

Дослідження складу екстрактів кріоконсервованих фрагментів шкіри та серця новонароджених поросят методом електрофорезу у трицин-ДСН-ПААГ

I.G. Беспалова¹, Л.А. Порожа¹, М.С. Гірич²

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

²Науково-дослідний інститут біології, Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна

Study of Composition of Cryopreserved Fragment Extracts From Newborn Piglet Skin and Heart Using Tricine-SDS-PAGE

I.G. Bepalova¹, L.A. Rohoza¹, M.S. Giryach²

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Research Institute of Biology, V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

Дослідження складу екстрактів кріоконсервованих фрагментів органів є актуальною задачею. Експериментально показано, що екстракти з кріоконсервованих фрагментів шкіри та серця новонароджених поросят прискорюють загоєння термічних травм шкіри і нормалізують кровопостачання серцевого м'яза щурів із ішемією міокарда.

У роботі було проведено електрофоретичне дослідження пептидного складу екстрактів кріоконсервованих фрагментів шкіри (ЕШП) і серця (ЕСЦП) новонароджених поросят.

Екстракти одержували шляхом інкубації фрагментів у фізіологічному розчині протягом 60 хв, фільтрували і видаляли термолабільні протеїни. Початкова концентрація речовин пептидної природи в екстрактах становила 100 мкг/мл. Дослідження екстрактів проводили методом одновимірного вертикального електрофорезу з використанням поліакриламідного гелю (ПААГ) у денатуруючих умовах. У анодного, катодного та гел-буфера рН становив 8,9, 8,25 і 8,45 відповідно. Катодний буфер містив трицин («Chem Cruz», США) [Schagger H., 2006]. Розмір пластини 10×10×0,1 см. Готували 4%-й формуючий та 16%-й фракціонуючий гелі, в яких формували комірки для внесення проби. Досліджувані екстракти концентрували (упарювали у вакуумі) в 5–6 разів. Об'єм проб становив 15–20 мкл на одну комірку, початковий струм – 10 мА/см². Фіксацію гелів проводили в 5%-му формальдегіді протягом 20–30 хв, а фарбування – у розчині кумасі діамантового блакитного G-250 («DIA-M», Росія). Як маркери-свідки використовували цитохром С із серця бика і Color Marker ULR («Sigma-Aldrich», США). Електрофореграми аналізували за допомогою програми «TotalLab TL120 1D» («Nonlinear Dynamics», Велика Британія).

Виявлено різницю між електрофореграмами пептидів ЕШП і ЕСЦП: основна маса речовин пептидної природи, які детектуються в ЕШП, знаходиться в діапазоні м. м. 600–14 000, а ЕСЦП – 1 000–14 000. Проведено денситометрію одержаних електрофореграм.

Метод електрофорезу у трицин-ДСН-ПААГ у комплексі з іншими методичними підходами може бути використаний для більш детального вивчення складу екстрактів.

Studying the composition of the extracts from cryopreserved organ fragments is now an actual task. It was experimentally demonstrated that the extracts from cryopreserved fragments of newborn piglet skin and heart accelerated the healing of thermal injuries of skin and normalized blood supply to heart muscle in rats with myocardial ischemia.

The research aim was to perform an electrophoretic determination of peptide composition of the extracts from piglet skin and heart cryopreserved fragments.

The extracts were obtained from cryopreserved fragments of newborn piglet skin (EPS) and heart (EPH) via incubating them in physiological solution for 60 min, then filtering and removing thermolabile proteins. An initial concentration of substances of peptide nature in the extracts was 100 µg/ml. The extracts were studied using the method of one-dimensional vertical electrophoresis in polyacrylamide gel (PAAG) under denaturing conditions. The anode, cathode and gel buffers had pH 8.9, 8.25 and 8.45, respectively. Cathode buffer comprised Tricine (Chem Cruz, USA) [Schagger H., 2006]. The plate dimension was 10×10×0.1 cm. There were prepared the 4% forming and 16% fractionating gels. The cells for sample introduction were formed in this gel. Studied extracts were concentrated (evaporated in vacuum) in 5–6 times. The sample volume was 15–20 µl per one cell. An initial current was 10 mA/cm². Gels were fixed in 5% formaldehyde within 20–30 min, and stained in Coomassie Brilliant Blue (DIA-M, Russia) solution. Cytochrome C from bovine heart and Color Marker ULR (Sigma-Aldrich, USA) were used as tracking markers. Electrophoregrams were analysed using TotalLab TL120 1D software (Nonlinear Dynamics, Great Britain).

Electrophoregrams of EPS and EPH peptides were different. The bulk of substances of peptide origin, detected in EPS was ranging from MW 600 to 14,000, and for EPH it was from 1,000 to 14,000. The densitometry of the obtained electrophoregrams was carried-out.

The electrophoresis in Tricine-SDS-PAAG together with other methodical approaches may be applied for more detailed study of extract composition.

