



УДК 577.112:57.043.017.322:547.422 <http://dx.doi.org/10.15407/dopovidi2016.04.099>

А. К. Гулевский, Д. В. Третьяк, Л. И. Релина, А. Ю. Никольченко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

E-mail: tretyak_diana@mail.ua

Эффект холодовой акклимации на криопреципитацию белков *Tenebrio molitor* в присутствии дегидратирующего агента полиэтиленгликоля

(Представлено академиком НАН Украины А. Н. Гольцевым)

Исследованы особенности криопреципитации белков с молекулярной массой от 10 до 200 кДа из личинок *Tenebrio molitor* в растворах дегидратирующего агента ПЭГ-6000. Показано, что состав криопреципитированных белков акклимированных и неакклимированных личинок *T. molitor* имеет количественные и качественные отличия. Установлено, что ПЭГ-6000 осаждает более эффективно белки из неакклимированных личинок *T. molitor*, чем белки из акклимированных особей.

Ключевые слова: холодовая акклимация, белки, полиэтиленгликоль, криопреципитация, электрофорез.

В настоящее время особое внимание криобиологов привлекают молекулярные механизмы адаптации биологических объектов к низким температурам. Важное значение в адаптационных процессах уделяется конформационным особенностям белковой молекулы, в частности изменению ее гибкости и гидрофобности [1, 2]. Именно сохранение и оптимизация функционального состояния макромолекул при различных температурных условиях среды является одной из главных особенностей эволюционных изменений белков холодадаптированных организмов [3, 4]. Ранее было установлено [5], что предварительная холодовая акклимация личинок *Tenebrio molitor* приводит к появлению их относительной резистентности к переохлаждению, что может быть связано с конформационными изменениями белков в процессе “холодовой закалки”. Для выявления факта конформационных изменений белков в качестве одного из подходов используют дегидратационные агенты, а именно полиэтиленгликоль (ПЭГ) [6, 7], который при охлаждении приводит к криопреципитации белков в зависимости от степени их гидрофобности. Целью исследования было изучить конформационные изменения белков из холодаакклимированных и переохлажденных личинок *Tenebrio molitor* по данным криопреципитации в растворе ПЭГ-6000.

© А. К. Гулевский, Д. В. Третьяк, Л. И. Релина, А. Ю. Никольченко, 2016

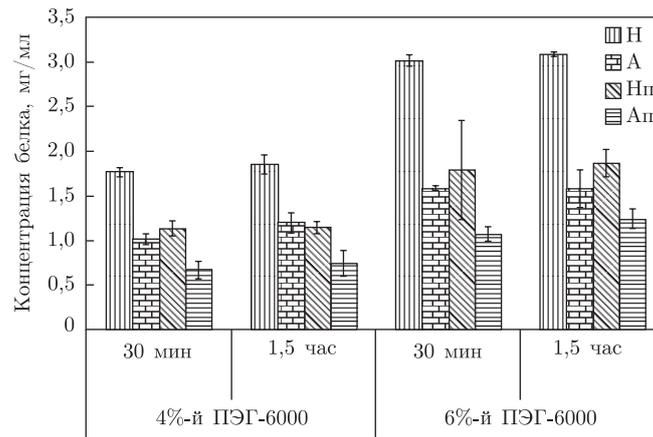


Рис. 1. Содержание белка в криопреципитатах: Н — неакклимированные личинки *T. molitor*, А — акклимированные личинки *T. molitor*, Нп — неакклимированные переохлажденные личинки *T. molitor*, Ап — акклимированные переохлажденные личинки *T. molitor*

Результаты представлены в виде средних величин \pm стандартное отклонение

Материалы и методы. В экспериментах использовали личинок большого мучного хрущака *T. molitor* (*Tenebrionidae*), акклимированных при 5–7 °С в течение трех недель. Акклимированных и неакклимированных личинок переохлаждали 3 сут при –6 °С. Из личинок получали гомогенат в 0,6%-м растворе хлорида натрия на 0,1 М Na-фосфатном буфере (рН 7,4) и центрифугировали 10 мин при 1800 g. Затем удаляли липидный слой и отбирали надосадочную жидкость, которую центрифугировали 60 мин при 100 000 g. Надосадок отбирали и определяли концентрацию белка в пробах по методу Бредфорда [8]. Криопреципитацию белков проводили ПЭГ-6000 с конечной концентрацией 4 и 6% при 4 °С в течение 0,5 и 1,5 ч. Осадок перерастворяли в 0,1 М Na-фосфатном буфере (рН 7,4) в соотношении 1 : 6, определяли концентрацию белка и готовили пробы для SDS-электрофореза [9].

Результаты и обсуждение. Анализ результатов криопреципитации белков с помощью ПЭГ-6000 показал, что белки, полученные из неакклимированных особей *T. molitor*, осаждались в большем количестве, чем белки из акклимированных, акклимированных переохлажденных и неакклимированных переохлажденных личинок (рис. 1). Полученные данные позволяют предположить, что в процессе холодной акклимации живых организмов, в условиях гипотермии и в еще большей степени “холодовой закалки” происходят конформационные перестройки белков, способствующие их устойчивости в присутствии дегидратирующего агента ПЭГ-6000. Следует отметить, что длительность криопреципитации на количество преципитированного белка особого влияния не оказывает, т. е. осаждения белков в течение 30 мин достаточно для установления изменений в пробах.

Показано, что с повышением концентрации ПЭГ-6000 количество осажденного белка увеличивается.

Учитывая низкий уровень метаболизма насекомых в выбранных условиях холодной адаптации, можно предположить, что конформационные изменения связаны не с изменением качественного состава белков, а с их молекулярными перестройками, которые обусловлены взаимодействием с низкомолекулярными продуктами, накапливающимися в процессе акклимации, в частности с полиолами [10–13] или сахарами [11–13]. Высказанное предположение подтверждается данными SDS-электрофореза белков личинок *T. molitor*. Как

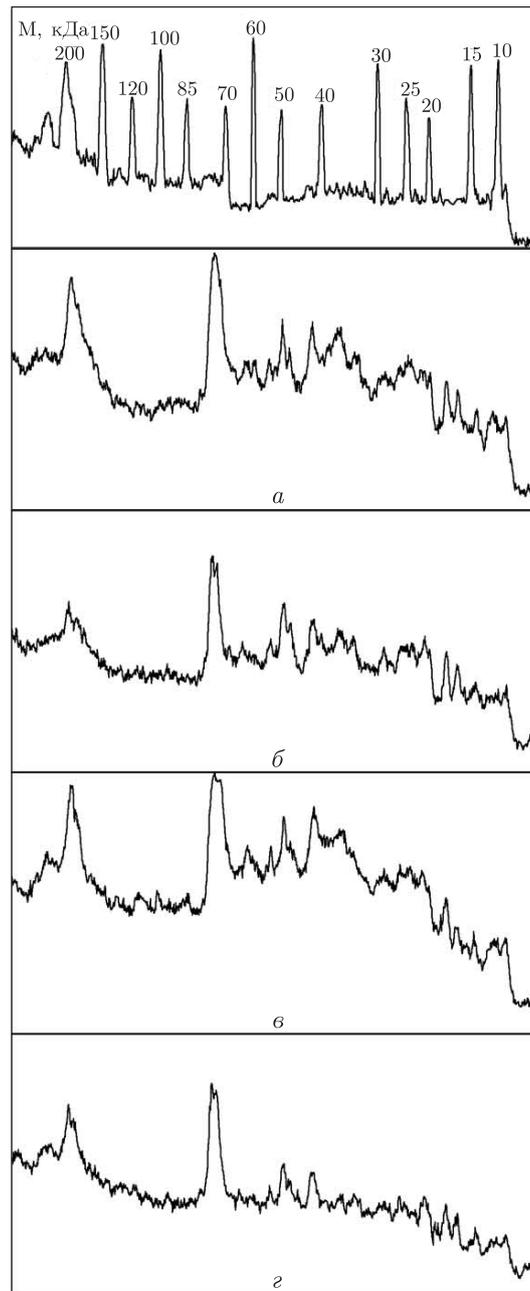


Рис. 2. Денситограмма электрофоретического спектра белков личинок *T. molitor*: М — маркеры молекулярной массы, а — неакклимированные, б — акклимированные, в — неакклимированные переохлажденные, г — акклимированные переохлажденные

видно из рис. 2, имеются некоторые количественные изменения в отдельных пиках денситограмм белков *T. molitor*, в то время как качественные отличия в белковом составе проб акклимированных и неакклимированных личинок практически отсутствуют. Денситограммы электрофоретического спектра белков личинок *T. molitor* содержат два основных пика с мол. массой 200 и 74,5 кДа, которые имеют качественные и количественные изменения (см. рис. 2), и минорные пики с меньшей молекулярной массой. В частности, после ак-

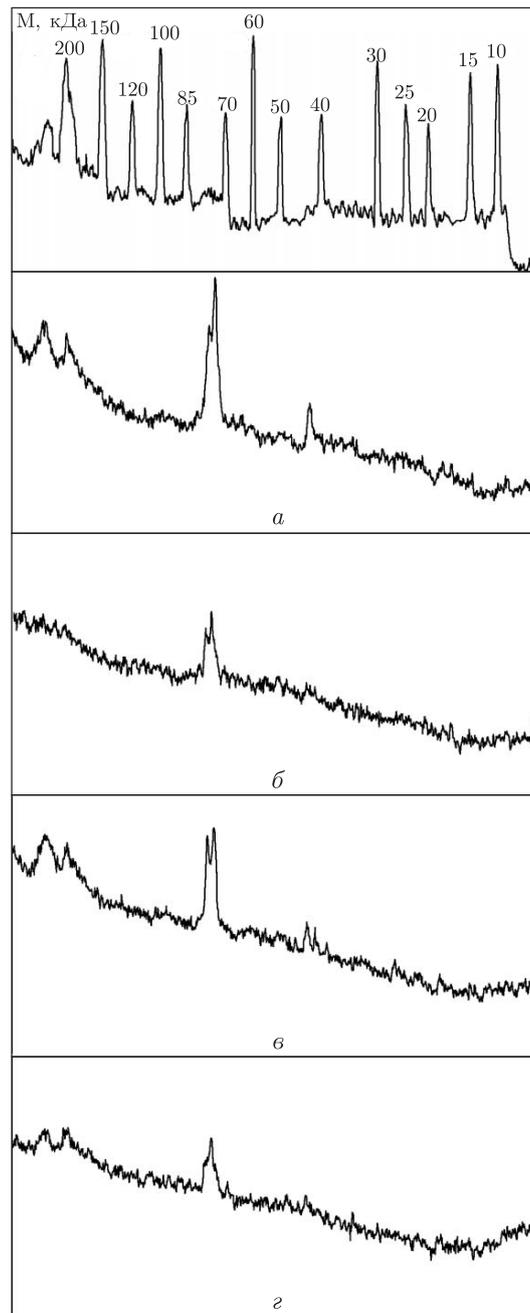


Рис. 3. Денситограмма электрофоретического спектра преципитированных 4%-м ПЭГ-6000 белков личинок *T. molitor*: М — маркеры молекулярной массы, а — неакклимированные, б — акклимированные, в — неакклимированные переохлажденные, г — акклимированные переохлажденные

климации насекомых количество белков с мол. массой 200 кДа существенно уменьшается, такая же ситуация наблюдается с белками акклимированных переохлажденных личинок.

При анализе белков из криопреципитированных 4%-м ПЭГ-6000 осадков также обнаружено уменьшение основного пика с мол. массой 74,5 кДа из акклимированных личинок (рис. 3). Можно отметить некоторые качественные изменения в спектре белков, а также

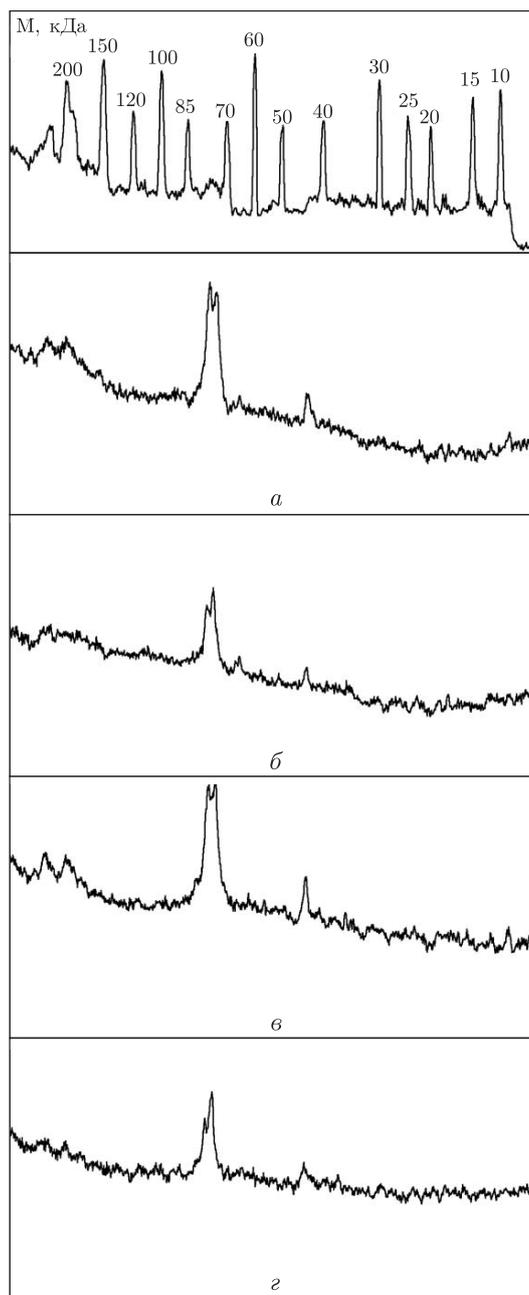


Рис. 4. Денситограмма электрофоретического спектра преципитированных 6%-м ПЭГ-6000 белков личинок *T. molitor*: М — маркеры молекулярной массы, а — неакклимированные, б — акклимированные, в — неакклимированные переохлажденные, г — акклимированные переохлажденные

существенное уменьшение содержания высокомолекулярных белков. Примерно такие же изменения наблюдали в случае белков неакклимированных переохлажденных и акклимированных переохлажденных особей *T. molitor*. Как видно из рис. 3, при использовании 4%-го ПЭГ-6000 состав белков неакклимированных и неакклимированных переохлажденных личинок между собой схож, как и акклимированных и акклимированных переохлажденных насекомых.

Увеличение концентрации ПЭГ-6000 до 6% не оказывало влияния на качественный состав преципитатов (рис. 4). Однако наблюдались количественные изменения основного пика с мол. массой 74,5 кДа денситограмм белков из личинок *T. molitor*. В частности, криопрещипитация белков с 4%-м раствором ПЭГ-6000 приводит к осаждению белков с мол. массой 45, 74,5 и ≥ 200 кДа во всех пробах, но с количественными отличиями (см. рис. 3). Согласно полученным данным, ПЭГ-6000 с конечной концентрацией 6% осаждает в большей степени белки с мол. массой 74,5 кДа и в меньшей степени протеины с мол. массой 45 и 200 кДа (см. рис. 4).

Таким образом, в процессе низкотемпературной акклимации насекомых, в гипотермических условиях или в условиях переохлаждения при -6 °C происходят определенные конформационные изменения белков личинок *T. molitor*, что удается обнаружить с помощью преципитирующего агента ПЭГ-6000. Это регистрируется как по данным количественного осаждения белков, так и по данным SDS-электрофореза.

Цитированная литература

1. D'Amico S., Marx J. C., Gerday C., Feller G. Activity-stability relationships in extremophilic enzymes // J. Biol. Chem. – 2003. – **278**, No 10. – P. 7891–7896.
2. Kahlke T., Thorvaldsen S. Molecular characterization of cold adaptation of membrane proteins in the *Vibrionaceae* core-genome // PLoS ONE. – 2012. – **7**, No 12. – e51761.
3. Franks F. Protein destabilization at low temperatures // Adv. Prot. Chem. – 1995. – **46**. – P. 105–139.
4. Jaenicke R., Böhm G. The stability of proteins in extreme environments // Curr. Opin. Struct. Biol. – 1998. – **8**, No 6. – P. 738–748.
5. Гулевский А. К., Рязанцев В. В., Зинченко А. В., Релина Л. И., Гриценкова Е. А. Способность к переохлаждению на различных стадиях онтогенеза большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* // Пробл. криобиологии. – 1998. – № 4. – С. 14–17.
6. Пат. 2112799 РФ, МПК С12N5/02. Способ получения ростовых протеинов из сывороток крови различных видов животных / Г. А. Костина, И. Ф. Радаева, С. Б. Шмелева, М. А. Андреева. – Заявл. 16.02.1996; Оpubл. 10.06.1998.
7. Пат. 2264826 РФ, МПК А61К39/395. Способ получения антитимоцитарного глобулина для внутривенного введения / В. Л. Голубева, Е. В. Титова, Л. И. Новикова, З. К. Бодина, Л. Д. Серова, В. В. Белова. – Заявл. 30.12.2004; Оpubл. 27.11.2005.
8. Скоупс Р. Методы очистки белков: Пер. с англ. – Москва: Мир, 1985. – 358 с.
9. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. – Москва: Наука, 1981. – 288 с.
10. Kost'ál V., Slachta M., Simek P. Cryoprotective role of polyols independent of the increase in supercooling capacity in diapausing adults of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Insecta) // Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol. – 2001. – **130**, No 3. – P. 365–374.
11. Kost'ál V., Zahradnickova H., Simek P., Zeleny J. Multiple component system of sugars and polyols in the overwintering spruce bark beetle, *Ips typographus* // J. Insect. Physiol. – 2007. – **53**, No 6. – P. 580–586.
12. Michaud M. R., Denlinger D. L. Shifts in the carbohydrate, polyol, and amino acid pools during rapid cold-hardening and diapause-associated cold-hardening in flesh flies (*Sarcophaga crassipalpis*): a metabolomic comparison // J. Comp. Physiol. B. – 2007. – **177**, No 7. – P. 753–763.
13. Sun M., Tang X.-T., Lu M.-X., Yan W.-F., Du Y.-Z. Cold tolerance characteristics and overwintering strategy of *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae) // Fla. Entomol. – 2014. – **97**, No 4. – P. 1544–1553.

References

1. D'Amico S., Marx J. C., Gerday C., Feller G. J. Biol. Chem., 2003, **278**, No 10: 7891–7896.
2. Kahlke T., Thorvaldsen S. PLoS ONE, 2012, **7**, No 12: e51761.
3. Franks F. Adv. Prot. Chem., 1995, **46**: 105–139.

4. Jaenicke R., Böhm G. Curr. Opin. Struct. Biol., 1998, **8**, No 6: 738–748.
5. Gulevsky A. K., Ryazantsev V. V., Zinchenko A. V., Relina L. I., Grishchenkova Ye. A. Problems of Cryobiology, 1998, No 4: 14–17 (in Russian).
6. Pat. 2112799 RF, IPC C12N5/02. A method for producing the growth of blood serum proteins of different species, G. A. Kostina, I. F. Radaeva, S. B. Shmeleva, M. A. Andreeva, Publ. 10.06.1998 (in Russian).
7. Pat. 2264826 RF, IPC A61K39/395. A method for producing antithymocyte globulin for administration vnutrivennogo, V. L. Golubeva, E. V. Titova, L. I. Novikova, Z. K. Bodina, L. D. Serova, V. V. Belova, Publ. 27.11.2005 (in Russian).
8. Scopes R. Methods of protein purification, Moscow: Mir, 1985 (in Russian).
9. Osterman L. A. Methods of investigating proteins and nucleic acids: Electrophoresis and ultracentrifugation, Moscow: Nauka, 1981 (in Russian).
10. Kost'ál V., Slachta M., Simek P. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol., 2001, **130**, No 3: 365–374.
11. Kost'ál V., Zahradnickova H., Simek P., Zeleny J. J. Insect. Physiol., 2007, **53**, No 6: 580–586.
12. Michaud M. R., Denlinger D. L. J. Comp. Physiol. B., 2007, **177**, No 7: 753–763.
13. Sun M., Tang X.-T., Lu M.-X., Yan W.-F., Du Y.-Z. Fla. Entomol., 2014, **97**, No 4: 1544–1553.

Поступило в редакцію 16.09.2015

О. К. Гулевський, Д. В. Третьак, Л. І. Реліна, А. Ю. Нікольченко

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

E-mail: tretyak_diana@mail.ua

Ефект холодової аклімації на кріопреципітацію білків *Tenebrio molitor* за наявності дегідратуючого агента поліетиленгліколю

*Досліджено особливості кріопреципітації білків з молекулярною масою від 10 до 200 кДа з личинок *Tenebrio molitor* у розчинах дегідратуючого агента ПЕГ-6000. Показано, що склад кріопреципітованих білків аклімованих і неаклімованих личинок *T. molitor* має кількісні та якісні відмінності. Встановлено, що ПЕГ-6000 осаджує більш ефективно білки з неаклімованих личинок *T. molitor*, ніж білки з аклімованих особин.*

Ключові слова: холодова аклімація, білки, поліетиленгліколь, кріопреципітація, електрофорез.

O. K. Gulevsky, D. V. Tretyak, L. I. Relina, A. Yu. Nikolchenko

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv

E-mail: tretyak_diana@mail.ua

The effect of cold acclimation on the *Tenebrio molitor* protein cryoprecipitation in the presence of a dehydrating agent polyethyleneglycol

*The features of the cryoprecipitation of proteins with the molecular masses from 10 to 200 kDa of *Tenebrio molitor* larvae in solutions of dehydrating agent PEG-6000 are studied. It was shown that compositions of cryoprecipitated proteins from cold-acclimated and non-acclimated larvae *T. molitor* differed quantitatively and qualitatively. It was established that PEG-6000 precipitated the proteins of non-acclimated *T. molitor* more effectively, than the proteins of acclimated individuals.*

Keywords: cold acclimation, proteins, polyethyleneglycol, cryoprecipitation, electrophoresis.