

УДК 639.371.2 : 597-III

ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ КРОВИ АЗОВСКИХ ОСЕТРОВЫХ
ПРИ ИХ ИСКУССТВЕННОМ ВОСПРОИЗВОДСТВЕ

А.С.Чихачев, Ю.Б.Цветненко
(АзНИИРХ)

Зарегулирование Дона и Кубани привело к утрате естественных нерестилищ проходных осетровых в Азовском бассейне. В настоящее время воспроизводство осетра, белуги и севрюги осуществляется на рыбоводных заводах, которые используют не только азовских производителей, но и оплодотворенную икру, завезенную из Каспийского бассейна. Эффективность искусственного воспроизводства во многом зависит от методов диагностики физиологического состояния производителей, жизнестойкости молоди и подбора фонда производителей для сохранения генетической структуры популяций и компенсации вредных последствий интродукции икры из другого бассейна. Благодаря возможности взятия крови с сохранением жизни рыб исследования количественной динамики, фракционного состава и структуры белков крови, выполняющих ряд важных метаболических функций и обеспечивающих поддержание гомеостаза, позволят решить проблему прижизненной диагностики состояния производителей и молоди. Наличие среди белков крови генетически детерминированных полиморфных систем, таких как гемоглобин, трансферрины, альбумины и ряд ферментов, дает возможность использовать их в качестве молекулярных маркеров для выяснения и сохранения генетической структуры популяций.

Материал для исследований собирали с 1974 по 1979 г. в морских рейсах и во время нерестового хода осетровых рыб. Кровь была взята у двух с лишним тысяч осетровых, в том числе у 222 экз. белуги (*Huso huso* L.), у 1000 экз. севрюги (*Acipenser stellatus* L.), у 1150 экз. русского осетра (*Acipenser guldenshtatti* Br.). Для сравнения с каспийскими осетро-

ыми исследовали уральскую севрюгу. Во всех случаях был проведен полный биологический анализ. Кровь брали из жаберных артерий или (прижизненно) из хвостовой вены. Содержание белка определяли рефрактометрически и по методу Лоури. Фракционирование сывороточных белков проводили методом диск-электрофореза в 7,5%-ном, а гемоглобина - в 5,5%-ном полиакриламидном геле (Маурер, 1971). Молекулярный вес определяли гель-фильтрацией на сефадексе G-200. Электрофореграммы окрашивали амидочерным и кумасси-блю, гликопротеиды - иодной кислотой и фуксинсернистым реактивом по Кейзеру, липопротеиды - суданом черным В, гемоглобин - по Орнштейну (Маурер, 1971). Диски денситометрировали на приборе Л.КВ. Железосвязывающую способность сыворотки определяли методом Матсубара (Колб, Камышников, 1976), растворенный гемоглобин в сыворотке - по Дервиз (1969). Гемины выделяли из гемоглобина (Джорджеску, Паунеску, 1963).

Общее содержание белка в сыворотке крови всех осетровых рыб с двухмесячного до полуторогодовалого возраста повышается в три - четыре раза (рис.1), в дальнейшем оно плавно нарастает, колеблясь в пределах 3-6 г% в зависимости от сезона и стадии зрелости рыб. Уровень белка в сыворотке в онтогенезе коррелирует с упитанностью рыб ($r=0,75-0,99$). Кривая сезонной динамики белка имеет U-образный характер (рис.2).

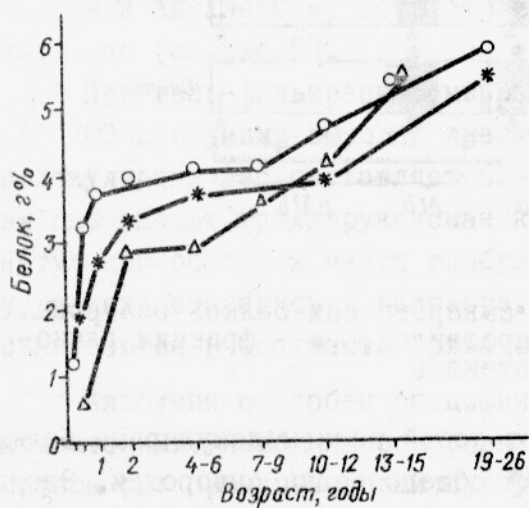


Рис.1. Возрастная динамика общего содержания белка в сыворотке крови: белуги (о), севрюги (Δ) и осетра (*)

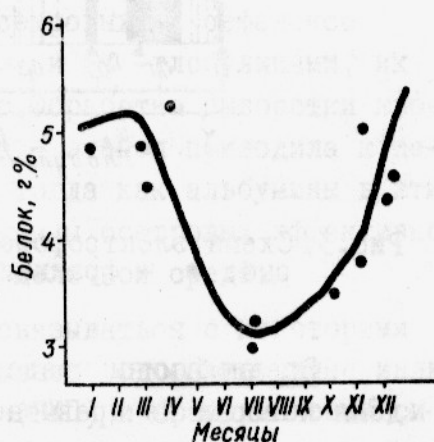


Рис.2. Сезонная динамика концентрации белка в сыворотке крови осетра

Наименьшее содержание сывороточного белка приходится на лето, перед зимовкой уровень белка существенно повышается, уровень трат белка за зимовку зависит от климатических условий. В преднарестовый период при переходе от III к V стадии зрелости половых желез происходит двукратное снижение концентрации сывороточного белка, что связано со значительными пластическими и энергетическими расходами на построение половых продуктов.

Белки сыворотки осетровых весьма гетерогенны, у взрослых особей осетра обнаружено до 19 фракций, у севрюги до 18, у белуги до 16. В зависимости от электрофоретической подвижности белки сыворотки осетровых разделяются на несколько групп: преальбумины, альбумины, α_1 -, β -, α_2 - и γ -глобулины (рис.3). Применение сульфата аммония для их фракционного осаждения малоэффективно, о чем свидетельствуют кривые высаливания, построенные по результатам электрофоретического анализа надосадков и осадков (рис.4). Общее число фракций сывороточных белков в онтогенезе осетровых довольно стабильно, хотя соотношение между отдельными группами белков и их компонентный состав претерпевают существенные изменения (рис.5).

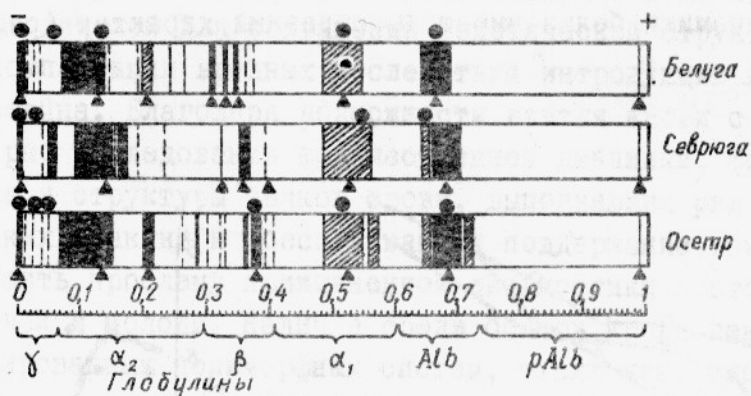


Рис.3. Схема электрофореграмм сывороточных белков осетровых рыб: ● - фракции липопротеидов, ▲ - фракции гликопротеидов

Преальбумины представляют собой низкомолекулярные белки, доля которых не превышает 1-3% общего белка сыворотки. Электрофоретическая подвижность их составляет 1,00-0,72. Белки этой фракции постоянно присутствуют в сыворотке у сеголетков белуги, сеголетков и годовиков осетра и севрюги. У взрослых рыб преальбумины, как правило, выявляются при очень высокой концен-

трации наносимого белка (2 мг/гель), следовательно их содержание у взрослых рыб примерно на порядок ниже, чем у молоди. Исключением является преальбумин подвижностью 0,98, мигрирующий непосредственно за фронтом буфера. Этот белок имеется в сыворотке взрослых рыб. Содержание его может увеличиваться при длительном хранении сыворотки и заболевании рыб. Видимо, в эту фракцию входят продукты деструкции сывороточных белков.

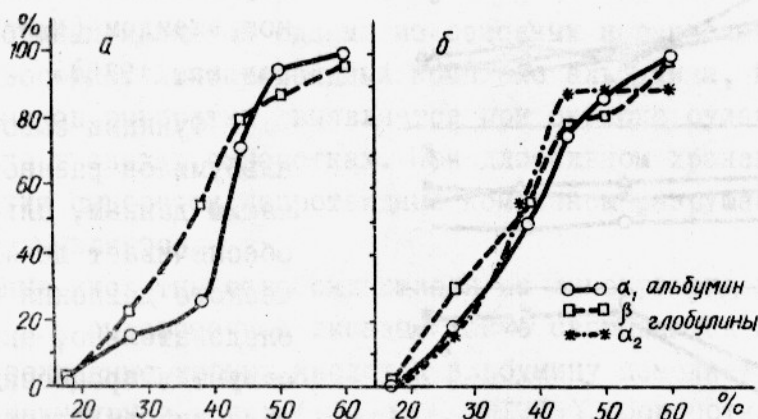


Рис. 4. Действие нейтральной соли на белки сыворотки крови осетра: а - альбумин и общие глобулины; б - фракции глобулинов. По оси ординат - доля белка, выпадающего в осадок; по оси абсцисс - процент насыщения сульфатом аммония

Альбумины составляют у одновозрастных белуги, севрюги и осетра $26 \pm 2\%$, $24 \pm 4\%$ и $19 \pm 2\%$ общего сывороточного белка соответственно. Относительное содержание альбумина резко увеличивается к двухлетнему возрасту и в дальнейшем повышается незначительно (см. рис. 5).

При гель-фильтрации сыворотки осетровых на сефадексе G-200 альбумины выходят вместе с α_1 и β -глобулинами, их молекулярный вес составляет 60-70 тыс. Обработка сыворотки крови рыб смесью трихлоруксусная кислота - этанол приводила к денатурации основной части глобулинов, тогда как альбумины в этих условиях оставались в растворе. Альбумины осетровых эффективно связываются и осаждаются риванолом в щелочной среде.

Альбумин способен специфически связываться с некоторыми красителями. Альбумин осетровых связывает водорастворимые индикаторы pH: бромкрезоловый пурпуровый (БКП) и бромтимоловый синий. С БКП альбумин осетровых образует окрашенный комплекс, максимум поглощения которого 600 нм. Аналогичный окрашенный комплекс с БКП образует и альбумин человека (Pinnell, Northam, 1978).

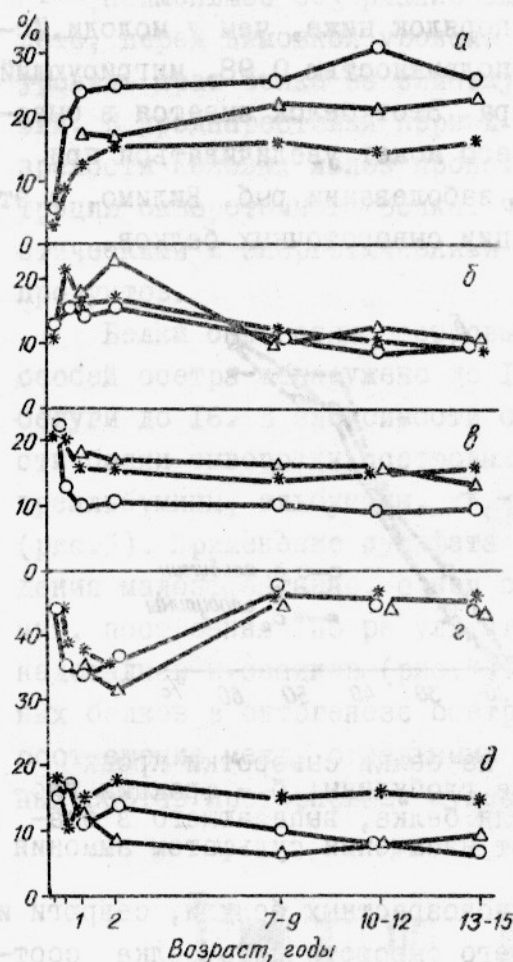


Рис.5. Динамика фракций сывороточных белков крови белуги (○), севрюги (Δ) и осетра (*) в онтогенезе.

а - альбумины; б - α_1 -глобулины; в - β -глобулины; г - α_2 -глобулины; д - γ -глобулины. По оси ординат - относительное содержание белка во фракции

Выявление сывороточных гликопротеидов после электрофореза сыворотки показало, что в альбумине осетровых имеется углеводный компонент. Альбумин карпа также является гликопротеидом (Nakagawa, Kaya, 1978).

Функции сывороточных альбуминов разнообразны. По нашим данным, альбумин обеспечивает до 45% онкотического давления крови и, следовательно, активно участвует в процессах осморегуляции при адаптации к воде различной солености. Так, у осетровой молоди, начиная с двухмесячного возраста, одновременно с увеличением общего белка сыворотки резко повышается относительное содержание альбумина (см. рис.5), что, видимо, связано с адаптивными процессами при скате молоди в море.

Альбумины способны связывать многие вещества, постоянно присутствующие в крови, транспортировать их к местам утилизации и таким образом поддерживать

содержание этих веществ на определенном уровне (Чегер, 1975). Альбумин является основным акцептором гемина - небелкового продукта распада гемоглобина. Изучение комплекса альбумин - гемин в растворе показало, что его образование сопровождается bathochromным сдвигом максимума поглощения с 384 до 390 нм в области Сорэ. При снятии разностного спектра максимум поглощения

комплекса приходился на 410 нм. Связывающих гемоглобин гаптоглобинов в сыворотке осетровых не обнаружено (Лукьяненко, Попов, 1974), поэтому роль альбумина как фактора, препятствующего потерям железосодержащих метаболитов, представляется весьма существенной. Способность связывать гемин была установлена также для альбуминов карпа и человека (Yanagisawa et al., 1978; Hrkal et al., 1978).

Альбумины являются одними из основных переносчиков липидов в сыворотке. Липопротеидный комплекс альбумина, как и других белков сыворотки, выявляется при окраске суданом черным только в свежих сыворотках. При длительном хранении и замораживании сывороток липопротеидные комплексы разрушаются и суданом не выявляются.

Жирные кислоты, освобождающиеся из липопротеидов при действии на них сывороточной липазы, также связываются альбуминами. Присоединение жирных кислот к альбумину изменяет его третичную структуру и заряд (Spector, 1975). Обработка сыворотки обезжиривающей смесью бутанол - эфир (2:3) в течение 30 мин. приводила к значительному снижению подвижности альбуминов и устраняла их гетерогенность. Введение смеси свободных жирных кислот в обезжиренную сыворотку осетра восстанавливало нормальную подвижность альбуминов и их начальную гетерогенность (рис. 6). Наблюдаемая многокомпонентность, по-видимому, связана с различными акцепторными свойствами разных молекул альбумина в отношении жирных кислот. В основе такой функциональной гетерогенности могут лежать генетически закрепленные различия в первичной структуре альбуминовых молекул. Нормализация электрофоретической подвижности обезжиренного альбумина жирными кислотами свидетельствует об их важной роли: находясь в связи с альбумином, жирные кислоты стабилизируют конформацию молекул и их суммарный заряд. Недавно получены данные о функции жирных кислот как аллостерических регуляторов акцепторной способности альбумина человека (Soltys, Hsia, 1978).

Альбумины азовских осетровых представлены разным числом фракций у разных видов: у русского осетра I-3, у белуги I-2, у севрюги I-2. У осетра было обнаружено одиннадцать вариантов альбумина, различающихся числом фракций (А, В и С подвижностью 0,72, 0,70 и 0,68) и количественным соотношением между ними. Денситометрия показала, что у двухкомпонентных альбуминов соотношение фракции составляет I:I, 3:I или I:3, а у трехкомпо-

нентных - 1:2:1, 2:1:1 или 1:1:2. Очевидно, такие соотношения соответствуют трехаллельной системе у тетраплоидного вида - осетра, число хромосом у которого вдвое больше, чем у других видов осетровых (Burtzev et al 1976). Теоретически у осетра должно быть 15 электрофоретических вариантов альбумина. У азовского осетра нами обнаружено одиннадцать наиболее вероятных (рис.7). Генетический анализ частот вариантов альбумина в популяции русского осетра показал хорошее соответствие рассчитанных по Харди-Вайнбергу и фактических данных (табл.1). Результаты генетического анализа частот компонентов альбумина в популяции в сочетании с данными о селективном связывании свободных жирных кислот разными фракциями альбумина подтверждают генетическую природу полиморфизма альбумина русского осетра.

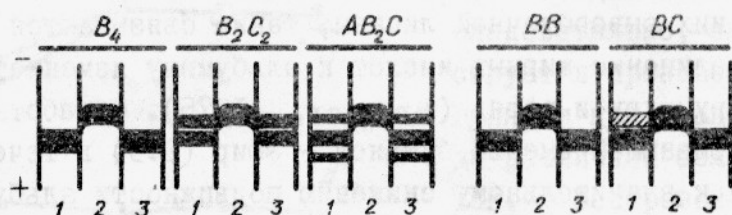


Рис.6. Действие обезжиривающих агентов и экзогенных жирных кислот на электрофоретическую подвижность сывороточного альбумина осетра (B_4 , B_2C_2 , AB_2C) и севрюги (BB , BC):

1 - интактная сыворотка, 2 - сыворотка после обработки смесью бутанол-эфир, 3 - обезжиренная сыворотка после добавления смеси жирных кислот

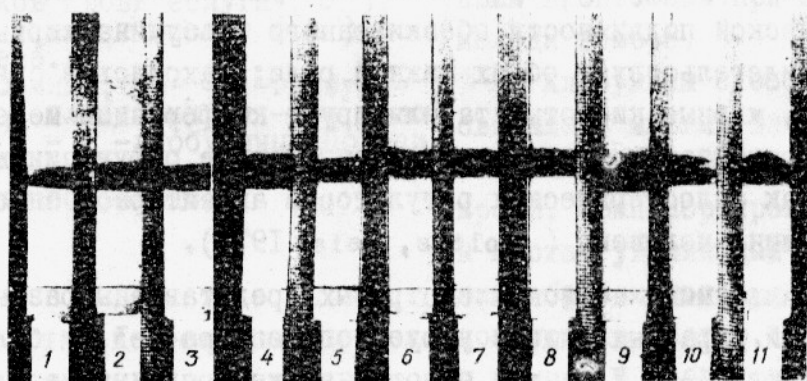


Рис.7. Фенотипы сывороточного альбумина осетра: 1 - A_3B , 2 - A_2B_2 , 3 - AB_3 , 4 - A_2C_2 , 5 - B_4 , 6 - B_3C , 7 - B_2C_2 , 8 - BC_3 , 9 - A_2BC , 10 - AB_2C , 11 - ABC_2

У подавляющего большинства особей азовской белуги альбумин однокомпонентен, обратная картина наблюдается у белуги северокаспийской популяции: рыбы с двойным альбумином составляют 77%. Важно отметить, что бисальбуминемия среди азовских белуг наблюдается в основном у рыб поколения 1973 г., когда каспийская белуга впервые была интродуцирована в Азовское море в массовых количествах.

У азовской и уральской севрюги также обнаружен двухкомпонентный альбумин подвижностью 0,70 и 0,67. Белок в медленной фракции у азовской севрюги составляет 15-30%, а у уральской - около 80% его содержания в быстрой фракции. Оба варианта описаны для каспийской севрюги (Лукьяненко и др., 1975). При обезжиривании сыворотки севрюги с двухкомпонентным альбумином устранение гетерогенности альбумина сопровождалось, как и у осетра, снижением его подвижности. Однако при насыщении обезжиренной сыворотки севрюги жирными кислотами восстанавливалась подвижность только быстрого компонента альбумина (см.рис.6). По-видимому, низкая подвижность второго альбуминового компонента была обусловлена его комплексированием с липидами, а не с жирными кислотами.

Т а б л и ц а I
Частоты фенотипов альбумина в азовской популяции русского осетра
($n = 735$, $\chi^2 = 7,67$)

Фенотип альбу-мина	Ч а с т о т ы	
	фактическая	расчетная
A ₃ B	1	1,4
A ₂ B ₂	18	17,9
AB ₃	91	97,7
A ₂ C ₂	1	0,3
B ₄	463	455,8
A ₂ BC	5	3,1
AB ₂ C	34	27,6
ABC ₂	1	3,5
B ₃ C	97	105,2
B ₂ C ₂	22	20,1
BC ₃	2	1,6

Сравнительный анализ показал, что физико-химические свойства и функции сывороточных альбуминов осетровых рыб и млекопитающих близки, но у осетровых рыб относительное содержание этого белка в три раза ниже, чем у млекопитающих.

Глобулины. Отличительной особенностью сыворотки крови рыб является сравнительно высшее относительное содержание глобулиновой фракции. Поэтому белковый коэффициент (отношение альбумины/глобулины) у рыб всегда

меньше единицы и для осетровых в морской период жизни составляет в среднем 0,31. По абсолютному содержанию глобулинов осетровые близки к млекопитающим. Группа глобулинов крайне гетерогенна как по фракционному составу, так и по функциональной принадлежности входящих в нее белков.

α_1 -глобулины сыворотки осетровых при электрофорезе в полиакриламидном геле мигрируют за альбумином (подвижность 0,58-0,48). В среднем относительное содержание их составляет 8-14%. У белуги, севрюги и 60% особей осетра α_1 -глобулины всегда представлены одной диффузной фракцией. У 40% особей осетра в области α_1 -глобулинов имеется две фракции, из которых медленная более мощная. Относительное содержание этой группы сывороточных белков с возрастом изменяется незначительно (см.рис.5). В состав α_1 -глобулинов входит до 25% сывороточных липопротеидов осетровых.

β -глобулины занимают промежуточное положение, мигрируя при электрофорезе между α_1 - и α_2 -глобулинами подвижностью 0,30-0,48, и составляют 9-18% общего белка сыворотки. Наиболее гетерогенна эта фракция у осетра - в ней насчитывается от двух до девяти компонентов. У белуги β -глобулины представлены тремя-четырьмя, у севрюги - одним-двумя основными компонентами. У севрюги иногда обнаруживаются два-четыре минорных компонента, содержание белка в которых не превышает 1-2%. Специфическая окраска гелей после электрофореза сыворотки показала, что белки β -глобулиновой фракции осетровых относятся к классу гликопротеидов. Известно, что в этой области у млекопитающих и других позвоночных мигрируют трансферрин, церулоплазмин, гаптоглобин, гемопексин, гемоглобин. Попытка выявить церулоплазмин при помощи окраски гелей о-дианизидином по Оуэну (Маурер, 1971) после электрофореза сыворотки была безуспешной. Однако отсутствие этого белка в сыворотке осетровых нуждается в подтверждении другими методами. Использование нитрозо-Р-соли (по прописи Mueller et al., 1962) для выявления железосодержащих белков показало, что в первую очередь окрашиваются компоненты β -глобулинов сыворотки осетровых, но впоследствии прокрашиваются и белки других фракций. Хотя в аналитической химии нитрозо-Р-соль иногда и применяется для обнаружения ионов железа, использование ее для идентификации железосвязывающих белков сыворотки неэффективно вследствие ее малой специфичности. В области β -глобулинов бензи-

диновой реакцией у осетровых выявляются следы гемоглобина. Количественное определение гемоглобина в сыворотке показало, что его концентрация у севрюги составляет $5,43 \pm 0,60$ мг%, а предельные значения колеблются от 0,2 до 10,0 мг%. Такое же количество растворенного в сыворотке гемоглобина обнаруживается и у человека (Тодоров, 1960).

Железосвязывающую способность β -глобулинов осетровых мы изучали на примере белков севрюги. Для выделения β -глобулинов сыворотку без следов гемолиза обрабатывали риванолом для осаждения альбумина, подвергали гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-200 для освобождения от других глобулинов и проводили препаративный диск-электрофорез для получения белка без примесей. Чистоту полученных образцов контролировали аналитическим диск-электрофорезом. Небелковые примеси из раствора чистого белка устраняли диализом против деминерализованной воды. Спектрофотометрические исследования показали, что выделенный белок связывает ионы трехвалентного железа и образует комплекс с максимумом поглощения при 411 нм. Это позволило идентифицировать его как трансферрин. При близких значениях длины волны максимальное поглощение отмечено и для трансферрина миксины, лягушки и черепахи, максимум поглощения трансферрина человека и кролика обнаружен при 465 нм (Palmer, Sutton, 1971). Раствор насыщенного железом трансферрина севрюги подвергали кислотному титрованию, при этом количественные изменения комплекса белок - железо регистрировали на спектрофотометре при 411 нм. Результаты показали, что направленное изменение pH среды в кислую область сопровождается диссоциацией комплекса, которая начинается при pH 8,5 и заканчивается при pH 3,5 (рис.8). Кривая диссоциации имеет сигмоидную форму с точкой перегиба при pH 6,8. Двуступенчатый характер диссоциации комплекса на апотрансферрин и железо позволяет предполагать наличие в молекуле изученного белка двух железосвязывающих центров. Аналогичные кривые спектрофотометрического титрования были получены для трансферрина крупного рогатого скота (Сапелкин, 1975). Определение железосвязывающей способности сыворотки и уровня связанного железа в ней позволило установить, что трансферрин *in vivo* насыщен железом только на 12%.

В азовской популяции севрюги в морской период жизни обнаружено пять вариантов трансферрина. Подвижность трансферриновых компонентов a, b, c составляет соответственно 0,40,

0,36, 0,32. Денситометрически показано, что гомозиготные варианты трансферрина Tf^{bb} и Tf^{cc} содержат вдвое больше белка, чем каждая из фракций гетерозиготных вариантов Tf^{bc} , Tf^{ab} и Tf^{ac} .

Соответствие эмпирических частот вариантов трансферрина расчетным подтверждает гипотезу о трехаллельной системе кодирования локуса трансферрина севрюги (табл.2).

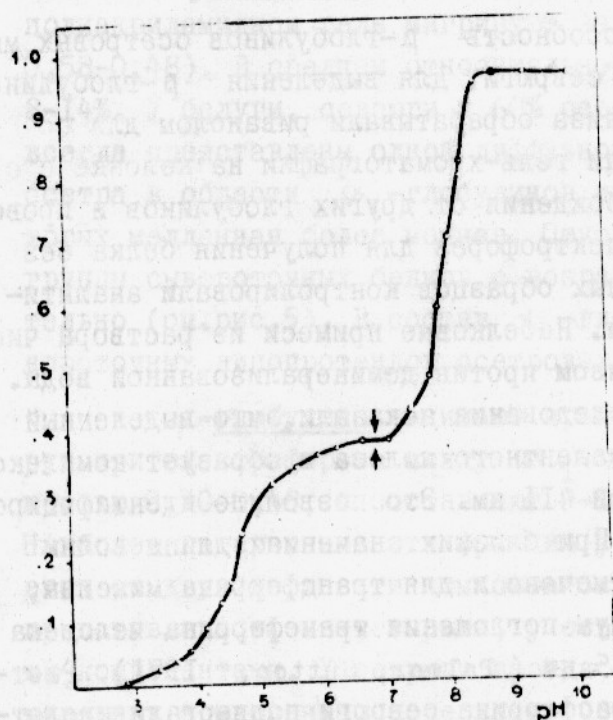


Рис.8. Кривая спектрофотометрического титрования комплекса трансферрин-железо при изменении pH

α_2 -глобулины сыворотки осетровых составляют около половины всех белков - 44-53%. Подвижность α_2 -глобулинов лежит в пределах 0,29-0,08. В состав этой фракции входит мощный компонент, на долю которого приходится до 35% общего количества сывороточных белков, так называемый α_2 -макроглобулин. В области этого белка подвижностью 0,11 локализован желтый пигмент, обуславливающий цвет сыворотки осетра. В видимой области пигмент имеет максимум

поглощения при 436 нм. Обработка выделенного гель-хроматографией пигментного белка мочевиной 8 М приводила к отщеплению хромофора, что доказывает участие водородных связей в образовании его комплекса с белком. Отсутствие пика поглощения в области 260-280 нм свидетельствует об отсутствии циклических структур в составе хромофора. Второй, более слабый, желтый пигмент сыворотки осетра имеет подвижность 0,06. При гель-хроматографии сыворотки осетра обнаружено, что в состав α_2 -макроглобулина входит около четырех белков с молекулярным весом от 500 до 300 тыс., часть которых, по-видимому, относится к γ -глобулинам. Молекулярный вес желтого пигмента с подвижностью 0,11 составил около 470 тыс., а с подвижностью 0,06 - около 500 тыс.

Т а б л и ц а 2

Частоты фенотипов и аллелей трансферрина в азовской популяции севрюги ($n = 188$, $\chi^2 = 0,85$)

Показатели	Ч а с т о т ы	
	фактическая	расчетная
Фенотипы		
aa	0	0,02
bb	141	141,3
cc	2	2,8
ab	3	3,5
bc	41	39,9
ac	1	0,5
Аллели		
A _a	0,011	
a _b	0,867	
r _c	0,122	

γ -глобулины у осетровых составляют 5-11% общего белка сыворотки. К ним относятся белки, мигрирующие за α_2 -макроглобулином, с подвижностью 0,00-0,08. У севрюги в отличие от осетра γ -глобулины при гель-хроматографии хорошо отделяются от α_2 -макроглобулина. Некоторые γ -глобулины являются липо- или гликопротеидами. Высокий молекулярный вес этих белков и значительная гетерогенность затрудняют возможность их

анализа. Часть γ -глобулинов, вероятно, мигрирует в области α_2 -глобулинов, поэтому приведенное их процентное содержание неточно. У севрюги в области γ -глобулинов имеется фракция подвижностью 0,07, мощность которой возрастает у самок при созревании, достигая максимума на IV стадии, и резко снижается на V стадии зрелости половых продуктов (рис. 9). Количественное определение белка в этой фракции может быть использовано для прижизненного определения стадии зрелости у самок севрюги при заводском воспроизводстве осетровых.

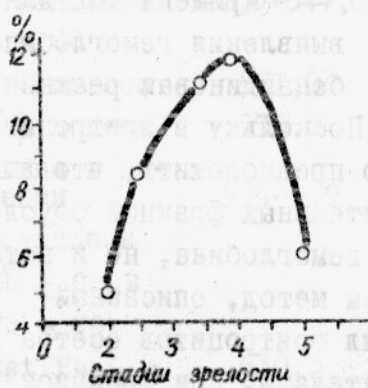


Рис. 9. Количественная динамика белка с подвижностью 0,07 (половой фракции) при созревании самок севрюги

Гемоглобин. По своим гематологическим показателям осетровые резко выделяются среди других рыб. По концентрации гемоглобина в эритроците и уровню гематокрита они не уступают млекопитающим, а кислородная емкость крови, содержание гемоглобина в крови и общая оснащенность организма гемоглобином в два раза выше средних для рыб значений (Коржув, 1963). У осетровых резкое повышение уровня

гемоглобина крови к двухлетнему возрасту (до 6-7 г%) сменяется плавным нарастанием (до 9-10 г%) к 15-17 годам.

Спектральные свойства гемоглобина изучали на примере осетра. Характерные спектры поглощения всех гемоглобинов обусловлены присутствием в них гема; окси- и карбоксигемоглобин позвоночных имеют две основные полосы поглощения: α -полосу в желтой и β -полосу в зеленой части спектра. Гемоглобин осетра имеет абсорбционный спектр, не выделяющий его среди других позвоночных (рис.10, табл.3).

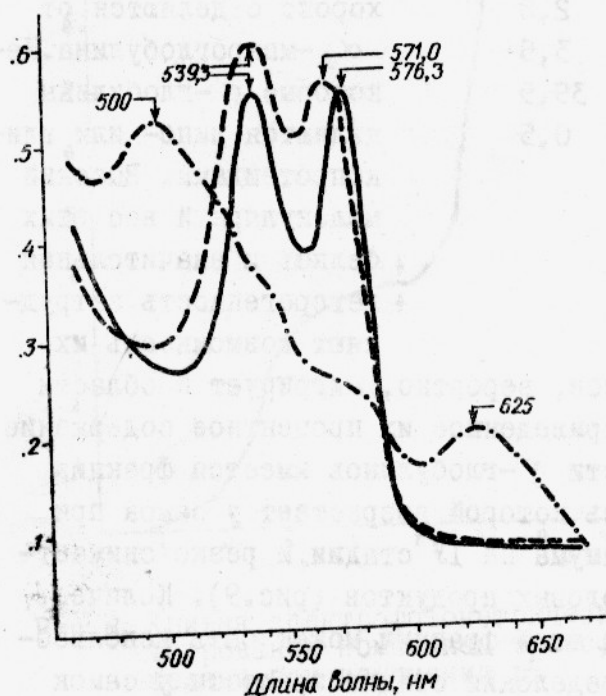


Рис.10. Абсорбционные кривые окси- (—), карбокси (---) и метгемоглобина (-.-) осетра

Гетерогенность гемоглобина у азовских осетровых вначале была обнаружена при электрофорезе на бумаге (Голованенко, 1964), а затем у каспийских осетровых методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле (Гераскин, Лукьяненко, 1972). При исследовании гемоглобина белуги, севрюги и русского осетра из Азовского моря существенных отличий от гемоглобина каспийских осетровых не обнаружено.

Применяемая для выявления гемоглобина бензидиновая реакция

специфична для гемсодержащих белков. Поскольку в эритроцитах имеется гемсодержащая каталаза, можно предположить, что выявляемая гетерогенность бензидин-положительных фракций обусловлена наличием в гемолизате не только гемоглобина, но и каталазы. Используя для выделения каталазы метод, описанный С.Е.Манойловым и др. (1961), из 400 мл эритроцитов осетра нам удалось выделить препарат аморфной каталазы. При фракционировании каталазы обнаружена ее двухкомпонентность. Низкая электрофоретическая подвижность этих компонентов в 5,5%-ном геле, составившая 0,05 и 0,10, по-видимому, обусловлена высоким мо-

лекулярным весом, характерным для каталазы. Показано, что концентрация каталазы в эритроцитах значительно ниже порога чувствительности бензидинового метода. При спонтанном окислении гемоглобина в гемолизате образуется примесь метгемоглобина, однако нами было показано, что метгемоглобины, полученные окислением гемоглобина железосинеродистым калием, имеют ту же подвижность и каких-либо артефактов приносить не могут. Известно также, что тетрамеры гемоглобинов в растворе находятся в динамическом равновесии со своими димерами. Такая гетерогенность в принципе должна выявляться электрофоретически. Однако константа диссоциации гемоглобинов $K_{4,2}$ чрезвычайно низка и составляет для лигандированного гемоглобина $рыб\ 2 \cdot 10^{-8}\ M$ (Edelstein et al., 1976), т.е. диссоциация тетрамеров гемоглобинов $рыб$ лежит за порогом чувствительности электрофоретического метода и дополнительной гетерогенности создавать не может. Следовательно, обнаруженная многокомпонентность гемоглобина осетровых отражает молекулярную гетерогенность гемоглобина в эритроцитах $рыб$.

Т а б л и ц а 3

Максимумы поглощения разных форм гемоглобина осетра и других позвоночных (в нм)

Показатели	Позвоночные (Проссер, 1977)	Осетр (наши данные)
$Hb - O_2$		
α -полоса	576,4-576,9	576,3
β -полоса	540,0-544,0	539,3
$Hb - CO$		
α -полоса	571,0	571,0
β -полоса	535,0	539,3
Разница в положении	5,4-5,9	5,3
α -полосы		
$Hb - O_2$ и		
$Hb - CO$		
Met Hb	630,5	625,5

При изучении фракционного состава гемоглобина азовских осетра и белуги обнаружен его полиморфизм. У осетра выявлено пять фенотипов гемоглобина, различающихся числом умеренно движущихся компонентов и относительным содержанием в них белка (рис.II). Фенотипы гемоглобина одинаково часто встречались в морской и речной периоды жизни осетра; Hb , Hb_2 , Hb_3 , Hb_4 и Hb_5 были зарегистрированы соответственно в 75, 14, 8, 1 и 2% случаев. Фенотипы гемоглобина белуги отлича-

ются числом умеренно движущихся компонентов и наличием или отсутствием медленных (см.рис.II). В азовской популяции белуги

Нб₁, Нб₂ и Нб₃ встречаются соответственно у 51, 42 и 7% особей. У азовской севрюги гемоглобин мономорфен и по фракционному составу соответствует гемоглобину каспийской севрюги.

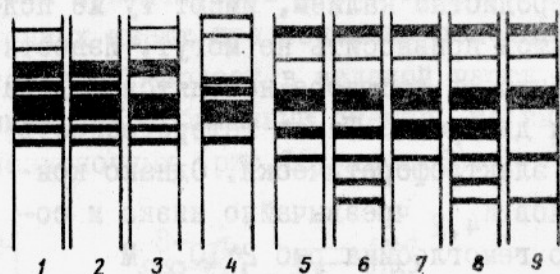


Рис. II. Фракционный состав гемоглобина белуги: (1 - Нб₁, 2 - Нб₂, 3 - Нб₃), севрюги (4) и осетра (5 - Нб₁, 6 - Нб₂, 7 - Нб₃, 8 - Нб₄, 9 - Нб₅)

Выводы

1. Характеристика различных фракций белков крови может быть использована для прижизненной диагностики физиологического состояния производителей и молоди осетровых при их искусственном воспроизводстве.

2. Фракционный состав сывороточных белков у осетровых рыб полностью формируется на втором году жизни и в дальнейшем остается достаточно стабильным.

3. Содержание белка в сыворотке имеет сезонную динамику и связано с процессами гаметогенеза. В области гамма-глобулинов у самок севрюги обнаружен белок, содержание которого меняется по мере созревания, что может служить прижизненным индикатором стадий зрелости.

4. Альбумины осетровых являются гликопротеидами с молекулярным весом 60-70 тыс., транспортирующими жирные кислоты, липиды и гемин. Альбумины русского осетра кодируются тремя аллелями.

5. Бетта-глобулины также являются гликопротеидами; они в основном представлены трансферринами, которые транспортируют ионы железа в клетки. Эти белки имеют два центра связывания и в норме насыщены железом на 12%. Трансферрины севрюги кодируются тремя аллелями.

6. Желтый пигмент в сыворотке осетра молекулярным весом 500 тыс. имеет хромофор нециклической структуры, присоединенный к белку водородными связями.

7. Гемоглобин осетровых по спектральным характеристикам не отличается от гемоглобинов других позвоночных. У осетра и белуги этот белок полиморфен, у севрюги мономорфен.

8. Изученные полиморфные белки перспективно использовать в качестве молекулярных маркеров для контроля за состоянием популяций и сохранения их генетической структуры при искусственном воспроизводстве.

Л и т е р а т у р а

Гераскин П.П., Лукьяненко В.И. Видоспецифичность фракционного состава гемоглобина крови осетровых рыб. - Журнал общей биологии, 1972, т.33, с.478-483.

Голованенко Л.Ф. Типы гемоглобина в онтогенезе осетра (*Acipenser guldenstaadti* (Brandt)). Известия ГосНИОРХ, 1964, т.58, с.128-131.

Дервиз Г.В. Методы изучения обмена хромопротеидов. - Биохимические методы исследования в клинике. М., "Медицина", 1969, с.342-388.

Джорджеску И., Пэунеску Д. Биохимические методы диагноза и исследования. Бухарест, 1963, 499 с.

Колб В.Г., Камышников Клиническая биохимия. Минск, "Белорусь", 1976, 311 с.

Коржув П.А. Эколого-физиологические особенности крови осетровых. - Вопросы ихтиологии, 1963, т.3, с.152-159.

Лукьяненко В.И., Попов А.В. Гаптоглобины рыб. - Физиология и биохимия низших позвоночных. Л., "Наука", 1974, с.3-8.

Лукьяненко В.И. и др. Внутривидовая изменчивость фракционного состава сывороточных белков севрюги. - Журнал эволюц.биохимии и физиологии, 1975, т.11, с.191-193. Авт.: Лукьяненко В.И., Попов А.В., Мишин Э.А., Суриаль А.И.

Манойлов С.Е. и др. Выделение из эритроцитов лошади кристаллической каталазы и изучение ее некоторых физико-химических свойств. - Биохимия, 1961, т.26, с.408-411. Авт.: Манойлов С.Е., Чамин Н.Н., Добрынина Т.И., Воскобойников Г.В.

Маурер Г. диск-электрофорез. М., "Наука", 1971,

- Проссер Л. Дыхательные функции крови. - Сравнительная физиология животных, 1977, т. II, с. 5-83.
- Сапелкин П.А. Структурные свойства трансферрина крови животных. - Соорник научных трудов Московский ветеринарной академии, 1975, т. 80, с. II7-II9.
- Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. София, 1960, 605 с.
- Чегер С.И. Транспортная функция сывороточного альбумина. Бухарест, 1975, 183 с.
- Burtzev, I.A., Nikoljukin N.I., Serbyakova E.V. - Karyology of the Acipenseridae family in relation to the hybridization and taxonomy problems. - Ichthyologia. 1976, 8, p.27-34.
- Edelestein, S.I., McEwen B., Gibson Q.H. - Subunit dissociation in fish hemoglobins. - J.Biol. Chem. 1976, 251, p.7632-7637.
- Hrkal, Z., Kodicek, M., Vodorazka Z. et al., Haeme binding to human serum albumin and to the three large cyanogen bromide albumin fragments. - Int.J.Biochem., 1978, 9, p.349-355.
- Mueller, I., Smithies O., Irwin M. - Transferrin variation in Columbidae. - Genetics 1962, 47, p.1385-1392.
- Nakagawa, H., Kayama, M. - Biochemical studies on carp plasma protein II, Amino acid composition of an albumin. - Soc.Sci.Fish. 1978, 44, p.259-262.
- Pallaoar, R.M., Sutton H.E. - Vertebrate transferrins: molecular weights, chemical compositions, and iron-binding studies. - Biochem. 1971, 10, p.4026-4032.
- Pinnell, A.E., Northam B.E. - New automated dye-binding method for serum albumin determination with bromocresol purple. - Clin. Chem. 1978, 24, p.80-86.
- Soltys, B.J., Hsia C.J. - Human serum albumin. I. On the relationship of fatty acid and bilirubin binding sites and the nature of fatty acid allosteric effects - a mono-anionic spin label study. J. Biol.Chem., 1978, 253, p.3023-3028.
- Specto, A.A. - Fatty acid binding to plasma albumin. - J.Lipid Res., 1975, 16, p.165-179.

Y a n a g i s a w a, T., H a s h i m o t o K., M a t s u u r a
F. - Methemalbumin-forming and hematin-binding abilities
of carp plasma albumins. - Nippon suisan gakkaiishi. Bull.
Jap.Soc.Sci.Fish, 1978, 44, p.373-378.

Investigation of blood proteins of Azov sturgeon
at artificial reproduction

Chikhachev A.S., Tsvetnenko Ju.B.

S u m m a r y

The characteristics of blood proteins of sturgeon can be used for diagnosing the physiological state of spawners and young fish as well as for retaining the genetical structure of the sturgeon populations at artificial reproduction. The fractional composition of serum proteins formed in the second year of life and that of hemoglobin formed in the second month are rather stable. The total content of protein in the serum fluctuates seasonally and is associated with gametogenetical processes. The content of protein in gamma-globulins of females of stellate sturgeon varies with the extent of maturation, which may serve as a lifetime indication of maturity stages. The distribution of proteins among various fractions allows for diagnosing the physiological state of spawners and young sturgeon. Albumins of sturgeon are glycoproteins which bind actively fatty acids, lipids, haemin and some dying substances. A total of II phenotypes of albumin coded by the three - allelic system is found in sturgeon. Transferrins are also glycoproteins transporting ferrum into cells. They have two centres of binding and are saturated with ferrum by 12%. Transferrins of stellate sturgeon are coded with three alleles. The yellow pigment of the serum of sturgeon with the molecular weight of about 500 000 includes a non-cyclic chromophorical part which is added to protein by hydrogen bonds. The spectral characteristics of hemoglobin of sturgeon are similar to those of other vertebrates. Polymorphous hemoglobin is found in sturgeon and giant sturgeon, whereas monomorphous hemoglobin is characteristic for stellate sturgeon.