

ПРИМЕНЕНИЕ КОНКАНАВАЛИНА-А ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ГЛИКОПРОТЕИНОВ И ИХ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ ПАРАЛЛЕЛЬНО С ДРУГИМИ БЕЛКАМИ

И. Д. Головацкий, Б. А. Савчик

Введение. В литературе имеются данные о выделении и очистке полисахаридов, гликопротеинов и гликопептидов с помощью метода аффинной хроматографии на конканавалине-А, присоединенном к агарозе или сефарозе [1, 2], а также методом двойной иммунодиффузии в агаровом геле [3].

Механизм взаимодействия конканавалина-А с гликопротеинами описан [4].

Используемые методы выявления гликопротеинов [5, 6] не дают возможности охарактеризовать их в сопоставлении с другими белками. Исходя из этого нами проведена разработка метода выделения гликопротеинов и их разделения электрофорезом в полиакриламидном геле параллельно с другими белками с использованием конканавалина-А.

Материалы и методы. Исследования проводили на сыворотке крови и печени крыс, а также сердечной мышце крупного рогатого скота. Гомогенаты готовили из измельченной ткани в жидком азоте, в буферном растворе ТКМ (0,05 М трис-НСl, рН 8,0, 0,15 М КСl, 0,001 М MgCl₂) в соотношении 1 : 7. Центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин. К надосадочной жидкости ткани или сыворотке крови, разбавленной 1 : 10, добавляли конканавалин-А производства «Fluka» (Швейцария) из расчета 2,5—3,0 мг препарата на 1 мг белка и выдерживали 4 ч при комнатной температуре. Преципитат суспендировали и часть пробы (около 200 мкг белка) отбирали для электрофореза всех белков. Оставшуюся часть пробы центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин для полного осаждения преципитата. Надосадочную жидкость отбирали и часть ее, соответствующую взятой ранее суспензии, наносили для электрофоретического разделения надосадочных белков. Осадок трижды отмывали буфером ТКМ и суспендировали в том же буфере. Для выделения из осадка отдельных гликопротеинов суспензию разделяли на три равные части по 0,3 мл. В одну часть добавляли 0,055 ммоль глюкозы, во вторую столько же маниозы, третья часть суспензии являлась контролем. После 30 мин выдерживания всех частей суспензии при комнатной температуре их центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин, и надосадочную жидкость наносили на пластинки геля. Электрофорез проб проводили одновременно на одной пластинке размером 120×160×1,5 мм. Полиакриламидный гель с DS-Na готовили по Лемли [7]. Концентрация разделяющего геля 10 %, концентрирующего — 3 %. Контакт геля с электродным буфером осуществляли с помощью фитиля из отмытой хроматографической бумаги. Напряжение, подаваемое на пластинку, составляло 20 В на 1 см трека. Время электрофореза 4,5 ч. Электрофореграммы фиксировали 16—18 ч в смеси этанол : ледяная уксусная кислота : вода (40 : 5 : 55) и окрашивали 0,1 %-ным раствором Кумасси R-250 в смеси этанол : ледяная уксусная кислота : вода (9 : 2 : 9).

Результаты и обсуждение. В предварительных исследованиях мы обнаружили, что реактивом Шиффа сначала проявляются 3—4 окрашенные полосы, затем на 6—7-й день — все фракции, как при окрашивании Кумасси. Это указывает на невысокую специфичность данного реактива для выявления гликопротеинов в полиакриламидном геле с DS-Na. В связи с этим для их осаждения был использован конканавалин-А с последующими фракционированием, вымыванием моносахаридами и электрофоретическим разделением. На рис. 1 приведены электрофореграммы сыворотки крови крысы. Видно, что при обработке конканавалином-А не происходит каких-либо изменений в разделении суммарных белков. Полосы конканавалина-А четко ограничены, они в этих условиях электрофореза выявляются мономером с молекулярной массой 25 000. В надосадочной жидкости отсутствуют по сравнению с осадком

высокомолекулярные белки, а также ряд белков средней и низкой молекулярной массы, причем глюкоза вытесняет только часть белков зоны альбумина по сравнению с влиянием маннозы. Таким образом, основное содержание образовавшегося с конканавалином-А осадка — это

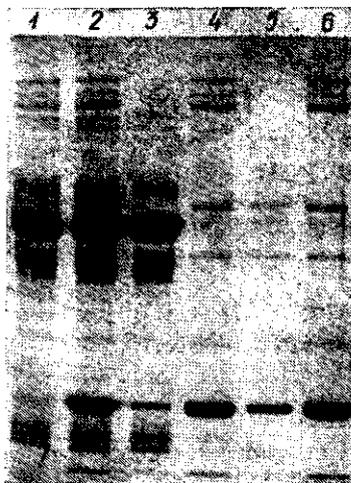


Рис. 1. Электрофореграммы сыворотки крови крысы: 1 — сыворотка без добавок; 2 — суспензия сыворотки и конканавалина-А; 3 — надосадочная жидкость суспензии; 4 — осадок суспензии (контроль); 5 — надосадочная жидкость из осадка после обработки глюкозой; 6 — надосадочная жидкость из осадка после обработки маннозой. Окраска Кумасси

Fig. 1. Electrophoregrams of the rat blood serum: 1 — serum without additions; 2 — serum and concanavalin-A suspension; 3 — supernatant fraction of the suspension; 4 — precipitate of the suspension (control); 5 — supernatant fraction of the precipitate after glucose treatment; 6 — supernatant fraction of the precipitate after mannose treatment. Stained by Coomassie

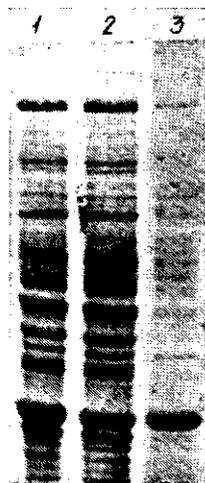


Рис. 2. Электрофореграммы гомогената печени крысы: 1 — суспензия гомогената печени и конканавалина-А; 2 — надосадочная жидкость суспензии; 3 — осадок суспензии. Окраска Кумасси

Fig. 2. Electrophoregrams of the rat liver homogenate: 1 — the liver homogenate and concanavalin-A suspension; 2 — supernatant fraction of the suspension; 3 — precipitate of the suspension. Stained by Coomassie

Рис. 3. Электрофореграммы сердечной мышцы быка: 1 — суспензия гомогената и конканавалина-А; 2 — надосадочная жидкость суспензии; 3 — осадок суспензии. Окраска Кумасси

Fig. 3. Electrophoregrams of the bovine heart muscle: 1 — homogenate and concanavalin-A suspension; 2 — supernatant fraction of the suspension; 3 — precipitate of the suspension. Stained by Coomassie

гликопротеины, имеющие в своем составе маннозу. В целом в сыворотке крови крысы обнаруживаются 16 зон гликопротеинов. Обработка экстракта печени крысы конканавалином-А (рис. 2) сопровождается осаждением около 20 зон белков с иной электрофоретической подвижностью, чем в сыворотке крови (рис. 1). Электрофореграммы гликопро-

теннов осадков из сердечной мышцы крупного рогатого скота (рис. 3) также отличаются от печени и сыворотки крысы. Полученные результаты хорошо воспроизводимы. Применение конканавалина-А с последующей обработкой осажденных гликопротеинов моносахаридами (глюкоза, манноза), их фракционирование и окрашивание фореграмм можно использовать для выделения и анализа гликопротеинов при одновременном сопоставлении с суммарными белками и надосадочной фракцией. Метод дает возможность получить характеристики соотношений гликопротеинов с другими белками без дополнительной затраты времени.

CONCANAVALIN-A APPLICATION FOR THE ISOLATION OF GLYCOPROTEINS AND THEIR ELECTROPHORETIC SEPARATION PARALLEL WITH OTHER PROTEINS

I. D. Golovatsky, B. A. Savchik

A. V. Palladin Institute of Biochemistry,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Lvov Branch

Summary

A combination of the methods for precipitation of glycoproteins by concanavalin-A, for their release by monosaccharides (glucose, mannose) and for subsequent separation in the polyacrylamide gel has been used for simultaneous and parallel determination of certain glycoproteins and other tissue proteins. A good reproducibility of the results is established. 10-20 fractions of glycoproteins being, mainly, in bands corresponding to other proteins are shown to be present in different rat and bovine tissues.

1. *Lis H., Sharon N.* The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins) // *Ann. Rev. Biochem.*— 1973.—42.— P. 541—547.
2. *Луцки М. Д., Панасюк Е. Н., Луцкий А. Д.* Лектины.— Львов: Вища школа, 1981.— 153 с.
3. *Методы исследования углеводов* / Под ред. Н. Я. Хорлина.— М.: Мир, 1975.—445 с.
4. *Хьюз Р.* Гликопротеины.— М.: Мир, 1985.—140 с.
5. *Гааль Э., Медвиши Г., Верецкей Л.* Электрофорез в разделении биологических макромолекул.— М.: Мир, 1982.—446 с.
6. *Faye L., Chrispeels M. J.* Characterization of N-linked oligosaccharides by affinoblotting with concanavalin-A — peroxidase and treatment of the blots with glycosidases // *Analyt. Biochem.*— 1985.—149, N 2.— P. 218—224.
7. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4 // *Nature.*— 1970.—227, N 5259.— P. 680—685.

Ин-т биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Львов. отд-ние

Получено 28.03.86

УДК 575.24.577.352

РОЛЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ФОРМИРОВАНИИ КОМПЕТЕНТНОСТИ ДРОЖЖЕВЫХ ПРОТОПЛАСТОВ К ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Ю. И. Горлов, В. С. Кириллова, Л. Г. Жарова

Введение. Известно, что клетки микроорганизмов способны взаимодействовать с экзогенной ДНК (генетически трансформироваться) только в определенном, компетентном, состоянии. В нашей предыдущей работе [1] сообщалось об индукции у дрожжевых клеток компетентности к трансформации плазмидной ДНК после их обработки хелаторами, которые вызывают интенсификацию эндогенного перекисного окисления (ПО) липидов у этих организмов. Ингибирование окисления липидов антиоксидантом ионолом приводило к значительному снижению частоты трансформации дрожжевых клеток в случае индукции их компетент-