

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ГЕМОЦИАНИНА ИЗ ГЕМОЛИМФЫ КАМЧАТСКОГО КРАБА *PARALITHODES CAMTSCHATICUS* БАРЕНЦЕВОМОРСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ В ТЕЧЕНИЕ ЛИНОЧНОГО ЦИКЛА

С.И. Моисеев*, С.А. Моисеева**

* - Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО), г. Москва, ** - Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино

EXAMINATION OF STRUCTURAL PECULIARITIES OF HAEMOLYMPH OF KING CRAB *PARALITHODES CAMTSCHATICUS* FROM THE BARENTS SEA DURING MOLTING CYCLE

Важным показателем при регулировании промысла крабов является их линочное состояние. Определение стадий линочного цикла крабов производится визуально по особенностям внешних покровов животных и потому грешит субъективностью, как и любое определение, основанное на визуальных признаках. При этом значительную долю особей, как правило, трудно отнести к той или иной стадии на основании только внешних характеристик. Особенно динамичны признаки третьей, самой продолжительной, стадии линочного цикла. Поэтому было бы целесообразно выбрать ряд биохимических параметров, закономерно изменяющихся в течение линочного цикла. Определение таких параметров в сочетании с общепринятыми методиками позволило бы исследователю давать более точную оценку линочного состояния крабов.

В качестве объекта для исследования нами был выбран гемоцианин – внеклеточный медьсодержащий белок, выполняющий у ракообразных функцию переносчика кислорода [van Holde, Miller, 1995]. Гемоцианин является очень пластичным белком. Его концентрация в гемолимфе (крови) ракообразных, а также структура и функциональные свойства молекулы быстро изменяются в зависимости от условий существования организмов, таких как обеспеченность пищей, состояние экологии, стресс, вызываемый промыслом [Dumler, Terwilliger, 1996; Engel et al., 2001; Mattiello et al., 2004]. Поэтому гемоцианин может служить детектором биологического состояния популяции определенного вида в данный момент времени.

Нативные гемоцианины ракообразных являются мультимерными белками, состоящими из нескольких полипептидных цепей – структурных субъединиц. Субъединицы гемоцианинов отличаются как по аминокислотному составу, так и по молекулярной массе [Markl et al., 1979]. Это особенность, называемая феноменом гетерогенности гемоцианинов ракообразных на субъединичном уровне, играет роль в модуляции кислород связывающих свойств молекулы. У некоторых ракообразных, как было показано, субъединичный состав гемоцианина варьирует в зависимости от сезона, уровня кислорода в среде, солености воды [Bellelli et al., 1988; Mangum, Rainer, 1988; Mangum, 1994], при этом изменяется способность гемоцианина переносить кислород. Данные изменения носят приспособительный характер, позволяя гемоцианину эффективнее связывать и транспортировать кислород в различных условиях внешней среды, что необходимо для быстрой адаптации организма. Хотя феномен гетерогенности субъединиц гемоцианина у ракообразных интенсивно изучался и изучается, в литературе не описано достоверных отличий в субъединичном составе молекулы в зависимости от стадии линочного цикла.

Задача данного исследования состояла в том, чтобы изучить изменения структуры гемоцианина камчатского краба баренцевоморской популяции в течение линочного цикла.

В период с конца октября по декабрь 2004 г. в районе Варангер-фьорда было собрано 120 образцов гемолимфы самцов камчатского краба промыслового размера, находящихся на разных стадиях линочного цикла. Определение линочных стадий проводили по шкале I-IV. Линочную стадию III подразделяли на три подстадии (0; 1; 2) [Моисеев, 2003]. Гемолимфу у крабов отбирали с помощью стерильного шприца из сердца. Полученные образцы замораживались и хранились при -20°C. Перед использованием образцы размораживались и центрифугировались при 10,000 g в течение 10 мин при 4°C. В полученном супернатанте основную массу белка составлял гемоцианин (>95%). Концентрация гемоцианина определялась спектрофотометрически по поглощению диссоциированных субъединиц на полосе 338 нм [de Fur et al., 1990]. Субъединичная структура гемоцианина, исследовалась методом электрофореза в полиакриламидных гелях.

Уровень гемоцианина в гемолимфе камчатского краба изменялся в течение линочного цикла. Низкий уровень белка наблюдался на ранних линочных стадиях, затем концентрация гемоцианина возрастала, достигая наибольших значений на стадии 3.2, после чего снижалась перед очередной линькой (рис. 1).

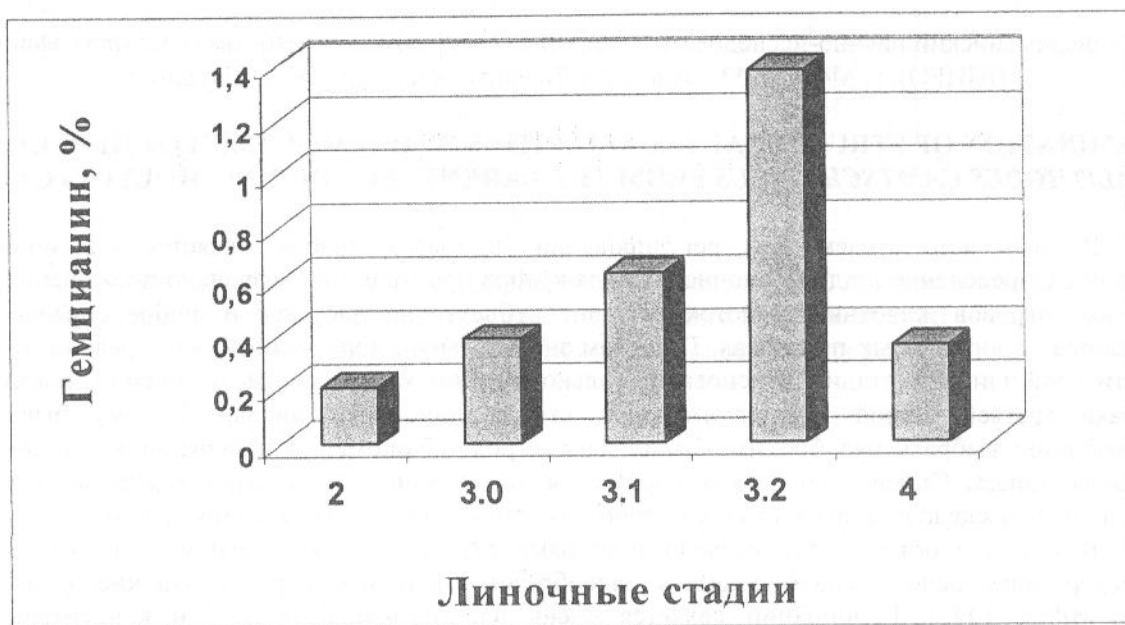


Рис.1. Зависимость уровня гемоцианина в гемолимфе самцов камчатского краба промышленного размера от стадии линочного цикла.

При разделении препаратов гемоцианина (10 мкг) методом денатурирующего электрофореза по Лэммли с додецилсульфатом натрия на электрофореграммах наблюдались 3 или 4 полосы (рис. 2). Молекулярная масса основного компонента составляла 74 kDa, трех минорных компонентов – 92, 79, 71 kDa. В качестве маркеров молекулярной массы использовались белки фирмы Fermentas: β -галактозидаза из *E.coli* – 116 kDa, бычий сывороточный альбумин -66.2 kDa, овальбумин – 45 kDa и лактат-дегидрогеназа из мышц свиньи – 35 kDa. Электрофоретическое разделение проб с гемоцианином давало различные результаты в зависимости от стадии линочного цикла, концентрации гемоцианина в пробе и от времени сбора материала. На стадии II и III-0 (третья ранняя стадия) средняя концентрация гемоцианина в пробах составляла 0,2 % и 0,4 % соответственно. При этом для образцов с концентрацией гемоцианина ниже 0,3% не удавалось получить четкого разделения полипептидных цепей, составляющих гемоцианин. Пробы с более высокой концентрацией белка (>0,3 %) на стадии II и III-0 давали при электрофоретическом разделении три полосы с молекулярными массами 74 и 92, 79. На стадии III-1 (третья промежуточная стадия) состав гемоцианина у крабов изменялся в зависимости от времени сбора материала. Гемоцианин из проб гемолимфы, собранных в начале ноября, состоял из трех компонентов. В составе гемоцианина из проб, собранных в начале декабря, появлялась дополнительная субъединица с молекулярной массой 71 kDa. На стадиях III-2 (третья поздняя стадия) и IV электрофоретическое разделение проб с гемоцианином давало четыре полосы. При этом хорошее разделение молекулярных компонентов достигалось и в пробах с низким содержанием гемоцианина, менее 0,2 % (для стадии IV).

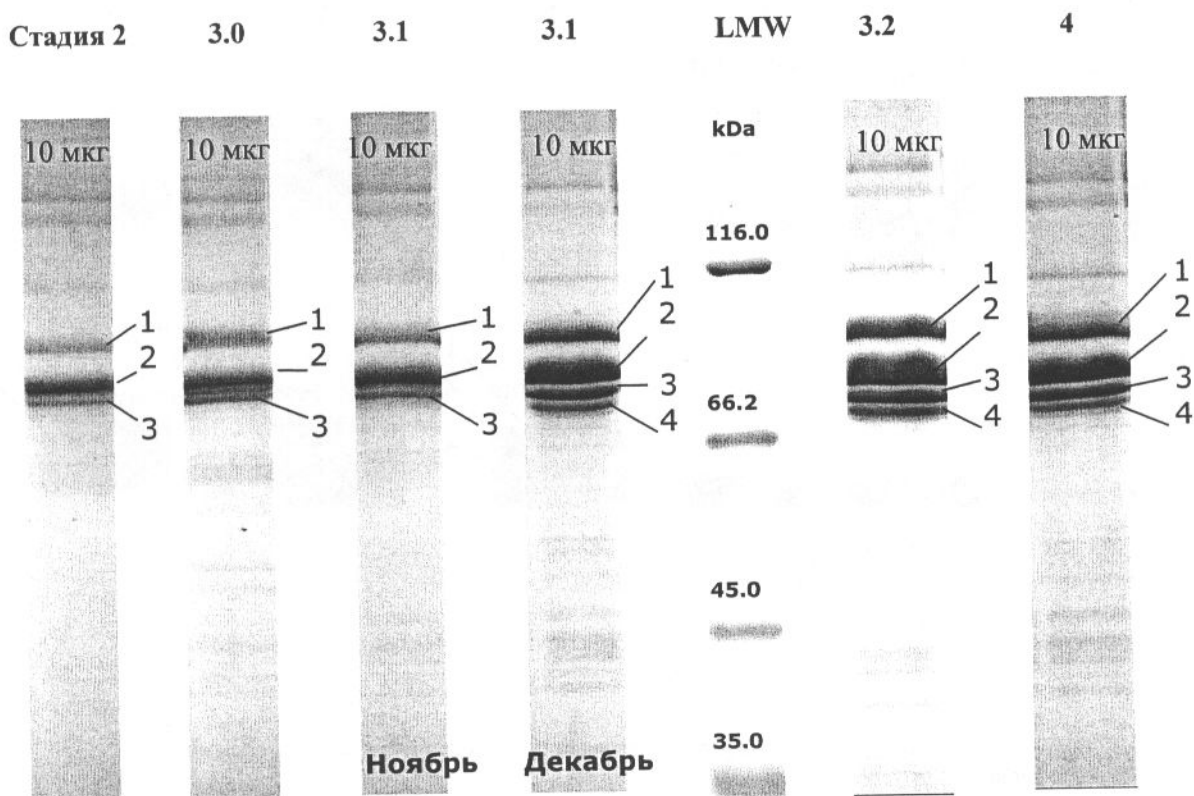


Рис.2. Денатурирующий SDS / гель-электрофорез гемоцианина из гемолимфы самцов промышленного размера *Paralithodes camtschaticus*

Изменение субъединичного состава гемоцианина у самцов камчатского краба промышленного размера в течение линочного цикла было продемонстрировано также методом диссоциирующего неденатурирующего электрофореза (рис. 3). Для этого каждую пробу гемоцианина предварительно диализовали в течение суток против трис-НСI буфера с высоким рН, содержащего 10 мМ ЭДТА. В этих условиях молекула гемоцианина диссоциировала на отдельные субъединицы, которые сохраняли свою нативную конформацию и электростатический заряд. При разделении нативных субъединиц гемоцианина для стадий II и III-0 на электрофореграмме наблюдалась одна быстро мигрирующая полоса, на стадиях III-2 и IV появлялись три дополнительных медленно мигрирующих полосы. Для стадии III-1 (третья промежуточная стадия) пробы гемоцианина, собранные в начале ноября, при электрофоретическом разделении давали одну полосу, пробы гемоцианина, собранные в начале декабря состояли из четырех компонентов.

Таким образом, на ранних и на поздних стадиях линочного цикла гемоцианин из гемолимфы самцов камчатского краба имел различный субъединичный состав. Субъединицы на разных стадиях отличались как по заряду, так и по молекулярной массе. В состав гемоцианина на ранних стадиях входило меньшее число различных типов субъединиц. На поздних стадиях линочного цикла в составе белка появлялись дополнительные субъединицы.

Причины, по которым на разных линочных стадиях гемоцианин имеет различный субъединичный состав, предстоит выяснить, прежде всего, определив, как меняются при этом функциональные характеристики белка (сродство к кислороду). Изменение состава гемоцианина приводит к изменению свойств белка, таких как конформационная стабильность по отношению к различным денатурирующим факторам (рН, температура). Поэтому на основании полученных данных при дальнейших исследованиях могут быть разработаны биохимические экспресс-методы, позволяющие определять линочную стадию крабов. Использование таких методов в дополнение к общепринятым методикам позволит определять стадии линочного цикла более достоверно и объективно.

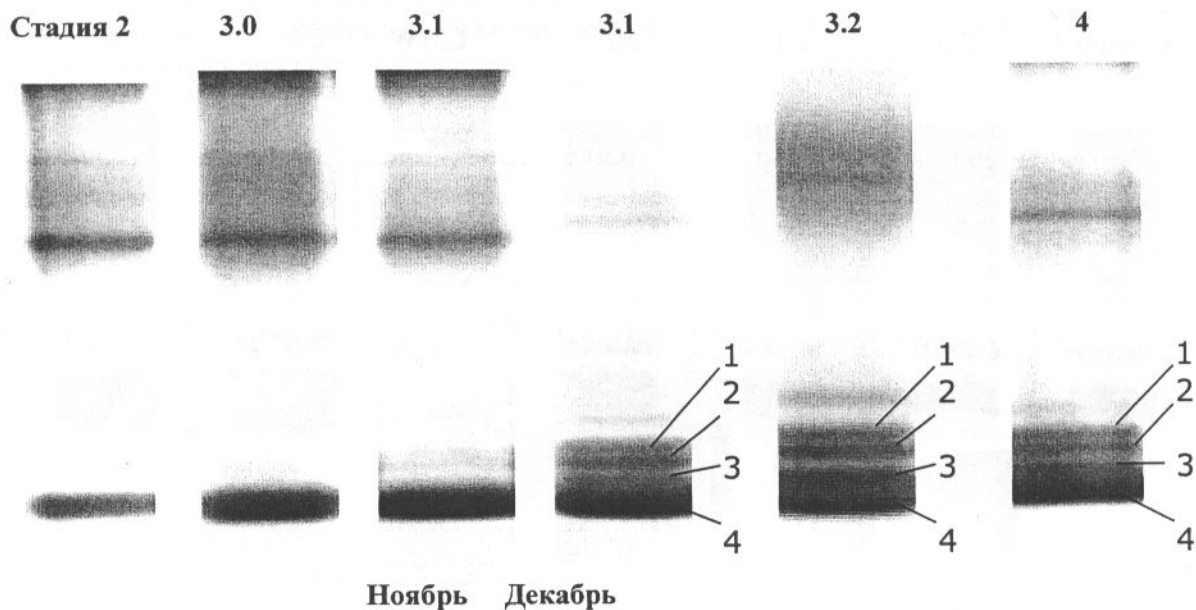


Рис.3. Неденатурирующий гель-электрофорез гемоцианина из гемолимфы самцов промыслового размера *Paralithodes camtschaticus*.

Литература

- Моисеев С.И.** 2003. Промыслово-биологические исследования камчатского краба (*Paralithodes Camtschaticus*) в январе-марте 2002 г. в прибрежной зоне Варангер-фьорда (Баренцево море). Донные экосистемы Баренцева моря. Труды ВНИРО. М.: Изд-во ВНИРО. Т.142. С.151-177
- Bellelli A., Giardina B., Corda M., Pellegrini M.G., Cau A., Condo C.G., Brunori M.** 1988. Sexual and seasonal variability of lobster hemocyanin. *Comp. Biochem. Physiol.* 91A. P. 445-449
- Dumler K., Terwilliger N.B.** 1996. Effect of food levels and temperature on growth and hemocyanin ontogeny in juvenile *Cancer magister*. *Am. Zool.* 36, 14A.
- Engel D.W., Brouwer M., Mercaldo-Allen R.** 2001. Effect of molting and environmental factors on trace metal body-burdens and hemocyanin concentrations in the American lobster, *Homarus americanus*. *Mar. Environ. Res.* 52(3). P. 257-269.
- DeFur P.L., Mangum C.P. Reese J.E.** 1990. Respiratory responses of the blue crab *Callinectes sapidus* to long-term hypoxia. *Biol. Bull.* 178. P. 46-54
- Holde, van K.E., Miller K.I.** 1995. Hemocyanins. *Adv. Protein Chem.* 47. 81 p.
- Mangum C.P.** 1994. Subunit composition of hemocyanin of *Callinectes sapidus*: phenotypes from naturally hypoxic waters and isolated oligomers. *Comp. Biochem. Physiol.* 108B. P. 537-541
- Mangum C.P., Rainer J.S.** 1988. The relationship between subunit composition and O₂ binding of blue crab hemocyanin. *Biol. Bull.* 174. P. 77-82
- Markl J., Hofer A., Bauer G., Markl A., Kempter B., Brenzinger M., Linzen B.** 1979. Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins. II. Crustacea. *J. Comp. Physiol. B* 133. P. 165-175
- Mattiello S., Raicevich S., Giomi F., Botter L., Di Muro P., Pranovi F., Beltramini M.** 2004. Resistance to stress and Hc functional modulation in *Liocarcinus* sp. *Micron* 35, P. 55-57.