

УДК 577.112.34/82

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА У НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КЛАССОВ ПРЕСМЫКАЮЩИХСЯ И ПТИЦ

Пехименко Г.В.

Вопросами эволюции на молекулярном уровне занимаются исследователи с 70-х годов прошлого века и до нашего времени [3, 4, 5, 7, 8, 10].

Ряд общепринятых вопросов на которые пытаются ответить ученые: каким образом у животных, стоящих на различных ступенях эволюционного развития, возникли аналогичные молекулярные системы, выполняющие исходные функции; как эти системы возникли; в каком направлении они развиваются; как происходит процесс интеграции в систему различных элементов и ряд других общебиологических вопросов.

Наука, которая занимается решением этих вопросов – это сравнительная биохимия. При рассмотрении проблем сравнительной биохимии привлекают внимание исследователей гомологичные белки различных классов и видов царства животных.

Цель данной работы заключалась в исследовании аминокислотного состава сывороточных альбуминов у ряда представителей классов пресмыкающихся и птиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования был сывороточный альбумин препаративно выделенный с помощью электрофореза в полиакриламидном геле [1] и очищенный. Осаждали альбумин из его раствора 10 % трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Осадок последовательно промывали этанолом, смесью этанола с эфиром (2:1) и эфиром для удаления липидов. Брали 2 мг сухого белка помещали в ампулы, добавляли 2 мл 6 н раствора соляной кислоты (HCl), замораживали жидким азотом, откачивали воздух и запаивали. Такие манипуляции с белком позволяют предохранить от окисления серосодержащие аминокислоты. Гидролиз проводили в течение 24 часов в термостате при температуре 110 С. После охлаждения ампулы вскрывали, соляную кислоту удаляли в вакуум-эксикаторе [2]. Высушенный гидролизат растворяли в 2 мл 0,2 Н натрий-цитратного буфера с рН-2,2.

Содержание аминокислот определяли в институте медико-биологических исследований г. Пушкино Московской области на автоматическом анализаторе

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА У

аминокислот ААА-881 (Чехия) двухколончатый методом и вычисляли по формуле:

$$M = \frac{H \times W}{C} \quad (1),$$

где М – концентрация аминокислот;

Н – высота пика;

W-ширина пика на уровне равном половине высоты;

С – калибровочная константа, представляющая собой площадь пика по отношению к 1 М соответствующей аминокислоты и определяемая при калибровке прибора с помощью аминокислот известной концентрации.

Аминокислотный состав рассчитывали в моль процентах, который указывает на количество остатков данной аминокислоты на 100 аминокислотных остатков белка и количество аминокислотных остатков исследованной аминокислоты на один моль белка (585 остатков). При анализе аминокислотного состава альбумина не определяли триптофан, т.к. триптофана в данных препаратах очень мало. Аминокислоты Глу + Глн и Асп + Асн определяли суммарно.

Полученные в результате исследований данные обрабатывали с помощью пакета программ «STATISTICA 6.0». Результаты сравнительного анализа считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании аминокислотного состава сывороточных альбуминов класса птиц, было идентифицировано 17 аминокислот (табл. 1). Идентифицировав состав аминокислот сывороточных альбуминов четырех видов: утка домашняя, кура домашняя, гусь домашний, голубь сизый класса птиц, определяли диапазон консервативности (%) для каждой изученной аминокислоты (табл. 1). Изучив данные аминокислотного анализа, были отмечены некоторые особенности аминокислот в белках (табл. 1). Содержание всех исследованных аминокислот в сывороточных альбуминах данных видов класса птиц изменялось незначительно и наблюдалось относительно постоянное количество почти всех исследуемых аминокислот. В исследованиях не удалось определить суммарный поверхностный заряд исследуемых белков, так как аминокислоты Асп + Асн и Глу + Глн идентифицировали суммарно. Установлено, что исследуемые сывороточные альбумины характеризовались высоким содержанием Асп+Асн, Глу + Глн, Ала и низким содержанием таких аминокислот как Цис, Вал, Мет, Гис (табл. 1), а общее суммарное содержание гидрофильных остатков аминокислот выше, чем гидрофобных (табл. 3). Суммарное отношение гидрофобных к гидрофильным аминокислотным остаткам у ряда представителей класса птиц очень близко к таковому же соотношению у исследуемых белков класса пресмыкающихся (табл. 3). Эти соотношения очень близки и много меньше единицы, вследствие того, что у исследуемых белков преобладает общее суммарное содержание остатков гидрофильных аминокислот над гидрофобными. Таким образом, некоторые перечисленные особенности аминокислотного состава сывороточного альбумина данных представителей класса птиц, судя по всему, могут лежать в основе специфичности этих белков.

Таблица 1.

Аминокислотный состав сывороточного альбумина у некоторых представителей класса птиц (M±m)

Аминокислоты	Голубь сизый		Гусь дом.		Утка дом.		Кура дом.		Диапазон консервативности
	1	2	1	2	1	2	1	2	
Асп+Асн	9,5 ±0,7	56 ±2,8	9,3 ±0,7	55 ±2,8	9,8 ±0,7	57 ±2,8	9,8 ±0,7	57 ±2,9	96,5 ±4,8
Тре	4,8 ±0,3	28 ±1,4	4,8 ±0,3	28 ±1,4	4,5 ±0,3	27 ±1,4	5 ±0,4	29 ±1,5	93,1 ±4,7
Сер	4,8 ±0,3	28 ±1,4	5,4 ±0,4	32 ±1,6	6,4 ±0,4	37 ±1,9	6,2 ±0,4	26 ±1,3	75,7 ±3,8
Глу+Глн	15,7 ±0,9	92 ±4,6	15 ±0,9	88 ±4,4	13,4 ±0,8	79 ±4	13,8 ±1	80 ±4	85,9 ±4,3
Гли	6,3 ±0,4	37 ±1,9	6,6 ±0,5	39 ±2	5,4 ±0,4	32 ±1,6	6,6 ±0,5	38 ±1,9	82,1 ±4,1
Ала	9,5 ±0,7	56 ±2,8	8,9 ±0,6	52 ±2,6	8,4 ±0,6	49 ±2,5	9,3 ±0,7	54 ±2,7	87,5 ±4,4
Цис	2,9 ±0,2	17 ±0,8	3,4 ±0,2	20 ±1	4,6 ±0,3	27 ±1,4	3,7 ±0,3	21 ±1,1	63 ±3,2
Вал	5,8 ±0,4	34 ±1,7	5,8 ±0,4	34 ±1,7	6,1 ±0,4	36 ±1,8	6,8 ±0,5	40 ±2	85 ±4,3
Мет	1,6 ±0,1	9 ±0,5	2 ±0,1	12 ±0,7	2,1 ±0,1	12 ±0,7	2,1 ±0,1	12 ±0,6	75 ±3,8
Иле	3,9 ±0,3	23 ±1,2	3,9 ±0,3	23 ±1,2	4,9 ±0,3	28 ±1,4	4,1 ±0,3	24 ±1,2	82,1 ±4,1
Лей	9,1 ±0,6	53 ±2,6	8,6 ±0,6	50 ±2,5	7,6 ±0,5	44 ±2,2	7,5 ±0,5	44 ±2,2	83 ±4,2
Тир	2,8 ±0,2	16 ±0,8	2,8 ±0,2	16 ±1	3,1 ±0,2	18 ±1	2,4 ±0,2	14 ±0,7	72,2 ±3,6
Фен	3,5 ±0,3	20 ±1	3,7 ±0,3	21 ±1,1	4,4 ±0,3	26 ±1,3	4,4 ±0,3	25 ±1,3	80,8 ±4
Гис	2,4 ±0,2	14 ±0,7	2,8 ±0,2	16 ±1	2,4 ±0,1	14 ±0,8	3,3 ±0,2	20 ±1	70 ±3,5
Лиз	7,8 ±0,5	45 ±2,3	7,9 ±0,6	46 ±2,3	8,4 ±0,6	49 ±2,5	6,5 ±0,5	38 ±1,9	77,6 ±3,9
Арг	5,3 ±0,4	31 ±1,5	4,2 ±0,3	24 ±1,2	4,8±0,3	28 ±1,4	4,8 ±0,3	28 ±1,4	77,4 ±3,9
Про	4,3 ±0,3	25 ±1,3	4,2 ±0,3	24 ±1,2	3,7 ±0,26	22 ±1,1	3,8 ±0,3	22 ±1,1	88 ±4,4

Примечания: 1 - количество остатков аминокислот на 100 аминокислотных остатков белка; 2 - количество аминокислотных остатков на 1М белка (т.е. на 585 аминокислотных остатков).

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА У

Таблица 2.

Аминокислотный состав сывороточного альбумина у некоторых представителей класса пресмыкающихся (M±m)

Амино-кислоты	Альбумин								Диапазон консерват.
	Черепаша среднеазиатская		Уж водяной		Уж обыкновенный		Полос желтобрюхий		
	1	2	1	2	1	2	1	2	
Асп+Асн	8,4 ±0,6	49 ±2,5	10,9 ±0,6	63 ±3,2	10,5 ±0,6	61 ±3,2	9,9 ±0,6	58 ±2,9	77,8±3,9
Тре	5,2 ±0,4	30 ±1,5	5,4 ±0,3	31 ±1,6	5,4 ±0,4	32 ±1,6	5,1 ±0,4	30 ±1,5	93,8±4,7
Сер	5,3 ±0,4	31 ±1,5	6,1 ±0,4	36 ±1,8	6,3 ±0,4	37 ±1,9	5,8 ±0,4	34 ±1,7	83,8±4,2
Глу+Глн	10,9 ±0,7	64 ±3,2	14 ±0,8	82 ±4,1	13,9 ±0,8	86 ±4,3	13,7 ±0,8	80 ±4	78±3,9
Гли	5,3 ±0,4	32 ±1,6	5,4 ±0,4	31 ±1,6	5,9 ±0,4	35 ±1,8	7,2 ±0,5	42 ±2,1	73,8±3,7
Ала	8,2 ±0,6	48 ±2,4	7,6 ±0,5	45 ±2,3	7,1 ±0,5	41 ±2,1	8,2 ±0,6	48 ±2,4	85,4±4,3
Цис	4,7 ±0,3	27 ±1,4	4,3 ±0,3	25 ±1,3	5,4 ±0,4	26 ±1,3	4,3 ±0,3	25 ±1,3	92,6±4,6
Вал	6,1 ±0,4	36 ±1,8	6,3 ±0,4	37 ±1,9	6,1 ±0,4	36 ±1,8	6 ±0,4	35 ±1,8	94,6±4,7
Мет	1,7 ±0,1	10 ±0,7	0,4 ±0,02	2 ±0,1	0,6 ±0,04	4 ±2	0,4 ±0,03	2 ±0,1	20±1,2
Иле	5,4 ±0,4	32 ±1,6	5,6 ±0,3	33 ±1,7	5,5 ±0,4	32 ±1,6	5,1 ±0,4	30 ±1,5	90,9±4,5
Лей	9,2 ±0,6	54 ±2,7	8,2 ±0,6	48 ±2,4	8,1 ±0,6	48 ±2,4	7,7 ±0,5	45 ±2,3	83,3±4,2
Тир	2,8 ±0,2	17 ±1	2,7 ±0,2	16 ±0,8	2,7 ±0,2	16 ±0,8	2,4 ±0,2	14 ±0,7	82,4±4,1
Фен	4,8 ±0,3	28 ±1,4	3,9 ±0,3	23 ±1,2	3,9 ±0,3	23 ±1,2	3,5 ±0,2	20 ±1	71,4±3,6
Гис	3,9 ±0,3	23 ±1,2	4,8 ±0,3	28 ±1,4	4,6 ±0,3	27 ±1,4	5,8 ±0,4	34 ±1,7	67,6±3,4
Лиз	9,1 ±0,6	53 ±2,7	7,8 ±0,5	45 ±2,3	7,4 ±0,5	44 ±2,2	7,5 ±0,5	44 ±2,2	83±4,2
Арг	3,9 ±0,3	23 ±1,2	2,9 ±0,2	15 ±0,8	3,3 ±0,2	19 ±1	2,9 ±0,2	17 ±0,8	73,9±3,7
Про	4,7 ±0,3	27 ±1,4	3,9 ±0,3	23 ±1,2	4 ±0,3	23 ±1,2	4,3 ±0,3	25 ±1,3	85,2±4,3

Примечания: 1- количество остатков аминокислот на 100 аминокислотных остатков белка; 2- количество аминокислотных остатков на 1М белка (т.е. на 585 аминокислотных остатков).

Таблица 3.

Суммарные значения гидрофобных и гидрофильных аминокислот некоторых представителей классов пресмыкающихся и птиц и их суммарные отношения ($M \pm m$)

Вид животных	Суммы гидрофобных аминокислот	Суммы гидрофильных аминокислот	Отношения сумм гидрофобных к гидрофильным аминокислотам
Уж водяной	209 ± 10	375 ± 19	0,56 ± 0,03
Полос желтобрюхий	206 ± 10	378 ± 19	0,54 ± 0,03
Уж обыкновенный	207 ± 10	377 ± 19	0,55 ± 0,03
Черепаша среднеазиатская	234 ± 12	350 ± 17	0,67 ± 0,03
Гусь домашний	215 ± 11	363 ± 18	0,59 ± 0,03
Утка домашняя	217 ± 11	367 ± 18	0,59 ± 0,03
Голубь сизый	220 ± 11	364 ± 18	0,60 ± 0,03
Кура домашняя	222 ± 11	362 ± 18	0,61 ± 0,03

Следующими исследуемыми на аминокислотный состав белками были сывороточные альбумины некоторых представителей класса пресмыкающихся: ужа обыкновенного, ужа водяного, полоза желтобрюхого и черепахи среднеазиатской. Как и для класса птиц было идентифицировано 17 аминокислот, для каждой из которых был определен диапазон консервативности (табл. 2). У данных представителей класса пресмыкающихся, как и у представителей класса птиц, наблюдалось незначительное изменение диапазона консервативности аминокислот, т.е. определенный консерватизм в содержании аминокислот исследуемых белков. Только одна аминокислота (Met), у сывороточных альбуминов представителей класса пресмыкающихся значительно изменяла определяемый диапазон консервативности в отличие от белков представителей класса птиц. Суммарный поверхностный заряд у исследуемых сывороточных альбуминов не удалось определить по тем же причинам, что и у отдельных представителей класса птиц.

Необходимо, также отметить, что эти белки отличались высоким содержанием Asp +Asn, Глу +Глн и Лей, низким содержанием Вал. Цис, Met, Гис (табл. 2) С этим связано и различие между суммарной концентрацией гидрофобных и гидрофильных аминокислотных остатков, а также суммарное отношение (табл. 3) гидрофобных к гидрофильным аминокислотам.

Показано (табл. 1, табл. 2), что в исследуемых белках содержание аминокислот Глу +Глн, Ала, Лей, Лиз значительно превышало содержание любых других аминокислот. Из данных литературы известно [8, 9], что аминокислоты Глу, Ала, и Лей характеризуются сильной тенденцией к образованию α -спиральной конформации с одной стороны, а Вал, Met, и Иле склонны к организации β -структуры с другой.

В дальнейшем используя методы ИК - спектроскопии и кругового дихроизма, будут продолжены исследования конформационных особенностей данных изучаемых белков.

ВЫВОДЫ

1. Исследовав аминокислотный состав данных представителей классов пресмыкающихся и птиц можно отметить, что у них наблюдается высокое содержание аминокислот: Асп+Асн, Глу+Глн, Лей, Лиз, Ала и низкое содержание Тир, Цис, Мет, Гис. Отношение сумм гидрофобных к гидрофильным аминокислотам очень близки, как внутри класса, так и между классами у данных представителей.

2. Высокое содержание в сыворотных альбуминах Глу, Ала и Лей свидетельствует о повышенном содержании α -спиральных участков. Наличие у данных белков аминокислот Вал, Ала, Лей указывает на склонность этих альбуминов к организации β -структуры.

3. Как для представителей класса птиц, так и для класса пресмыкающихся наблюдаются незначительные изменения диапазона консервативности для каждой аминокислоты, что свидетельствует об определенном эволюционном консерватизме в содержании аминокислот исследуемых белков.

Благодарности: Выражаю искреннюю благодарность Мартынюку В.С. за полезное обсуждение проблемных вопросов молекулярной эволюции и высказанные пожелания и замечания при подготовке данной работы.

Список литературы

1. Ажицкий Г.Ю., Багдасарян С. Н. О возможности выделения мономерного иммунохимически чистого сывороточного альбумина // Лаб. дело. – 1975. - № 12. – С. 712-714.
2. Бенсон Д.В., Паттерсон Д.А. Хроматографический анализ аминокислот и пептидов на сферических смолах и его применение в биохимии и медицине // Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков. – М.: Мир, 1974. – С. 9-85.
3. Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. – М.: Мир, 1985. – 394 с.
4. Крепс Е.М. Об эволюции морфо-физиологической и эволюции биохимической // Журн. эвол. биохим. и физиол. – 1976. – Т. 12, № 6 – С. 493-522.
5. Сравнительная биохимия позвоночных / Под ред. Крепса Е.М. - Л.: Наука. – 1983. – 63с.
6. Ойвин И.А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований // Новые методы биохимической фотометрии. – М.: Наука, 1965, - С. 495.
7. Оленов Ю.М. Об эволюции белков и структурных генов // Общая биология. – 1976. – Т. 37, №3. – С.344-356.
8. Остоловский Е.М. Сравнительна характеристика структурных и функциональных особенностей альбумина сыворотки крови в ряду позвоночных: Дисс. докт. биол. наук: – Симферополь, 1992. – С. 144-146.
9. Попов Е.М. Структурная организация белков. – М.: Наука, 1989. – 352 с.
10. Уголев А.М. Принципы организации и эволюции биологических систем // Журн. эвол. биохим. и физиол. 1989. – Т. 25, №2. – С. 215-233.

Поступила в редакцию 12.10.2005 г.