УДК 638.221: 577.112

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОРОД ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА ПО РАСТВОРИМЫМ БЕЛКАМ ГРЕНЫ

В.В. БОГОСЛОВСКИЙ*

Получены экспериментальные данные о множественной природе и молекулярной гетерогенности белков грены тутового шелкопряда. Наличие или отсутствие маркерных белков с определенным pH может служить способом идентификации пород тутового шелкопряда на фазе яйца.

Ключевые слова: породы тутового шелкопряда, растворимые белки грены, идентификация пород по биохимическим тестам.

Для характеристики пород тутового шелкопряда основными критериями идентификации служат морфологические и биотехнологические признаки. Однако эти признаки имеют значительную изменчивость и во многом зависят от условий внешней среды, кормления, технологических аспектов, поэтому не всегда позволяют с высокой точностью определить принадлежность особей к той или иной породе. В связи с этим в последние годы интенсивно ведется поиск новых физиолого-биохимических маркеров, обладающих высокой информативностью для идентификации пород тутового шелкопряда. При этом принципиально важным моментом является возможность выявления таких маркеров на наиболее ранних стадиях развития насекомого.

Для генетической характеристики пород, популяций с.-х. животных, и в частности хозяйственно полезных насекомых, широко используется полиморфизм белков и ферментов [1, 3]. Однако изучение полиморфизма белков методом электрофоретического разделения белковой смеси по молекулярной массе ее компонентов не обладает достаточной разрешающей способностью для точной идентификации пород тутового шелкопряда [3, 4, 5]. В связи с этим актуален поиск новых методов разделения белков, в частности, их изоэлектрофокусирование в различных диапазонах pH с последующим электрофоретическим разделением. Решение данной проблемы стало целью настоящего исследования.

Методика

Объектом исследования служила грена (яйца) второго дня постдиапаузного развития, которая характеризуется появлением ротовых частей и грудных ножек на передних метамерах. Материалом служили три породы — Пятигорская станция (ПС-5), Белококонная 2 (Б-2), HSC-90 из коллекции Республиканской научно-исследовательской станции шелководства (п. Иноземцево, Ставропольский край).

Инкубацию грены осуществляли в стандартных условиях (температура 23~24°C, относительная влажность 70%).

Для получения растворимых белков навеску грены (1 г) гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Даунса

* Республиканская научно-исследовательская станция шелководства.

в 10 объемах 0,15 М раствора NaCl в течение 15 мин, затем центрифугировали при 20000g в течение 30 мин. К полученному супернатанту добавляли 5% додецилсульфата натрия (SKS) и 5% (3-меркаптоэтанола и выдерживали на водяной бане при 90°С в течение 5 мин. Полученные образцы использовали для проведения изоэлектрофокусирования на приборе «Multi phor» фирмы «LKB» (Швеция). В работе использовали пластины ПААГ с линейным градиентом концентрации акриламида 5-12% в присутствии 1% SKS. Для нанесения образцов белковых экстрактов (20 мл) использовались стандартные мишени для изоэлектрофокусирования, представляющие собой пластинки фильтровальной бумаги размером 10 Х 5 мм. По окончании фокусирования белки фиксировали раствором 10%-й трихлоруксусной (ТХУ) в течение 10 мин. Далее пластину промывали дистиллированной водой и проводили окрашивание белков 1%-м раствором Кумасси R — 250 в течение 1 часа. Пластины отмывали смесью уксусная кислота — этанол — вода в соотношении 10:1:30 соответственно до обесцвечивания фона и четкого выявления полос белковых фракций. Сканирование пластин осуществляли с использованием компьютерной программы, позволяющей проводить автоматический поиск пиков белковых фракций и определять их относительное содержание по площади пиков.

Результаты

Описание использованных в исследовании пород тутового шелкопряда ПС-5, Б-2, HSC-90 по морфологическим признакам не позволило установить каких-либо значимых различий по цвету грены ее форме, зернистости кокона, окраске кожных покровов гусениц, а также биотехнологическим показателям — массе и урожайности коконов, содержанию шелка в сырых коконах, шелконостности сухих коконов их разматываемости (таблица). В то же время исследование белковых спектров выявлен достаточно широкий белковый полиморфизм. Выявлено от 13 до 18 белковых фракций с различным количественным содержанием белка, при этом степень окрашивания белковых фракций в значительной степени варьировала для каждой из анализируемых пород. Так, наиболее полиморфной оказалась порода HSC-90, у которой выявлено 18 белковых фракций, затем следовала порода Б-2 с 16 белковыми фракциями и менее полиморфной из изученных пород оказалась порода ПС-5 с 13 белковыми вариантами. Результаты сопоставления белковых спектров пород HSC - 90, Б-2 и ПС-5 представлены на диаграмме (рис. 1). Записи интенсивности окрашивания белковых фракций в дорожках геля и их компьютерное изображение представлены на рисунке 2.

Сопоставление полученных данных позволило установить, что порода HSC-90 отличается от породы Б-2 наличием пяти белковых зон в диапазоне pH 5,95 - 6,4 (у породы Б-2 в этой области белков нет). В зоне pH 7,0 — 7,2 у породы HSC-90 — три белковые фракции, в то время как у Б-2 только один белок с pH 7,2.

Сравнение белковых спектров пород Б-2 и ПС-5 выявило, что у первой в диапазоне pH 5,55-5,75 присутствует четыре белковые фракции, в то время как у второй лишь один белок с pH 5,55. В области pH 7,25-7,45 в белковом спектре породы Б-2 не выявлено белковых фракций, а у ПС-5 обнаружен один белок с pH 7,40.

Сопоставление белковых профилей пород ПС-5 и HSC-90 выявило, что в диапазоне pH 5,7-6,0 у первой обнаружено присутствие одной белковой фракции, в то время как у второй их пять. Однако в диапазоне от 5,3-5,65 у ПС-5 выявлено три белка, а у HSC-90 — один.

Морфологические признаки разных пород тутового шелкопряда

Порода	Географическое происхождение	Морфологические				Биотехнологические				
		характеристика грены	окраска кожного покрова гусеницы	цвет и форма кокона	зернистость коконов	масса кокона, г	урожай коконов в 1 г гусениц, кг	шелк оболочки сырых коконов, %	шелконость сухих коконов, %	размотываемость, %
Пятигорская станция (ПС-5)	Россия	Клеящаяся Сиреневая	Приблизительно половина с масками и полулуниями, половина без пигментации	Белый удлиненный с небольшим перехватом	Средняя	1,9	3,48	18,6	37,7	86,4
Белококонная 2 (Б-2)	Китай	Клеящаяся Пепельная	Белые с масками и полулуниями	Белый овальный с перехватом	Мелкая и средняя	2,0	3,75	19,2	38,7	86,7
HSC-90	Румыния	Клеящаяся Пепельная	Белые с масками и полулуниями на 2,5 брюшных сегментах	Белый овальный с перехватом	Средняя	2,0	3,75	19,3	41,7	88,1

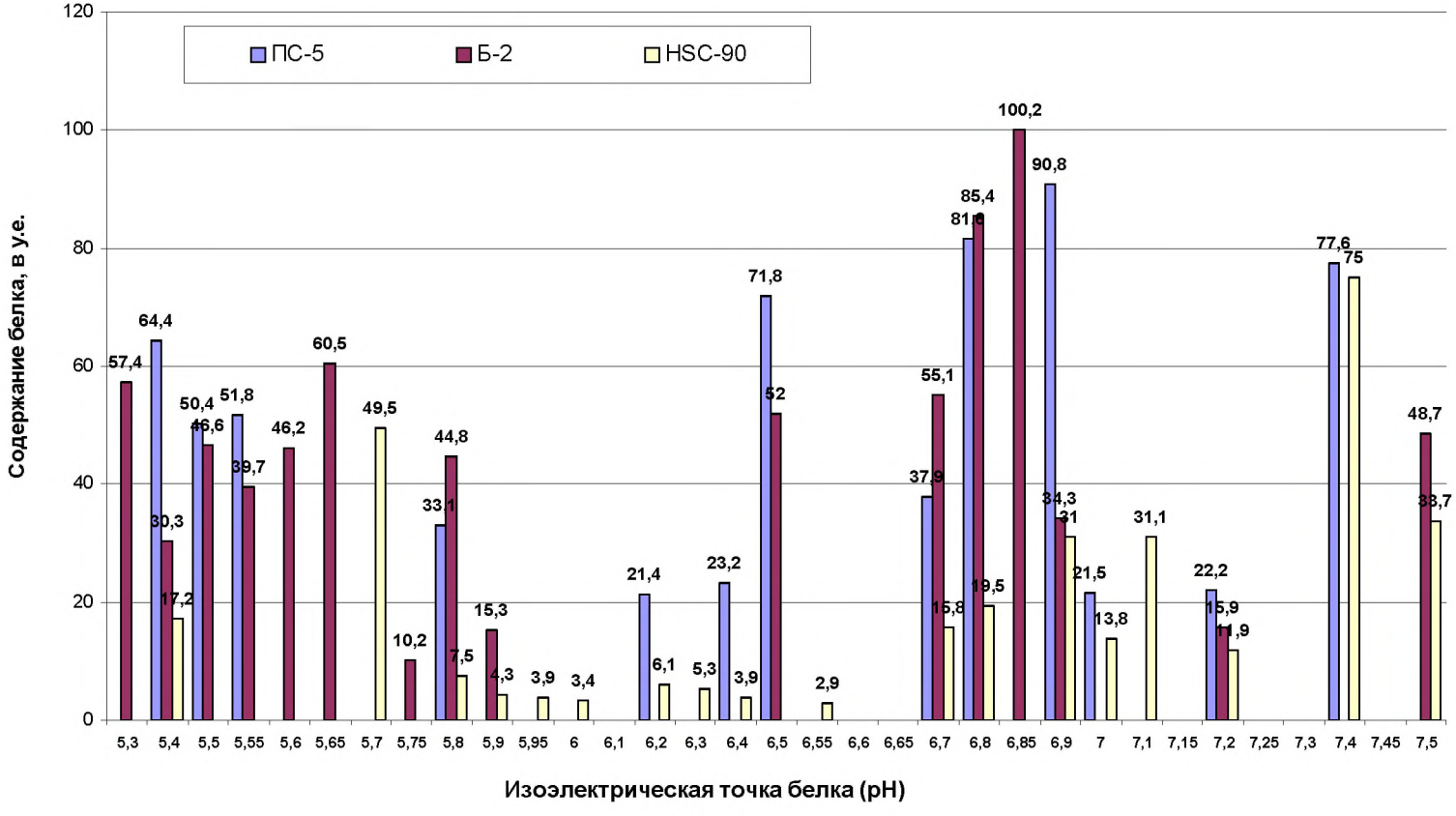
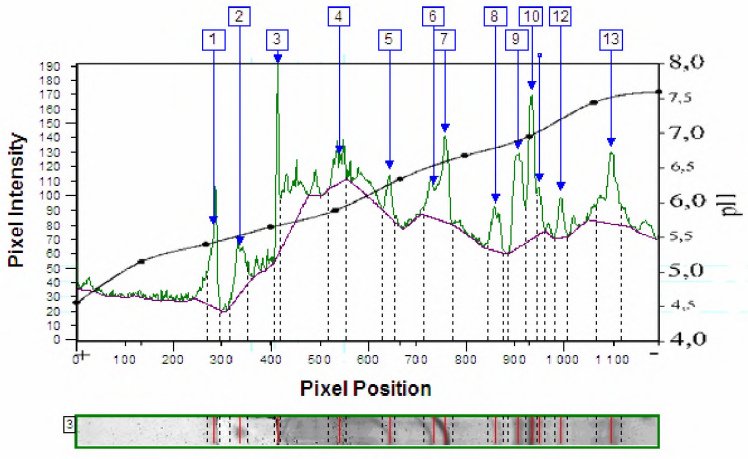
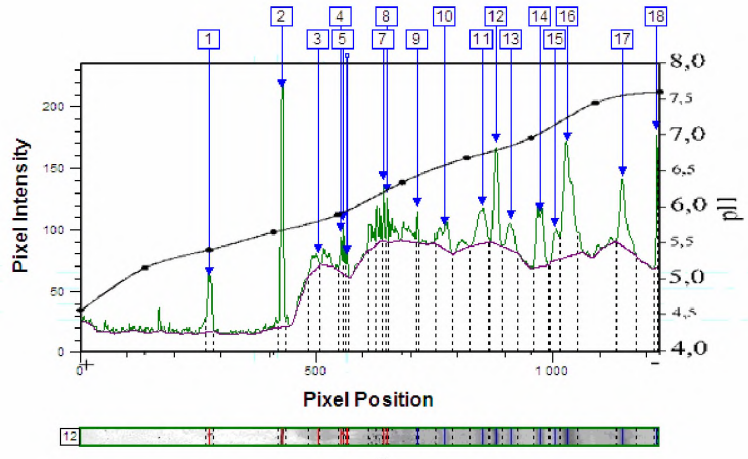


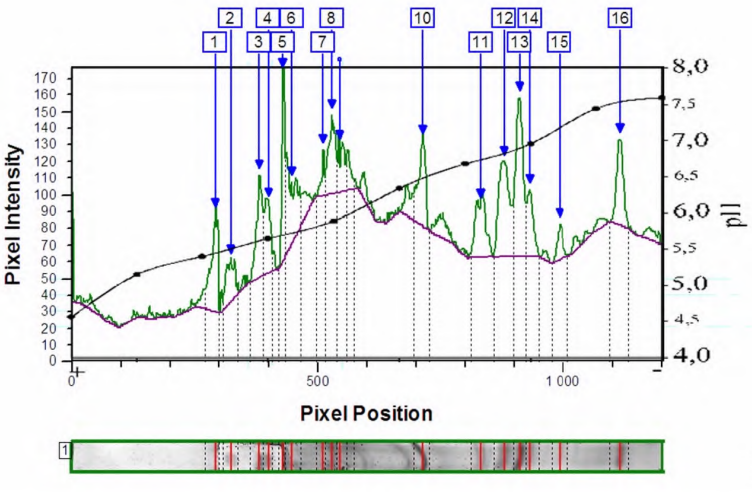
Рис. 1. Изоэлектрофокусограммы растворимых белков грены разных пород тутового шелкопряда



а



б



в

Рис. 2. Компьютерное изображение кривой записи белковых фракций и дорожки ПААГ пород: а) ПС-5; б) Б-2; в) HSC-90

П р и м е ч а н и е: ось ординат: левая часть — оптическая плотность дорожки; правая часть — проекция pH на ось абсцисс; ось абсцисс — длина дорожки от «+» до «–». Изображение под графиком — рисунок дорожки с указанием белковых зон.

Сравнение всех исследованных пород показало, что у породы Б-2 в зоне pH 5,3 присутствует белок, у пород ПС-5, HSC-90 в этой зоне белков нет. В зоне pH 7,5 есть белки у пород Б-2, HSC-90, в то время как у породы ПС-5 не выявлено белковых фракций. Белковый полиморфизм в зонах pH 5,7 и 7,1 характерен только для породы HSC-90. Таким образом, обобщение полученных данных позволяют сделать вывод о возможности проведения идентификации пород по наличию или отсутствию маркерных белков с определенным pH.

Заключение

Исследованием белковых спектров методом изоэлектрофокусирования грены у трех пород тутового шелкопряда выявлен достаточно широкий белковый полиморфизм. Наиболее полиморфной оказалась порода HSC-90, у которой было выявлено 18 белковых фракций, затем следовала порода Б-2, у которой обнаружено 16 белковых фракций и менее полиморфной была порода ПС-5 с 13 белковыми вариантами. По наличию или отсутствию маркерных белков можно разделить породы ПС-5, Белококонную 2 и HSC-90, у которых практически нет морфологических различий.

Библиографический список

1. *Алтухов Ю.П.* Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003.

2 Актуальные теоретические и практические аспекты биохимии и жизнедеятельности насекомых / Н.М.Кутузова, Т.А Егорова, С.М. Клунова и др. / Тр. Московского ГПУ, Сер. физико-матем. и естеств. науки, 2007. С. 219-234.

3 *Коничева А.П.* Сравнительное изучение белкового полиморфизма у различных по происхождению и продуктивности пород тутового шелкопряда: Автореф. канд. дисс. М., 1975.

4 *Коничев А.С., Севастьянова Г.А.* Молекулярная биология. М.: Академия, 2003.

5. *Jin H.J., Kaplan K.L.* Mechanism of silk processing in insect and spiders // Nature, 2003, V. 424, N 6952, P. 1057-1061.

Рецензент — д. б. н. А.А. Иванов

SUMMARY

Experimental data on multiple nature and molecular heterogeneity of silkworm eggs proteins are gathered. Kccurrence or lack of marker proteins with definite ph-range may work as a way to identify silkworm breeds at the phase of graine.

Key words: indentification of silkworm breeds, biochemical polymorphism of soluble proteins, isoelectric focusing of proteins.