemispheres, cerebellar cortex and n. caudatus was carried out. The protein of cerebellum with pI 5.0 and molecular weight 28 kDa (5.0/28K) was found to be absent in the majority of other brain regions. Another protein with 6.0/47K coordinates, discovered in the protein maps of the frontal cortex and n. caudatus, is absent in the samples of the cerebellar cortex. Electrophoregrams of the hemispheres cortex and of the n. caudatus are similar.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. O'Farrell P. H. J. Biol. Chem., v. 250, № 10, p. 4007—4021, 1975.
2. Bloch P. L., Phillips T. A., Neidhardt F. C. J. Bacteriol., v. 141, p. 1409—1420, 1950.
3. Manabe T., Hayama E., Okuyama T. Clin. Chem., v. 28, № 4, p. 824—827, 1982.
4. Anderson N. L., Giometti C. S., Gemmell M. A., Nance S. L., Anderson N. G. Clin. Chem., v. 28, № 4, p. 1084—1092, 1982.
5. Comings D. E. Clin. Chem., v. 28, № 4, p. 782—789, 1982.
6. Henstee J. G., Srere P. A. J. Biol. Chem., v. 254, № 12, p. 5488—5497, 1979.
7. O'Farrell P. Z., Goodman H. M., O'Farrell P. H. Cell, v. 12, p. 1133—1142, 1977.
8. Sammons D. W., Adams L. D., Nishizawa E. E. Electrophoresis, v. 2, p. 125—141, 1981.
9. Laemmli U. K. Nature, v. 227, p. 680—685, 1970.
10. Morrissey J. H. Anal. Biochem., v. 117, p. 307—310, 1981.
11. Merrill C. R., Goldman D. Clin. Chem., v. 28, № 4, p. 1015—1020, 1982.
12. Schlichter D. J., Casnellie J. E., Greengard P. Nature, v. 273, p. 61—62, 1978.
13. Schlichter D. J., Detre J. A., Aswad D. W., Chehrazi B., Greengard P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 77, № 9, p. 5537—5541, 1980.
14. Aswad D. W., Greengard P. J. Biol. Chem., v. 256, № 7, p. 3487—3493, 1981.

Поступила 7. VIII 1985