УДК 577.12
DOI: 10.21685/2307-9150-2016-3-6

Ж. В. Гришина, М. Т. Генгин

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ В ЛИЧИНКАХ ТРУТНЕВОГО РАСПЛОДА НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ

Аннотация.

Актуальность и цели. В нашей работе мы изучили физико-химические и биологические свойства белков и пептидов трутневых личинок с целью выяснения динамики изменения белков и пептидов в ходе развития трутневых личинок.

Материалы и методы. Работа выполнена на личинках трутневого расплода разного возраста. Получены препараты экстрактов пептидов из личинок трутневого расплода методом осаждения белков 5 % трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Исследована динамика содержания белков и пептидов методом гель-фильтрация.

Результаты. Установлена динамика изменения содержания белков и пептидов в личинках трутневого расплода на разных стадиях развития. Показана количественная и качественная дифференциация белков и пептидов в зависимости от возраста личинок. Установлено, что содержание пептидов достигает максимума на пятые сутки развития личинок, минимум наблюдается на восьмые сутки.

Выводы. Предполагается, что такая динамика содержания пептидов на разных этапах развития личинок трутней обусловлена разной интенсивностью процессов, в регуляции которых принимают участие пептиды.

Ключевые слова: белки и пептиды, личинки трутневого расплода, метод гель-фильтрации.

Zh. W. Grishina, M. T. Gengin

A RESEARCH OF PROTEINS AND PEPTIDES IN DRONE BROOD LARVAE AT DIFFERENT STAGES OF DEVELOPMENT

Abstract.

Background. The physical, chemical and biological properties of proteins and peptides in ontogeny of drone larvae were researched. The dynamics of changes of proteins and peptides in drone brood larvae at different stages of development was analyzed.

Materials and methods. The experiment was carried out in drone brood larvae. Extracts of peptides were prepared by protein precipitation of 5 % TCA. The dynamics of changes of proteins and peptides was investigated by the gel filtration method.

Results. The authors have ascertained the dynamics of changes of proteins and peptides in drone brood larvae at different stages of development. The article shows the quantitative and qualitative differentiation of proteins and peptides by larvae age. It has been found that the content of peptides peaks on the 5th day of larval development, the minimum is observed on the 8th day.

Conclusions. It is assumed that the content of such dynamics of peptides at various stages of development of drone larvae is caused by different intensity of processes, partially regulated by peptides.

Key words: proteins and peptides, drone brrod larvae, gel filtration method.

Введение

Изучению физиологически активных пептидов уже в течение многих лет уделяется большое внимание ввиду их участия в регуляции обмена веществ, а также возможности создания на их основе новых лекарственных препаратов [1, 2]. Широко известна их роль в регуляции различных процессов клеточной активности животных. В то же время данные о физиологических функциях пептидов в продуктах пчеловодства сравнительно скудны.

Пептиды представляют собой низкомолекулярные биорегуляторы, под контролем которых находятся важнейшие процессы онтогенеза животных: перестройка белков при смене фаз развития организма, закладка органов и других структур. Для животных систем показано, что пептиды, являющиеся производными белков, могут быть разделены на две основные группы: биоактивные пептиды, образующиеся в результате селективного действия пептидаз на специализированные белки-предшественники, и пептиды, образующиеся в результате протеолитической деградации остальных белков, имеющих собственную, часто хорошо изученную функцию [3].

Таким образом, протеолиз (ферментативный гидролиз пептидных связей в белках и пептидах) – один из универсальных процессов живой природы. Он играет важную роль в поддержании стационарных концентраций белков в живой клетке [4].

Все без исключения структурные белки, ферменты, многочисленные по спектру физиологического действия пептиды в той или иной степени подвержены действию протеолитических ферментов. Исходя из сказанного можно сделать вывод, что протеолитические ферменты интересны в последнее время прежде всего как факторы регуляции обмена веществ [5].

Исходя из вышесказанного мы предприняли попытку исследовать динамику изменения белков и пептидов в ходе развития трутневых личинок. Динамика изменения количественного и качественного соотношения белков и пептидов в онтогенезе в быстрорастущих и активно развивающихся организмах, по нашему мнению, является адекватным показателем для выяснения их роли в процессе превращения личинок.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали личинки трутневого расплода 4, 5, 6, 7, 8, 9-суточного возраста.

Количественное содержание белков и пептидов в разных возрастах личинок определяли в 10 % водных экстрактах по методу Лоури [6]. 1 г личинок гомогенизировали в 10 мл 0,9 % NaCl, затем на рефрижераторной центрифуге в течение 30 минут при 10 000 об./мин отделяли оставшиеся неразрушенные клетки и субклеточные структуры. Все операции проводили в ледяной бане при температуре 5–7 °С.

Экстракты препаратов пептидов получали путем осаждения белков 5 % ТХУ с последующим центрифугированием 4000 об./мин 20 минут. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость использовали как источник пептидов.

Разделения белковой и пептидной фракций в исходных экстрактах осуществляли методом гель-фильтрации на колонке 35×1,5 см, заполненной сефадексом G-25. На колонку, предварительно уравновешенную 0,9 % NaCl, наносили 500 мкл раствора белка с концентрацией 4 мг/ мл. Скорость элюции

белков с колонки составила 30 мл/ч, собирали 30 проб по 2 мл. Параметры колонки определяли по голубому декстрану и рибофлавину [7]. Параметры колонки: свободный объем – 20 мл, внутренний – 58 мл. Концентрацию элюирующихся белков измеряли спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программы Microsoft Excel 2010. Сравнение средних значений показателей определяли с использованием *t*-критерия Стьюдента, дисперсионного анализа и критерия U Манна – Уитни [8].

Результаты и их обсуждение

Количественное соотношение белков и пептидов в личинках трутневого расплода разного возраста представлено на рис. 1.

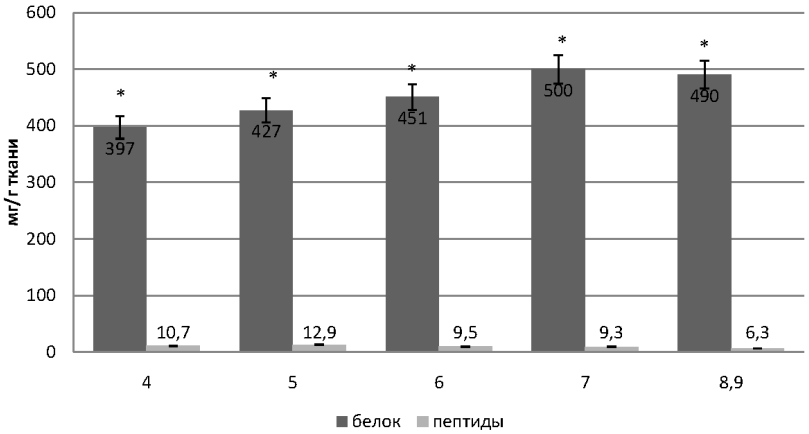
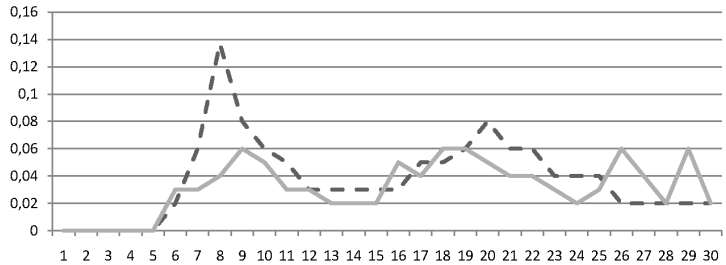


Рис. 1. Содержание белков и пептидов в мг на 1 г ткани личинок трутневого расплода разных возрастов: ось абсцисс – возраст личинок, сутки, ось ординат – содержание белков и пептидов в мг/г свежей ткани (M ± m, n = 5, $p<0,05$)

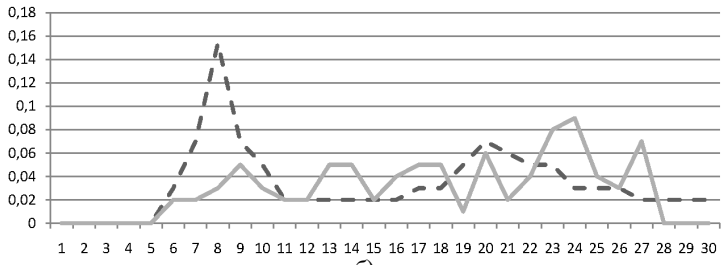
На данном рисунке видно, что по мере развития личинки трутня количество белка возрастает: у 4-суточных личинок в 1 грамме свежей ткани содержится 397 мг белка, на 8 сутки содержание белка достигает 490 мг, в то время как количество пептидов, наоборот, снижается. Судя по нашим данным, у личинок 4-суточного возраста количество пептидов на 1 грамм свежей ткани составляет 10,7 мг. У 5-суточных личинок наблюдается максимум содержания пептидов – 12,9 мг, на 6 сутки количество пептидов резко уменьшается – 9,5 мг, минимальное содержание пептидов обнаружено у 8–9-суточных личинок – 6,3 мг, что вдвое меньше, чем у 5-суточных личинок.

Это может свидетельствовать о том, что именно на ранних стадиях развития личинки наиболее интенсивно протекают процессы биосинтеза белка, в регуляции которого принимают участие пептиды [9, 10].

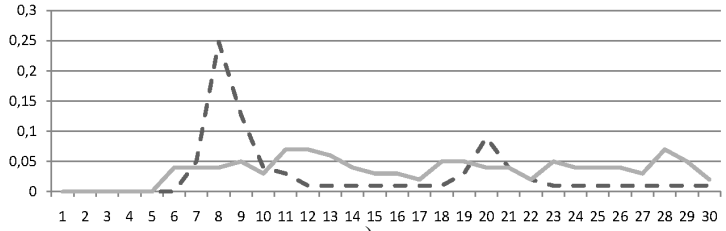
Для дифференцировки белков и пептидов по молекулярной массе использовали гель-фильтрацию на колонке, заполненной сефадексом G-25. На колонку наносили образцы каждого возраста: исходных 10 % водных экстрактов и препараты пептидов. Результаты разделения высокомолекулярных белков и пептидов и низкомолекулярных представлены на рис. 2.



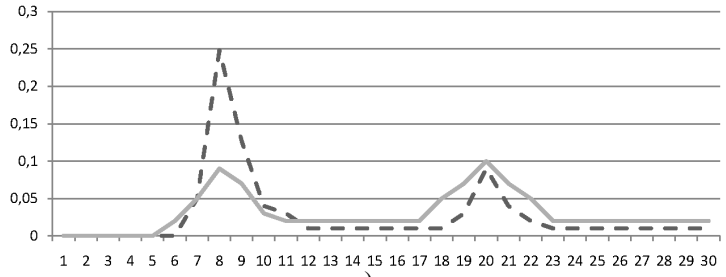
а)



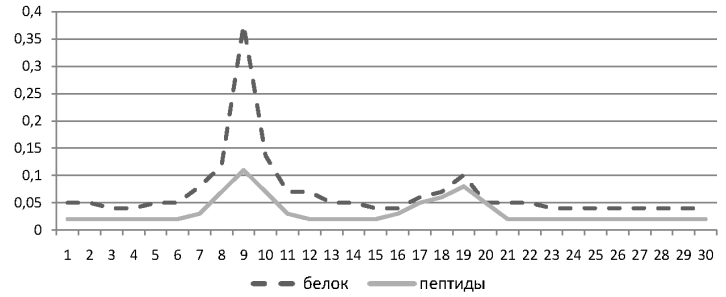
б)



в)



г)



д)

Рис. 2. Профили элюции белков экстрактов личинок трутневого расплода на разных стадиях развития: ось абсцисс – номер фракции, ось ординат – оптическая плотность при 280 нм: *а* – 4-суточные; *б* – 5-суточные; *в* – 6-суточные; *г* – 7-суточные; *д* – 8–9-суточные

При рассмотрении рисунка видно, что профили элюции исходных 10 % экстрактов имеют два белковых пика: в свободном объеме – высокомолекулярный пик (белковый) и низкомолекулярный пик (пептидный) за свободным объемом.

На начальных стадиях развития личинки разнообразие пептидов значительно выше, о чем свидетельствуют профили элюции препаратов пептидов. Из рис. 2 видно, что профиль элюции пептидов 4, 5, 6-суточных личинок значительно отличается от профилей элюции пептидов более поздних возрастов, в которых характер кривой препаратов пептидов аналогичен кривой исходных экстрактов.

По результатам анализов профиля элюции белков и пептидов на разных стадиях развития личинок трутней можно предположить, что на начальных этапах развития личинок разнообразие пептидов несколько больше, чем на поздних этапах. Начиная с 7-суточного возраста и по 11 сутки профиль элюции имеет аналогичный характер распределения белков и пептидов: 1 пик в свободном объеме (высокомолекулярные пептиды) и 2 пик за свободным объемом (низкомолекулярные пептиды). По литературным данным, именно фракция низкомолекулярных пептидов (до 5 кДа) обладает регуляторным и ноотропным действием [1, 9].

Выводы

1. В ходе развития личинок трутней происходит увеличение содержания общего белка от 4–5 суток к 8–9, в то время как содержание пептидов, наоборот, снижется.

2. Максимально содержание пептидов обнаружено у 5-суточных личинок.

Список литературы

1. **Мясоедов, Н. Ф.** Разработка основ создания пептидных лекарственных препаратов / Н. Ф. Мясоедов // Белки и пептиды : тр. V Российского симп. – Петрозаводск, 2011. – 52 с.
2. **Лазарян, Д. С.** Сравнительное изучение аминокислотного состава пчел / Д. С. Лазарян // Химико-фармацевтический журнал. – 2002. – Т. 36, № 12. – С. 42–44.
3. **Скрипников, А. Ю.** Поиск и идентификация пептидов мха Physcomitrella patens / А. Ю. Скрипников, Н. А. Аниканов, В. С. Казаков, С. В. Долгов, Р. Х. Зиганшин, В. М. Говорун, В. Т. Иванов // Биоорганическая химия. – 2011. – Т. 37. – С. 95–104.
4. **Немова, Н. Н.** К вопросу об эволюции протеолитических ферментов / Н. Н. Немова, Л. А. Бондарева // Биомедицинская химия. – 2008. – Т. 54, вып. 1. – С. 42–57.
5. **Генгин, М. Т.** Особенности структурно-функциональной организации и физико-химические свойства нелизосомальных пептидгидролаз мозга животных : дис. … д-ра биол. наук / Генгин М. Т. – Пенза, 2002. – С. 13–15.
6. **Lowry, O. H.** Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrought, A. G. Farr, R. J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–275.
7. **Соловьев, В. Б.** Лабораторный практикум «Физико-химические методы исследований» : учеб.-метод. пособие для студентов 3 курса специальности «Биохимия» / В. Б. Соловьев, М. Т. Генгин ; Пензенский государственный педагогический университет имени В. Г. Белинского. – Пенза, 2012. – 72 с.

8. **Ивантер, Э. В.** Элементарная биометрия : учеб. пособие / Э. В. Ивантер, А. В. Коросов. – Петрозаводск : Изд-во ПетрГУ, 2010. – 104 с.
9. **Хомутов, А. Е.** Регуляторные пептиды : учеб.-метод. пособие / А. Е. Хомутов, К. А. Пурсанов, З. В. Перепелюк. – Н. Новгород : Изд-во ННГУ, 2014. – 73 с.
10. **Хавинсон, В. Х.** Влияние регуляторных пептидов на транскрипцию генов / В. Х. Хавинсон, Л. К. Шатаева, А. А. Чернова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т. 136, № 9. – С. 328–330.

References

1. Myasoedov N. F. *Belki i peptidy: tr. V Rossiyskogo simp*. [Proteins and peptides: proceedings of V Russian symposium]. Petrozavodsk, 2011, 52 p.
2. Lazaryan D. S. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal* [Chemical and pharmaceutical journal]. 2002, vol. 36, no. 12, pp. 42–44.
3. Skripnikov A. Yu., Anikanov N. A., Kazakov V. S., Dolgov S. V., Ziganshin R. Kh., Govorun V. M., Ivanov V. T. *Bioorganicheskaya khimiya* [Bioorganic chemistry]. 2011, vol. 37, pp. 95–104.
4. Nemova N. N., Bondareva L. A. *Biomeditsinskaya khimiya* [Biomedical chemistry]. 2008, vol. 54, iss. 1, pp. 42–57.
5. Gengin M. T. *Osobennosti strukturno-funktsional'noy organizatsii i fiziko-khimicheskie svoystva nelizosomal'nykh peptidgidrolaz mozga zhivotnykh: dis. d-ra biol. nauk* [Features of structural and functional organization and physical and chemical properties of non-lysosomal peptidhydrolases of animal brain: dissertation to apply for the degree of the doctor of biological sciences]. Penza, 2002, pp. 13–15.
6. Lowry O. H., Rosebrought N. J., Farr A. G., Randall R. J. *J. Biol. Chem*. 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265–275.
7. Solov'ev V. B., Gengin M. T. *Laboratornyy praktikum «Fiziko-khimicheskie metody issledovaniy»: ucheb.-metod. posobie dlya studentov 3 kursa spetsial'nosti «Biokhimiya»* [Laboratory work “Physical and chemical methods of research”: learner’s guide for 3rd year students of biochemistry major]. Penza State Pedagogical University named after V. G. Belinsky. Penza, 2012, 72 p.
8. Ivanter E. V., Korosov A. V. *Elementarnaya biometriya: ucheb. posobie* [Elementary biometrics: learner’s guide]. Petrozavodsk: Izd-vo PetrGU, 2010, 104 p.
9. Khomutov A. E., Pursanov K. A., Perepelyuk Z. V. *Regulyatornye peptidy: ucheb.-metod. posobie* [Regulatory peptides: learner’s guide]. Nizhny Novgorod: Izd-vo NNGU, 2014, 73 p.
10. Khavinson V. Kh., Shataeva L. K., Chernova A. A. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* [Bulletin of experimental biology and medicine]. 2003, vol. 136, no. 9, pp. 328–330.

Гришина Жанна Валерьевна
аспирант, Пензенский государственный университет (Россия, г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: grinzanetk@gmail.com

Grishina Zhanna Waler’evna
Postrgraduate student, Penza State University (40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Генгин Михаил Трофимович
доктор биологических наук, профессор, кафедра общей биологии и биохимии, Пензенский государственный университет (Россия, г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: gengin07@yandex.ru

Gengin Mikhail Trofimovich
Doctor of biological sciences, professor, sub-department of biology and biochemistry, Penza State University (40 Krasnaya street, Penza, Russia)

УДК 577.12
Гришина, Ж. В.
Исследование белков и пептидов в личинках трутневого расплода на разных стадиях развития / Ж. В. Гришина, М. Т. Генгин // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. – 2016. – № 3 (15). – С. 57–63. DOI: 10.21685/2307-9150-2016-3-6