

РАСТВОРИМЫЕ БЕЛКИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ОСОБЕЙ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ *DERMACENTOR RETICULATUS* (F.)

Наталья СИТНИКОВА*, Вячеслав РЕВА***, Александр МОВИЛЭ**, Ион ТОДЕРАШ**

*Биолого-почвенный факультет Молдавского госуниверситета

**Центр общей и молекулярной биологии. Институт зоологии Академии наук Молдовы

Prin metodele de electroforeză nativă în gel de poliacrilamidă cu gradient de electroforeză și gelfiltrare au fost studiate proteinele solubile din indivizi de căpușă *Dermacentor reticulatus* (F.)

By means of native pore gradient electrophoresis and gelfiltration were studied the soluble proteins of the individual ticks of *Dermacentor reticulatus* (F.)

Введение

В настоящее время не вызывает сомнения значение иксодовых клещей как хранителей и переносчиков особо опасных трансмиссивных зоонозных инфекций человека и домашних животных, таких как туляремия, лихорадка Q, Лайм-боррелиоз, гранулоцитарный эрлихиоз человека, различные арбовирусные инфекции и др. По данным Васильевой, 2005 [1], среди установленных 175 патогенов, связанных с новыми болезнями человека, 22% составляют трансмиссивные зоонозы.

В настоящее время не вызывает сомнения, что полиморфизм популяции иксодовых клещей в локальных очагах может привести к полиморфности передаваемых ими патогенов, что существенно может осложнить диагностику клещевых инфекций [2].

Доминирующее количество исследований биохимического и генетического полиморфизма осуществлено на иксодовых клещах *Ixodes ricinus*. Однако данные по полиморфизму популяций иксодовых клещей *Dermacentor reticulatus* (доминирующего вида) на территории Республика Молдова отсутствуют.

Материалы и методы

Сбор и видовое определение иксодовых клещей. Иксодовых клещей с растений собирали стандартными зоологическими методами. Видовое определение собранного материала проводили по определительным ключам Филипповой [3].

Для экспериментов нами были отобраны самцы и самки иксодовых клещей *D. reticulatus*.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле. Гель с непрерывным градиентом концентрации (10-20%) акриламида готовили по стандартной методике [4].

Растворимые белки индивидуальных особей экстрагировали 0,625 М Tris-HCl, pH 6,8, в соотношении 500 мкл на особь, используя стеклянные гомогенизаторы. После центрифугирования при 1400×g в течение 20 мин. гомогенат концентрировали до конечного объема 20 мкл, используя Roti-Spin Mini 30. Затем к гомогенату добавляли глицерин до конечной концентрации 20% и следы бромфенолового синего.

Электрофорез проводили при напряжении 50 V в первые 30 мин., затем при 100 V. Белки окрашивали 0,5% Serva Blue G в 10% уксусной кислоте. Гель обесцвечивали 10% уксусной кислотой. Молекулярные массы белков оценивали по степени миграции в геле HMW-Native.

Разделение белков методом гель-фильтрации. Особи подвергались гомогенизации в рабочем буфере 20 mM MES + 0,5 M KCl, pH6. После центрифугирования (при вышеуказанных условиях) к гомогенату дробно добавляли 10% полиэтиленполиимин (pH 7) до конечной концентрации 1%. Образцы перемешивали и оставляли на 10 мин. до выпадения осадка фосфолипидов и нуклеиновых кислот, мешающих проведению эксперимента. Затем проводили повторное центрифугирование. Для гель-фильтрации использовали колонку Superdex™ 75 HR 10/30, уравновешенную рабочим буфером 20 mM MES + 0,5 M KCl, pH6. Колонку предварительно калибровали, последовательно пропуская через нее белки известной молекулярной массы и определяя объем элюирования каждого из них. По полученным данным строили график в координатах: logMr – объем элюирования.

Результаты и обсуждение

На рисунке 1 приведена электрофореграмма растворимых белков 10 особей иксодовых клещей вида *D. reticulatus* (5 самок, 5 самцов).

Как явствует из электрофореграммы, качественные и количественные отличия наблюдаются у всех исследованных особей. Преобладающими по количеству являются белки с молекулярной массой между 232 и 440 kDa.

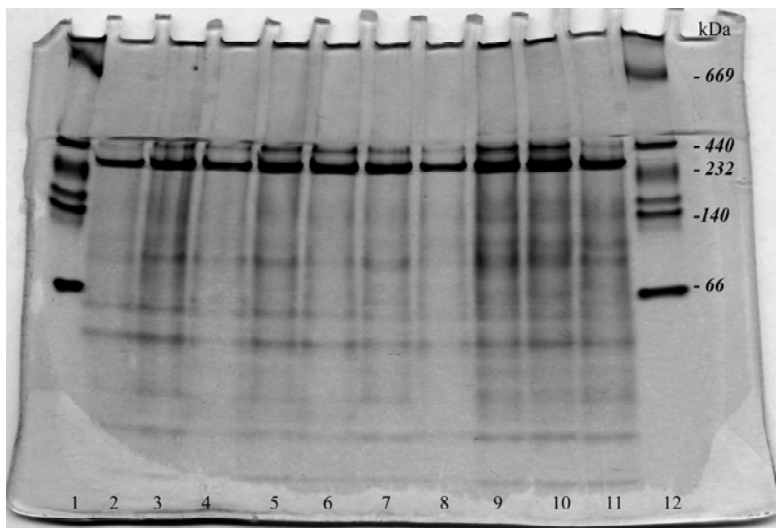


Рис.1. Растворимые белки 10 индивидуальных особей иксодовых клещей. Образцы № 1, 12 – молекулярный маркер HMW-Nativ; № 2-6 – растворимые белки самцов *D. reticulatus*; № 7-11 – растворимые белки самок *D. reticulatus*.

Представляло интерес оценить молекулярные массы групп белков методом гель-фильтрации. На рис. 2 приведены результаты гель-фильтрации. В обоих случаях основную массу белка составляли высокомолекулярные компоненты, элюирующиеся сразу после свободного объема колонки.

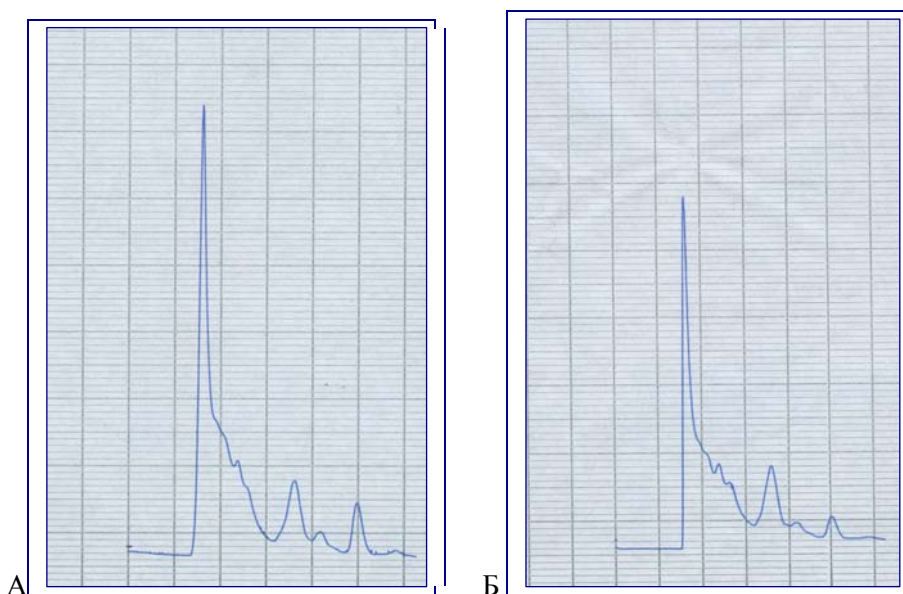


Рис. 2. Хроматограммы растворимых белков, характерные для самцов (А) и самок (Б) *D. reticulatus*.

Для самцов характерны фракции с молекулярными массами 67, 53, 24, 15 kDa, для самок – 67, 42, 24, 14 kDa. Наши результаты, как и исследования других авторов, свидетельствуют о значительном половом диморфизме белков *D. reticulatus* [5,6].

Литература:

1. Васильева И.С. Новые болезни, передаваемые клещами рода *Ixodes* (Ixodidae) // Журнал тестконтроля «РЭТ – ИНФО». - 2005. - Т.56 (4). - С.14-16.
2. Alekseev, A. N., H. V. Dubinina, P. A. Chirov, A. M. Peterson and M. A. Turceva. Peculiarities of cadmium-tolerant populations of *Ixodes* ticks: specificity of their microbiocenoses, immunity and vector capacity // *Acarina*. - 2005. - No13. - P.93-104.
3. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи по сем. Ixodinae // Фауна СССР. Паукообразные. - 1977. - Т. IV (4). - 395 с.
4. Рева В.А. Простое приготовление пластин геля с градиентом пор // Лабораторное дело. - 1983. - Т.7. - С.57-59.
5. Gasperik J., Kocakova P., Slovak M., Hajnicka V., Fuchsberger N. and Nuttall P. Proceedings of the 3rd International Conference "Ticks and tick-borne pathogens: Into the 21st Century". Differences in salivary gland extracts derived from male and/or female ticks. - 2000. - P.177-179.
6. Reva V., Ciobanu V., Mueller-Uri F. Strategia și tactica izolării și purificării proteinelor. - Chișinău, 2001, p.94-97.

Notă: Materialele au fost prezentate la Simpozionul Internațional *Mecanisme molecular-genetice ale proceselor metabolice*, 4 septembrie 2008, Chișinău, Moldova.