

Горчаков И.А. 1999. Анализ двигательной активности *Asterias rubens* из Белого и Баренцева морей при различной солености // Биологические основы изучения, освоения и охраны животного и растительного мира, почвенного покрова Восточной Фенноскандии. Петрозаводск. С. 75–76.

Карпевич В.А. 1983. Реакция гидробионтов на загрязнение. М.: Наука. 185 с.

Корякин А.С., Шкляревич Г.А. 2001. Влияние опреснения на литоральные сообщества в кутовом участке Кандалакшского залива // Проблемы изучения рационального использования и охраны природных ресурсов Белого моря. Архангельск, С. 81–83.

Лопухин Ю.М., Арчаков А.И., Владимиров Ю.А., Коган Э.М. 1985. Холестеринос. М.: Медицина. 351 с.

Нефедова З.А., Руоколайнен Т.Р., Алексеева Н.Н., Васильева О.Б., Рипатти П.О. и др. 2005. Последствия влияния опреснения воды на липидный и жирнокислотный состав мидий Белого моря. // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Петрозаводск. С. 148–154.

Правдина Н.И. 1975. Значение жирнокислотных радикалов в структурной гетерогенности и метаболизме фосфолипидов // Успехи совр. биологии. Т.79. №2. С.205–224.

Тарусов Б.Н., Доскоч Я.Е., Козлов Ю.П. и др. 1969. О факторах, определяющих энергетику организмов при адаптации к осмотическим условиям. Ж. Биофизика. Т.14. Вып. 2. Хлебович В.В. 1981. Акклимация животных организмов. Л.: Наука, 136 с.

Хочачка П., Сомеро Д. 1977. Биохимическая адаптация. М.: Мир. 568 с.

Шульман Г.Е., Яковлева К.К. 1983. Гексаеновая кислота и естественная подвижность рыб // Журн. общ. биол. Т.44. № 4. С. 529–540.

EFFECT OF SALINITY OF WHITE SEA ON LIPIDS COMPOSITION OF AMPHIPODS

V.V. Bogdan¹, G.A. Schkljarevitch², T.R. Ruokolainen¹, L.V. Markova¹

¹ Institute of Biology of Karelian Research Centre
of Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia

² Petrozavodsk State University, Department of Ecology and Biology, Petrozavodsk
e-mail: gash@psu.karelia.ru

The effect of salinity on lipids, phospholipids and fatty acid composition of White Sea amphipods was investigated.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕМОГЛОБИНА *CHIRONOMUS PLUMOSUS* (L.)

В.В. Большаков, А.М. Андреева

Учреждение Российской академии наук Институт биологии внутренних вод
им. И.Д. Папанина РАН, п. Борок, Ярославская обл., Россия
e-mail: victorb@ibiw.yaroslavl.ru

Внеклеточные гемоглобины беспозвоночных, растворенные непосредственно в гемолимфе, как правило, имеют высокие величины молекулярной массы, достигающие 6000 kDa и выше, в отличие от внутриклеточных гемоглобинов, имеющих низкие величины молекулярной массы (Проссер, 1977; Уайт и др., 1982).. Исключением из этой закономерности является гемоглобин мотыля: его низкомолекулярный гемоглобин является внеклеточным белком, который растворен непосредственно в гемолимфе (Алякринская, 1979). У разных видов хирономид обнаружено более 10 фракций гемоглобинов. Согласно литературным сведениям гемоглобин хирономид представлен, в основном, мономерными (белки, состоящие из одной полипептидной цепи) и димерными (белки, состоящие из двух полипептидных цепей) формами (Schmidt, 1988). По некоторым данным (Tichy, 1975, 1981) гемоглобин мотыля из рода *Camptochironomus* имеет молекулярную массу около 16 kDa и представлен 12-ю фракциями. По данным других авторов (Rishi, 1996) у гемоглобинов *Ch. Ramosus* описано 11 фракций, из которых три приходится на мономеры, семь – на димеры и один гемоглобин является мономерным белком, способным к образованию димеров. Согласно данным Вебера (Weber, 1980) гемоглобин хирономид представлен не только мономерами и димерами, но и тетрамерами, находящимися в гемолимфе в свободном состоянии. Соотношение структурных форм может быть обусловлено рядом факторов, среди которых рН гемолимфы: в ще-

лочной среде содержится больше мономеров, тогда как в кислой среде больше димеров (Алякринская, 1979; Braunitzer, 1971). Высокий уровень разнообразия молекулярных форм гемоглобинов у насекомых, в том числе и у хирономид, связывают с дубликацией генов (Tichy, 1975). В пользу этого предположения говорит тот факт, что молекулярный вес всех гемоглобинов приблизительно одинаков и они имеют полигенную структуру (Braunitzer, 1971; Топунов, 2001).

Целью данного исследования является изучение молекулярного разнообразия и структурной организации гемоглобина у *Ch. plumosus*.

Материалы и методы

Объектом исследования являются личинки хирономид из мелководья Рыбинского водохранилища. Для анализа использовали гемолимфу, содержащую гемоглобин. Для дифференциации гемоглобинов использовали различные электрофоретические системы, в том числе и двухмерные: диск-электрофорез 7% ПААГ, электрофорез нативных молекул гемоглобина в градиенте концентраций ПААГ 5 – 40% (Андреева, 2008), электрофорез денатурированных молекул гемоглобина в ПААГ в присутствии 8М мочевины и в SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях (Laemmli, 1970). Окрашивание белков проводили с помощью Coomassie R-250 и бензидиновым реактивом согласно прописи (Маурер, 1971). Для определения молекулярной массы (ММ) нативных белков в ПААГ и денатурированных в ПААГ с 8М мочевиной использовали маркеры сывороточный альбумин человека САЧ (полимерные формы) и овальбумин ОА (полимерные формы); в SDS-ПААГ – набор PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas). Результаты обрабатывали статистически с помощью программного пакета OneDscan.

Результаты и обсуждение

В диск-электрофорезе гемоглобины *Ch. plumosus* дифференцированы на 10–12 фракций. Мы анализировали гемоглобин из наиболее выраженных фракций, которые обозначили на электрофореграмме как 0-фракция (катодная фракция), 1-я, 2-я, 3-я, 4-я и 5-я (анодная фракция) (Рис.1).

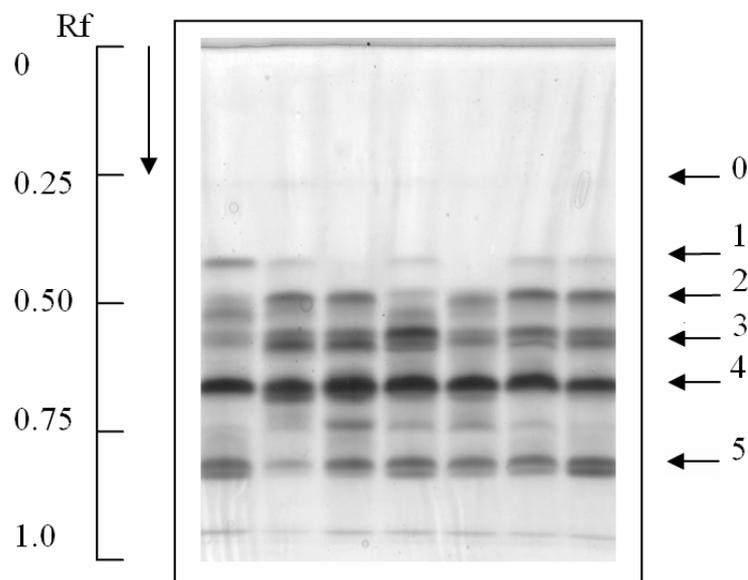


Рис. 1. Диск электрофорез *Ch. plumosus*. 0–5 – фракции гемоглобинов; вертикальная стрелка указывает направление электрофореза; Rf – шкала электрофоретической подвижности от 0 до 1,0.

Гемоглобины из всех перечисленных фракций (0–5) состояли из низкомолекулярных субъединиц с ММ от 10 до 12,5 kDa (Табл.1).

Таблица 1

Величины молекулярных масс нативных и денатурированных молекул гемоглобинов *Ch. plumosus*.

Тип электрофореза	Электрофоретические фракции гемоглобина				
	0-я	1-я	2-я	3-я	4-5-я
Градиент концентраций ПААГ (5–40%)	134	45	32	22	17
Электрофорез в ПААГ с 8М мочевиной	360	207–250 (2 комп.)	130–230 (3 комп.)	180 100 60	100 60 43 24
SDS-электрофорез	12,3	12,5	11 12,4	11,3 (несколько субъединиц с близкими значениями ММ)	12 11 10

Близкие значения ММ субъединиц (10; 11; 11,3; 12; 12,3; 12,4; 12,5) невозможно объяснить ошибкой расчетов величин ММ, так как на двухмерных и одномерных SDS-электрофореграммах белки были представлены дискретными компонентами (Рис.2).

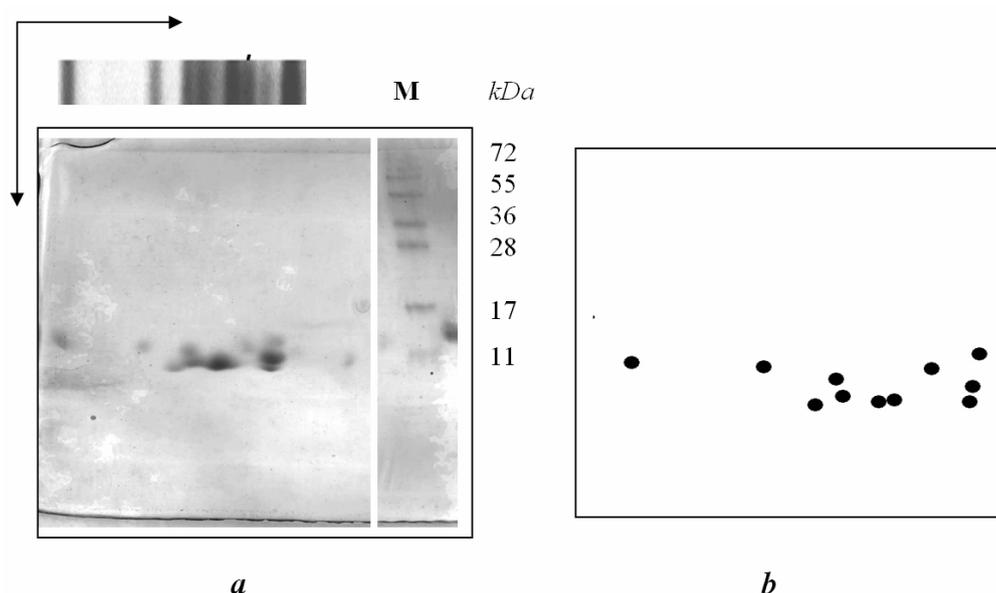


Рис.2. Двухмерный электрофорез гемоглобина *Ch. plumosus*: *a* – SDS-электрофорез, *b* – схема SDS – электрофореза. Горизонтальная стрелка обозначает направление диск-, вертикальная – SDS-электрофореза. М – маркеры из набора PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas) с ММ 11, 17, 28, 36, 55, 72, 95, 130, 250 kDa.

В нативных условиях разные субъединицы формируют различные спектры нативных белков (Табл.1). Так, субъединицы 0-й фракции с ММ 12,3 kDa в нативных условиях формируют белок с ММ 134 kDa, агрегирующий в 8М мочевины в высокомолекулярный комплекс с ММ 360 kDa. Между тем, субъединицы с похожей величиной ММ 12,5 kDa (1-я фракция) в нативных условиях образуют белок с ММ 45 kDa, являющийся, предположительно, тетрамером. В 8М мочевины этот тетрамер агрегирует в высокомолекулярный комплекс с ММ от 207 до 250 kDa. То же самое можно сказать и о субъединицах с ММ 11 и 11,3 kDa, которые в нативных условиях формируют молекулы с ММ 32 и 22 kDa соответственно, а в 8М мочевины образуют агрегаты с разными ММ (130–230 и 180 kDa).

Таким образом, гемоглобины *Ch. plumosus* представлены множественными структурными вариантами, среди которых нами выявлены три различных мономерных белка, образованные разными субъединицами (ММ субъединиц около 10, 11 и 12 kDa); один димерный белок, образованный субъединицей с ММ 11,3 kDa; белок-тример, в составе которого выявлены два типа субъединиц (ММ около 11 и 12,4 kDa); тетрамерный белок, образованный субъединицами одно-

го типа (ММ около 12,5 kDa) и высокомолекулярный белок, в составе которого выявлены субъединицы одного типа (12,3 kDa). Описанные нами белки-мономеры, димеры, тримеры, тетрамеры и высокомолекулярный гемоглобин по-разному ведут себя в 8М мочевины. Только два мономерных белка (13 и 17 kDa) в присутствии мочевины агрегируют в небольшие молекулы (24 и 43 kDa), все остальные белки агрегируют в высокомолекулярные комплексы с разной степенью агрегации.

Выводы

1. Выявлен высокий уровень разнообразия нативных молекул гемоглобина и входящих в его состав субъединиц *Ch. plumosus*.
2. Среди структурных форм гемоглобинов *Ch. plumosus* присутствуют белки-мономеры, димеры, тримеры, тетрамеры и высокомолекулярные формы.

Литература

- Алякринская И.О., 1979. Гемоглобины и гемоцианины беспозвоночных. Биологические адаптации к условиям среды. М.: Наука. с.155.
- Андреева А.М., 2008. Структурно-функциональная организация белков крови и некоторых других внеклеточных жидкостей рыб. Автореф. дис. докт. биол. наук. М.: МГУ.
- Маурер Г., 1971. Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле. Пер. с немецкого. М.: Мир. 247 с.
- Проссер Л., 1977. Сравнительная физиология животных. Т.2. Пер. с английского. М.: Мир. 572 с.
- Топунов А.Ф., Петрова Н.Э., 2001. Гемоглобины: эволюция, распространение и гетерогенность // Успехи биологической химии. Т.41. с. 199–228.
- Уайт А., Хендлер. Ф., 1981. Основы биохимии: в 3-х томах. Т.3. Пер. с англ. М.:Мир.
- Braunitzer G., 1971. Die Polygenie der Hamoglobine (Erythrocrurine) der Chironomiden. Limnologika (Berlin). Т.8. N.1. P.119–124.
- Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // Nature (Gr.Brit.). 4. Vol.227. №5259. P. 680–685.
- Rishi D., 1996. Hemoglobin in *Chironomus ramosus*: an electrophoretic study of polymorphism, development sequence and interspecific relationship. Hydrobiologia. Т.318, P.43–50.
- Schmidt E.R., Keyl.H.-G., 1988. In situ localization of two haemoglobin gene clusters in the chromosomes of 13 species of *Chironomus* // Chromosoma (Berl). Т.96. P.353–359.
- Tichy H., 1975. Nature genetic basis and evolution of the hemoglobin polymorphism in *Chironomus*. J. Mol.Evol. Т.6. P.39–50.
- Tichy H., 1981. studies on the evolutionary relationships between hemoglobins in *Chironomus pallidivittatus* and *Ch. tentans*. J. Mol. Evol. Т.18. P.9–14.
- Weber R., 1980. Function of invertebrate Hemoglobins with special reference to adaptations to environmental hypoxia // American zoologist. Т.20. №1. P.79 – 101.

FEATURES OF STRUCTURAL ORGANISATION HAEMOGLOBIN *CHIRONOMUS PLUMOSUS* L.

V.V. Bolshakov, A.M. Andreeva

Institute for Biology of Inland Waters RAS, Borok, Russia
e-mail: victorb@ibiw.yaroslavl.ru

Hemolymph of the fourth instar larvae of *Chironomus plumosus* (Linnaeus, 1758) have 10 – 12 electrophoretically different fractions of haemoglobins. The natives molecules of haemoglobin are presented by multiple structural variants: by monomers with the MW of 13 & 17 kDa; by dimers with the MW about 22 kDa, consists of two subunits about 11,3 kDa; by trimers with the MW about 32 kDa, consists of three subunits with different MW (11 & 12,4 kDa); by tetramers with the MW about 45 kDa, consists of equal subunits 12,5 kDa, and high molecular protein with MW about 134 kDa, consists of equal molecules 12,3 kDa. Listed haemoglobin structural variants have different surface structures: in the presense of 8M urea only two monomeric proteins (with the MW 13 and 17 kDa) aggregate into small molecules (24 and 43 kDa), all other proteins aggregate in high molecular-complexes with varying degree of aggregation (from 60 to 360 kDa).