

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ SDS-PAGE ДЛЯ АНАЛИЗА СМЕСЕЙ БЕЛКОВ МЯСНЫХ КОМПОНЕНТОВ НА ПРИМЕРЕ *BOS GRUNNIENS*

Ахремко А.Г.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В. М. Горбатова», г. Москва

Аннотация. В настоящей статье предоставлены результаты сравнительного исследования различных способов пробоподготовки перед проведением одномерного электрофореза для выбора оптимальной для фракционирования белков мяса и мясных продуктов на примере *Longissimus dorsi Bos grunniens*. Были изучены следующие способы с применением буфера Лэммли, физиологического раствора, деонизированной воды, лизис-буфера и комбинация лизис-буфера и буфера Лэммли. Было обнаружено, что самым оптимальным способом пробоподготовки является использование лизис-буфера, с последующим добавлением буфера Лэммли для увеличения информативности электрофореграммы за счет высокого разрешения.

Ключевые слова: электрофорез, пробоподготовка, SDS-PAGE, мышечные белки.

Введение

Технология мясных продуктов, а так же их состав за последние годы претерпели существенные изменения, поэтому актуальность исследования мясных компонентов различными методами, а именно определение их фракционного состава, является весьма важным. SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) является широко используемым методом для разделения белковых смесей на основе взаимодействия белков с анионным детергентом, додецилсульфатом натрия (ДСН). Белок, связываясь с ДСН, приобретает общий отрицательный заряд, что позволяет разделять белковые фракции по молекулярной массе. Данный метод является удобным и эффективным инструментом анализа белковых компонентов [4].

На данный момент известно множество способов пробоподготовки для проведения электрофореза на основе различных экстрагентов, примером классического экстрагента является буфер Лэммли [5]. Его достоинство заключается в его универсальности, но в случае фракционирования мясных компонентов определяется меньшее количество белков и требуется большее количество образца. Так же известен метод пробоподготовки с использованием предварительной экстракции физиологическим раствором, он позволяет выявить больше белковых полос, но дополнительное введение соли в образец ухудшает разрешение электрофореграммы [2], поэтому в качестве экстрагента так же используют деонизированную воду, что позволяет сохранить четкость белковых полос на электрофореграмме. Альтернативой вышеописанным способам является пробоподготовка с лизис-буфером по O'Farrell, которую обычно используют

для 2D-электрофореза, в данном исследовании была рассмотрена её применимость для 1D-электрофореза [6].

Таким образом, целью работы являлось сравнительное исследование способов пробоподготовки на примере мяса Яка, чтобы выявить наиболее оптимальную для мясного сырья и мясных продуктов.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования являлась длиннейшая мышца спины *Longissimus dorsi Bos grunniens*. Образцы замораживали, после дефростации измельчали, проводили экстракцию: 1 – деонизированной водой в комбинации с буфером Лэммли, 2 - раствором натрия хлорида (0,9 %) на лабораторной диспергирующей установке (Лаботекс, Россия) [1] и после буфером Лэммли, 3 – лизис-буфером комбинации с буфером Лэммли, 4 – лизис-буфером [6], 5 – Буфером Лэммли. Далее растворенные белки отделяли от взвеси на центрифуге Eppendorf 5810R (Eppendorf, Германия) при 14000 об/мин в течение 8 мин, для исследования использовали надосадочную жидкость (супернатант).

Анализ фракционного состава белков исследуемых образцов проводили методом электрофореза в 12,5 % полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с использованием электрофоретической камеры фирмы «VE-10» (Helicon, США), при постоянном напряжении 60 В и после достижения фронта разделяющего геля 130 В, в течение 2,5 часов. В качестве стандарта для электрофореза использовали маркер фирмы «Thremo» (Thremo, США) представляющих собой смесь 11 рекомбинантных белков от 5 до 250 кДа.

Результаты исследований

При анализе мышечной ткани Яка методом электрофореза была получена следующая электрофореграмма (рисунок 1). Для повышения чувствительности метода была применена окраска азотнокислым серебром (рисунок 2) в модификации Blum'a [5].

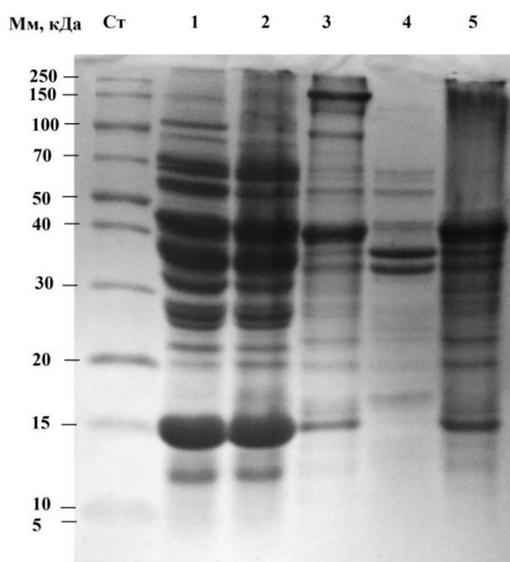


Рис. 1. Электрофореграмма 12,5 % ПААГ, кумасси G-250

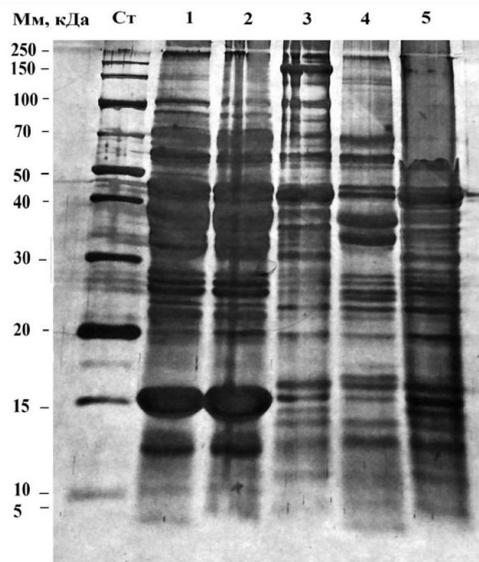


Рис. 2. Электрофореграмма 12,5 % ПААГ, азотнокислое серебро

Условные обозначения: Ст - маркеры молекулярной массы (250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10 и 5 кДа); 1 - Водный экстракт с буфером Лэммли; 2 - Экстракт с физиологическим раствором и буфером Лэммли; 3 - Экстракт с лизис-буфером и буфером Лэммли; 4 - Экстракт с лизис-буфером; 5 - Экстракт с буфером Лэммли.

Как видно из рисунков 1 и 2 при водной экстракции происходит четкое распределение полос, хорошо различимы мажорные мышечные белки. При экстракции физиологическим раствором можно заметить более полное разделение фракций, однако появляется размытый фон и некоторое смазывание полос, окрашивание серебром в данном случае нецелесообразно, из-за плохого конечного разрешения электрофореграммы. Лизис-буфер способствует получению качественного фракционного состава только после серебрения геля, что требует больше времени и дополнительного расхода реактивов. Используя в пробоподготовке лизис-буфер совместно с буфером Лэммли наблюдаются хорошо различимые белковые полосы без постороннего фона, чего не удается достичь при применении данных буферов по отдельности.

Равномерное распределение полос при водной экстракции (рис.1, трэк №1) достигается за счет выхода белков в раствор из-за уже имеющихся ионов солей и не возникает избыточная ионная сила, как в случае использования в качестве экстрагента физиологического раствора (рис.1, трэк №2), ввиду перегрузки геля из-за обилия вспомогательных ионов солей. Практикуя пробоподготовку только с буфером Лэммли (рис.1, трэк №5), на электрофореграмме можно увидеть основные структурные белки, но присутствует нечеткий белковый фон, что мешает при описании фракционного состава. Эффективность применения лизис-буфера (рис.2, трэк №4) объясняется содержанием в своем составе амфолинов с градиентом pH от 3 до 10, способствующих более дифференцируемому распределению белков, и 9 М раствора мочевины, который препятствует агрегации белковых молекул. В свою очередь, присутствующий «Тритон X-100» в лизис-буфере, улучшает растворение белков. Однако без дополнительного окрашивания серебром информативную электрофореграмму получить не удастся, но данная проблема решается добавлением Лэммли буфера (рис.1, трэк №3).

Выводы: Результаты проведенных электрофоретических исследований показали, что наиболее широкий спектр полос на электрофореграмме получается при использовании лизис-буфера в комбинации с буфером Лэммли: отсутствует побочный белковый фон, фракции хорошо различимы. Такими же положительными характеристиками обладает пробоподготовка с образцом, который обработали лизис-буфером и окрасили после «Кумасси G250» азотнокислым серебром. Наименее наглядной оказалась пробоподготовка с предварительной экстракцией физиологическим раствором: полосы нечеткие и присутствует размытый фон, предположительно эффект «размытия» связан с внесением дополнительного количества ионов солей в образец. Таким образом, было показано, что комбинация лизис-буфера с буфером Лэммли позволяет достичь высокого разрешения электрофореграммы и выявить не только мажорные структур-

ные белки, но и близкие по значениям молекулярной массы белки более специфичной природы.

Литература

1. Кашинова, Э.Б. Оптимизация технологических режимов выделения биологически активных веществ из сырья животного происхождения/ Э.Б. Кашинова, Е.А. Котенкова, Е.А. Ертикеева, А.Г. Ахремко //Актуальная биотехнология. – 2016. – №.1 (16). – С. 17–22.
2. Чернуха, И.М. Соединения антимикробного действия в слизистых оболочках животных / И.М. Чернуха, Л.В. Федулова, Е.Р. Василевская, Е.А. Ертикеева, А.Г. Ахремко // Все о мясе. – 2015. – №. 5. –С. 32–36.
3. Blum, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels/ H. Beir, H.G.Cross // Electrophoresis. – 1987. – V.8. – P. 126–129.
4. Hashiguchi, M. Inverse-gradient polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate for better separation of protein samples/M. Hashiguchi, K. Kimihiro, T. Hashiguchi//Electrophoresis. – 2011. – V. 55. – № 1. – P. 1-3.
5. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4/ U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – V. 227. – P. 680 - 685.
6. O'Farrell, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins // J. Biol. Chem. – 1975. – V.250.(10). – P. 4007–4021.