Доклады Академии наук СССР
1955. Том 101, № 3

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР Н. М. СИСАКЯН и М. К. ВЕЙНОВА

О ПРИРОДЕ БЕЛКОВ ПОЛОСТНОЙ ЖИДКОСТИ КУКОЛОК ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА (BOMBYX MORI)

Метаморфоз куколки тутового шелкопряда, протекающий в довольно короткие промежутки времени, связан с глубокой и интенсивной перестройкой тканевых белков. Быстрота превращений делает этот объект очень удобным для изучения процессов белкового обмена. В литературе имеются лишь данные о суммарном содержании белков, но нет достаточно полных исследований по изменению количественного и качественного состава отдельных белковых систем куколки тутового шелкопряда в различные периоды ее развития. Имеются лишь работы С. Я. Демяновского по изучению белков гемолимфы гусениц дубового шелкопряда в течение пятого возраста, когда идет синтез больших количеств шелка. Методом фракционирования Na_2SO_4 было установлено, что белковая система гемолимфы в этот период состоит из альбуминов, γ-глобулинов и большого количества α- и β-глобулинов. Изменения физико-химических свойств белков гемолимфы куколки дикого шелкопряда (Attacus cyntina) в период метаморфоза были изучены Дрилон и Флоренс ([2]), которые показали, что белки гемолимфы в период гистолиза имеют одну изоэлектрическую точку в области pH 6,6, а в конце развития куколки — две изоэлектрические точки: при pH 6 и 9. Недавно Дрилон ([3]) методом электрофореза на бумаге было установлено, что белки гемолимфы куколки тутового шелкопряда имеют 2 компонента, которые близки по подвижности к альбуминам и эвглобулинам.

Таблица 1

Электрофоретическая подвижность белков центрифугата полостной жидкости и их относительное процентное содержание ($E = 4$ в/см)

Дни метаморфоза, начиная с закуколивания	Подвижность $u \cdot 10^{-5}$ см^2 × × в$^{-1}$ · сек$^{-1}$		Содерж. компонентов в %	
	I	II	I	II
9	0,9	4,7	91,2	8,8
15	0,3	5,0	81,4	18,6

Задача нашего исследования состояла в выяснении природы белков полостной жидкости тутового шелкопряда и учета их количественных изменений в процессе развития. Эта задача осуществлялась при помощи электрофоретического анализа в аппарате Тизелиуса и фракционирования метиловым спиртом по методу Дюбера ([4]), разработанному для разделения белков сыворотки крови.

Полостная жидкость, полученная при легком раздавливании куколок через тройной слой марли в ступке на холоду, центрифугировалась в течение 30 мин. при 1600 *g*. Исследованию подвергался центрифугат и осадок, в состав которого входят структурные элементы полостной жидкости. Электрофоретически показано, что белковая система центрифугата полостной жидкости (при концентрации белков 0,7—1%) в вероналовом буфере pH 8,6, ионной силы 0,1, в разные периоды развития двухкомпонентна. Полученные данные представлены в табл. 1 и на рис. 1, *I*. Судя по подвижности, можно полагать, что первый компонент относится к альбуминам, а второй — к глобулинам.

Обработка белков центрифугата полостной жидкости 10-кратным объемом ацетона и последующее высушивание в вакуум-эксикаторе приводят к тому, что белки, извлеченные из 100 мг осадка и исследованные электрофоретически в вероналовом буфере pH 8,6, ионной силы 0,1, имели электрофореграмму (рис. 1, *II*) с пятью пиками (подвижность для *I* — 4,40; *II* — 3,0; *III* — 2,2; *IV* — 1,9; *V* — $0{,}6 \cdot 10^{-5}$ $см^2/в^{-1} \cdot сек^{-1}$).

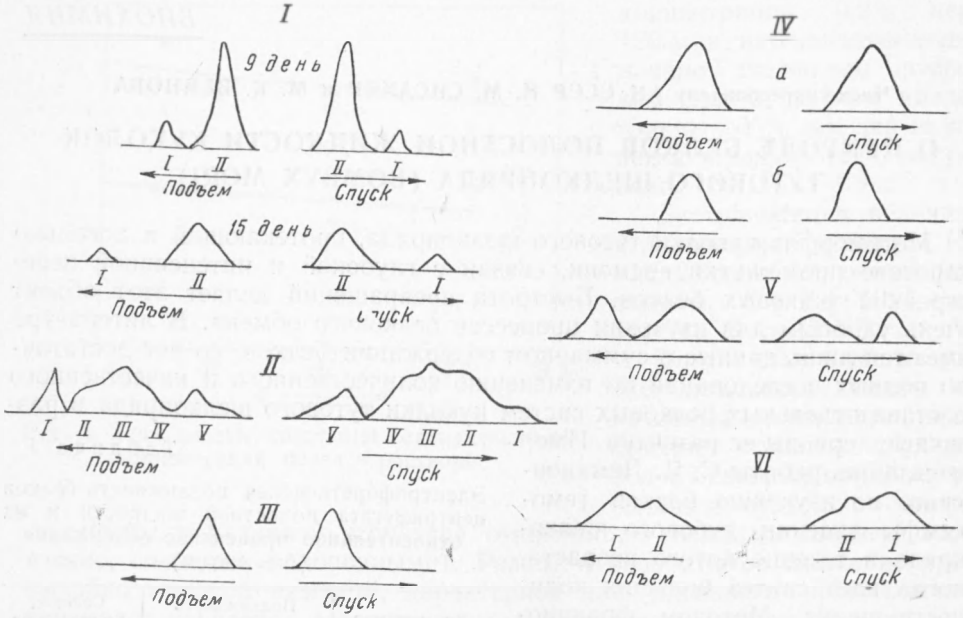


Рис. 1. Электрофоретические кривые *I* — белков центрифугата полостной жидкости, *II* — белков центрифугата полостной жидкости, обработанной ацетоном, *III* — α- и β-глобулинов центрифугата, *IV* — γ-глобулинов центрифугата, *V* — альбуминов центрифугата, *VI* — белков осадка полостной жидкости, обработанного ацетоном. Вероналовый буфер 8,6 pH (за исключением *IV б*, для которого pH буфера 4,66); $\mu = 0{,}1$, $E = 4$ в/см

Для выяснения количественных изменений белков полостной жидкости в процессе развития куколки проводилось фракционирование метиловым спиртом: к 2 мл центрифугата полостной жидкости прибавляли 1 мл буфера pH 8,0 (составленного из 10 мл 1 *M* $NaHCO_3$, 10 мл 1 *M* CH_3COOH и 250 мл дестиллированной воды), а затем 7 мл 30 % метилового спирта, охлажденного до —3°. Смесь выдерживалась при 0° в течение 30 мин. Образовавшийся осадок γ-глобулинов отделялся центрифугированием при охлаждении. Подкисление полученного после центрифугирования раствора 0,2 мл 1 *M* CH_3COOH до pH 5,5—6 приводит к выпадению α- и β-глобулинов, которые выделялись так же, как γ-глобулины. В растворе оставались альбумины, как показали электрофоретические исследования, с некоторой примесью α- и β-глобулинов. Полученные белковые фракции очищались диализом и количественно учитывались по микрокьельдалю (γ-глобулины предварительно растворялись в 8% NaCl). Полученные результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2

Изменение содержания белковых фракций центрифугата полостной жидкости в разные периоды развития куколки (в мг белка на 2 мл центрифугата полостной жидкости)

Дни метаморфоза, начиная с закуколивания	Альбумины	α- и β-глобулины	γ-глобулины
5	39,87	28,65	37,00
9	119,78	36,85	79,00
15	58,50	17,50	21,87

Из табл. 2 видно, что белковая система полостной жидкости (центрифугата) по мере развития куколки претерпевает большие изменения. Так, во время гистолиза, разрушения личиночных органов (9 день) количество белковых фракций увеличивается: альбуминов в 3 раза, γ-, α- и β-глобулинов в 1,5—2 раза. В период интенсивного гистогенеза, т. е. к концу развития куколки, перед вылетом бабочки, содержание белков в полостной жидкости резко падает за счет использования их при построении тканей и органов взрослого насекомого: количество альбуминов, α- и β-глобулинов при этом падает вдвое, а γ-глобулинов — приблизительно втрое. Суммарное содержание глобулинов, за исключением последнего опыта, больше, чем альбуминов. Для проверки полноты разделения белков этим методом было проведено электрофоретическое исследование полученных фракций. Оказалось, что α- и β-глобулины (рис. 1, *III*) при pH 8,6 и γ-глобулины (рис. 1, *IV*) при pH 8,6 и 4,66 однокомпонентны. Альбумины при pH 8,6 имели электрофоретическую кривую (рис. 1, *V*) с двумя пиками, что говорит о наличии примесей, повидимому α- и β-глобулинов.

Таблица 3

Изменение водно- и солерастворимых белков структурных элементов полостной жидкости по мере развития куколки

Дни метаморфоза, начиная с закуколивания	Вес сырого осадка в г	Вес фракций в мг белка		Пересчет колич. фракций на 1 г осадка	
		водная	солевая	водная	солевая
3	2,520	307,5	569,4	122,0	255,9
8	3,980	752,5	456,4	189,0	119,8
12	1,780	647,2	165,2	363,6	92,8

Проводились исследования изменений белков, входящих в состав тех структурных элементов полостной жидкости, которые выпадают в осадок при центрифугировании. Осадок, полученный после центрифугирования полостной жидкости из 50 куколок, взвешивался и подвергался трехкратной экстракции равными объемами сначала дестиллированной водой, а затем 8% раствором NaCl. Белковые растворы, очищенные диализом, количественно определялись по микрокьельдалю (табл. 3).

Из данных табл. 3 можно заключить, что в момент гистолиза (8 день) общий вес осадка увеличивается в 1,5 раза, при этом в нем возрастает количество водорастворимых и уменьшается количество солерастворимых белков. В конце развития куколки (12 день) уменьшается как общее количество осадка (в 2,3 раза), так и содержание водно-и солерастворимых белковых фракций. При пересчете полученных данных на 1 г осадка содержание белков в водном растворе будет по мере развития куколки увеличиваться, а в солевом растворе уменьшаться.

Экстракция белков из 100 мг осадка, высушенного ацетоном, и их электрофоретический анализ проводились в вероналовом буфере pH 8,6, ионной силы 0,1. Исследование показало наличие двух компонентов с подвижностью для *I* — 1,9 и для *II* — $0{,}5 \cdot 10^{-5}$ $см^2/в^{-1}$ $сек^{-1}$ (рис. 1, *VI*). По характеру подвижностей можно считать, что в осадке содержатся, главным образом, глобулины.

Таким образом, фракционирование метиловым спиртом дало возможность установить, что белковая система центрифугата полостной жидкости состоит из трех фракций: I — γ-глобулинов; II — α- и β-глобулинов и III — альбуминов, количество которых в процессе метаморфоза подвергается существенным изменениям: в период интенсивного гистолиза содержание этих компонентов увеличивается, а в фазе гистогенеза уменьшается. При помощи электрофореза удалось получить разделение белков только на два компонента. Установлено, что изменениям подвергаются не только белки центрифугата полостной жидкости, но и белки тех структурных элементов, которые легко переходят в осадок при центрифугировании в течение 30 мин. при 1600 *g*.

Авторы пользуются возможностью выразить глубокую благодарность директору Украинской шелководческой станции в г. Мерефа И. П. Марченко и заведующему отделом тутового шелкопряда П. М. Мамон за предоставление опытного материала.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
14 I 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] С. Я. Демяновский, Ю. Б. Филиппович, Биохимия, **15**, в. 5 (1950). [2] A. Drilhon, G. Florence, Bull. Soc. Chim. Biol., **28**, No. 1—3 (1946). [3] A. Drilhon, C. R., **238**, № 25, 2452 (1954). [4] J. M. Dubert, P. Slizewicz, P. Rebeyrotte, M. Macheboeuf, Ann. Inst. Pasteur, **84**, No. 2, 370 (1953).