

S. Jadrić, A. Abinun, B. Perić, M. Winterhalter, F. Tanacković, T. Vuković

Institut za fiziologiju i biokemiju Medicinskog fakulteta i

Biološki institut Univerziteta u Sarajevu

Elektroforetska analiza proteina i lipoproteina seruma podbile (*Chondrostoma phoxinus*, Heck) na agarnom gelu

Elektroforetska analiza serumskih proteina riba na agarnom gelu u posljednje vrijeme nalazi sve širu primjenu (ALTUHOV i NEFJODOV 1967, IPATOV 1970, JADRIĆ et al 1971-a), jer ima niz prednosti nad većinom drugih elektroforetskih tehnika. U prvom redu među ovim prednostima treba spomenuti brzinu analize, minimalnu količinu potrebnog uzorka i mogućnost da se veći broj uzoraka analizira istovre-

meno pod identičnim uslovima. Nadalje, kada se uporedo izvode elektroforeza i imuno elektroforeza na agaru, moguće je bez teškoća vršiti identifikaciju proteinskih frakcija prema pokretljivosti i antigenskim osobinama (WINTERHALTE et al 1971, ABINUN et al 1971).

Iz tih razloga, mi smo primijenili mikroelektroforetsku tehniku na agarnom gelu u ispitivanju serum-

skih proteina kod niza slatkovodnih riba sa područja Bosne i Hercegovine (JADRIĆ et al. 1971-b). Istitivanja su pokazala zadovoljavajuće rezultate, te smo u ovom radu poduzeli ispitivanje proteinograma seruma *Chondrostoma phoxinus*, koji je u dosadašnjim istraživanjima analiziran elektroforezom na papiru (KALUĐERČIĆ et al. 1969. i 1970, BRKIĆ 1972). Mi smo nadalje poduzeli istovremenu analizu lipoproteinskih komponenti u serumu *Ch. phoxinus*.

MATERIJAL I METODE

Ispitivanja su vršena na 20 jedinki *Ch. phoxinus* oba spola. Krv je uzimana presijecanjem repa i sakupljena u hematokritske cjevčice, a potom centrifugirana tokom 4 minute u hematokritskoj centrifugi Janetzki TH 12.

Elektroforeza je izvođena na 2%-tnom agarom gelu (Difco Noble Agar) po mikrometodi SCHEIDEGGER-a (1955) u aparatu »Egaton«. Za analizu je korišten Veronal pufer pH 8,2. Napon na elektrodama je iznosio 70 V, a jačina struje je bila 40 mA za 8 pločica. Bojenje Amido crnim 10-b i odbojavanje octenom kiselinom je vršeno po standardnoj metodi.

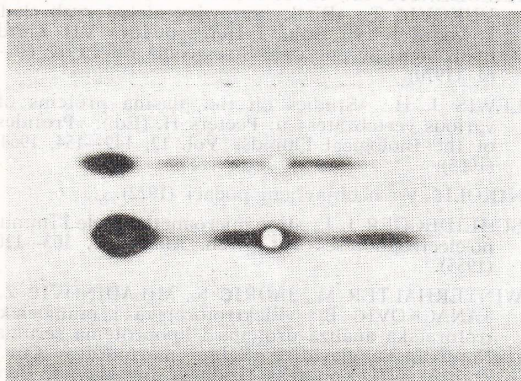
Kvantitativna analiza je izvođena denzitometrijskom metodom (JADRIĆ et al. 1971-c).

Kao kontrolni uzorak za upoređenje pokretljivosti i kvaliteta separacije, uz svaku probu je analiziran i uzorak standardnog humanog seruma. Vrijednosti dobivene za ekstinkcije po milimetru gela su nanosene na milimetarski papir u omjeru 1:1 i konstruirani su dijagrami.

Elektroforeza lipoproteina je izdvojena pod istim uslovima. Bojenje je vršeno Sudan crnim, a kvantitativna analiza frakcije je također obavljena denzitometrijski.

REZULTATI I DISKUSIJA

Na slici 1 je prikazan izgled proteinograma seruma *Ch. phoxinus* (gore) i seruma čovjeka (dolje) nakon istovremene separacije na agarom gelu.

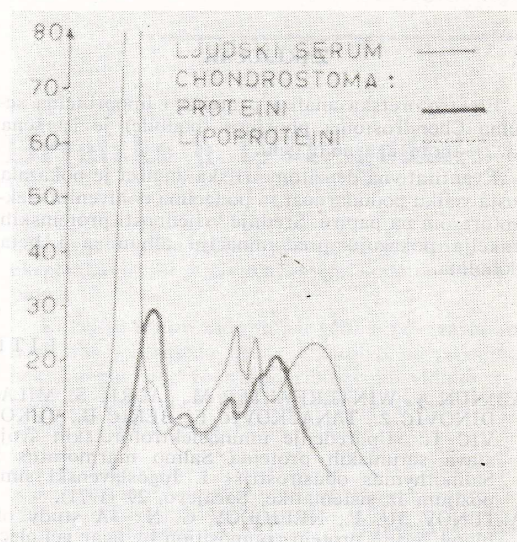


Slika 1 — Elektroforetska slika serumskih proteina *Ch. phoxinus* (gore) i seruma čovjeka na agarom gelu

Na slici se vidi pojava uočena i od ranijih istraživača (KALUĐERČIĆ et al. 1969), naime odsutnost proteina *Ch. Phoxinus*, koji bi pokretljivošću odgovarali gama globulinima čovjeka. Separacija anodnih

frakcija u *Ch. phoxinus*. (albumin, alfa-1 i alfa-2 globulini) je veoma dobra, jasnija nego kod nekih drugih riba (JADRIĆ et al. 1971-b). Koncentracija bjelancevina u serumu ribe je znatno niža nego u čovjeka, što je u skladu s podacima koji se odnose na koncentracije proteina u serumu riba i drugih nižih kičmenjaka (LEWIS, 1965, NIKOLIĆ, 1972).

Na slici 2 su prikazani uporedo dijagrami dobiveni denzitometrijskom analizom humanih proteina, te proteina i lipoproteina *Ch. phoxinus*.



Slika 2 — Dijagrami ekstinkcionih vrijednosti serumskih proteina čovjeka (tanka linija), te proteina i lipoproteina seruma *Ch. phoxinus* na agarom gelu

Na slici su naznačene ekstinkcione vrijednosti dobivene uz crveni filter denzitometra. Kako se vidi na dijagramu, dvije osnovne proteinske komponente u serumu *Ch. phoxinus* su albumin i beta globulin. Lipoproteini se elektroforezom na agaru frakcioniraju u dvije komponente od kojih brža pokazuje pokretljivost albumina i znatno je veće koncentracije. Sporija komponenta lipoproteina ispoljava pokretljivost alfa-2 globulina, slično kao frakcija beta lipoproteina čovjeka.

Rezultati kvantitativne analize elferograma *Ch. phoxinus* su prikazani u tabeli I u formi srednjih vrijednosti i standardne greške.

FRAKCIJE	ALBUMIN	α ₁	α ₂	β
PROTEINI	45,84 ± 0,54	10,95 ± 0,28	13,37 ± 0,18	28,84 ± 1,11
LIPOPROTEINI	57,2 ± 0,56		22,3 ± 1,26	

Tabela I — Relativne koncentracije proteina i lipoproteina seruma *Ch. phoxinus* nakon elektroforeze na agarom gelu

Iz tabele se vidi da je koncentracija albumina nešto ispod 46% u prosjeku, što se približava srednjim vrijednostima u serumu nekih drugih ciprinida (JADRIĆ et al. 1971-b). Najveće variranje rezultata

je bilo u frakciji beta globulina, što je uvjetovano izvjesnim stupnjem hemolize u nekim slučajevima.

Kvantitativna analiza lipoproteina je potvrdila da se više od dvije trećine lipoproteinskog materijala može dokazati u bržoj frakciji, tzv. »lipalbuminu« (BARON, 1968).

Kvantitativna distribucija lipoproteinskih frakcija se unekoliko mijenja u toku konzerviranja seruma na +4 °C, iako kod *Ch. phoxinus* te promjene nisu izražene u onoj mjeri u kojoj se javljaju kod riba nekih drugih rodova (JADRIĆ et al. 1971-d, 1971-e).

ZAKLJUČAK

Elektroforetska analiza proteina i lipoproteina seruma *Chondrostoma phoxinus* (podbile) je izvršena na 2%-tnom agarom gelu.

Kvantitativna denzitometrijska analiza je pokazala dosta veliku podudarnost sa podacima dobivenim elektroforezom na papiru. Srednje vrijednosti proteinskih frakcija pokazuju predominaciju albumina i beta globulina.

Više od dvije trećine lipoproteinskog materijala se može dokazati u sastavu brže komponente lipoproteina.

AGAR GEL ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF SERUM PROTEINS AND LIPOPROTEINS IN *CHONDROSTOMA PHOXINUS*

Summary

Electrophoretic analysis of proteins and lipoproteins in the sera of *Ch. phoxinus* was performed in 2% agar gel, with subsequent densitometric analysis.

The mean values of protein fraction in 20 specimens were as follows: Albumin 45,84%, alpha-globulins 10,85%, alpha-2 globulins 13,37%, and beta globulins 29,94%. Gamma globulin fraction was not found.

Lipoproteins were fractionated in two principal components: fast lipoprotein (»lipalbumin«) with mean concentration of 67,7%, and slow fraction of alpha-2 mobility whose relative concentration was 32,3% in average.

LITERATURA

- ABINUN A., WINTERHALTER M., JADRIĆ S., MILADINović Z., TANACKOVIĆ F., BERIĆ B., VUKOVIĆ T.: »Upoređenje imunoelktroforetskih svojstava serumskih proteina *Salmo marmoratus* i *Salmothymus obusirostris*« I. Jugoslavenski simpozijum iz sistematike, Sarajevo, 29 (1971).
- ALTUNOV JU. P., NEFJODOV G. N.: »A study of blood serum protein composition by agar gel electrophoresis in marinus and mentella types of redfish« ICNAF Res. Doc. 67, 1—9 (1967).
- BARON J.-C.: »Etude preliminaire sur le sang de deux especes de Sardinelles« Centre de recherches oceanographique. Republique de Cote d'Ivoire (1968).
- BRKIĆ R.: »Ispitivanje serumskih proteina riba rodova *Chondrostoma* i *Paraphoxinus* elektroforezom na papiru«, magistarski rad (1972).
- IPATOV V. I.: »Dinamika bjelkov syvorotki krovi baltijsko Treski *Gadus morlua calarias* L. v zavisimosti ot zrelosti polovih produktov i sezona« Vopr. ihtiologii 10, 802—806 (1970).
- JADRIĆ S., PERIĆ B., WINTERHALTER M., ABINUN A., TANACKOVIĆ F., VUKOVIĆ T.: Elektroforetska analiza proteina i lipoproteina seruma riba na agarom gelu« Arhiv za farmaciju 21, 117—120 (1971-a).
- JADRIĆ S., ABINUN A., TANACKOVIĆ F., WINTERHALTER M., PERIĆ B., VUKOVIĆ T.: »Komparativna analiza relativnih koncentracija proteinskih frakcija u serumu riba roda *Paraphoxinus* elektroforezom na agarom gelu« I. Jugoslavenski simpozijum iz sistematike, Sarajevo, 32 (1971-b).
- JADRIĆ S., PERIĆ B., WINTERHALTER M., ABINUN A.: »Upotreba modificirane denzitometrijske metode u kvantitativnoj analizi elferograma na agarom i akrilimidnom gelu«. Bilten K. O. fizičara za med. fiziku 8, 7 (1971-c).
- JADRIĆ S., PERIĆ B., ABINUN A., WINTERHALTER M., TANACKOVIĆ F., VUKOVIĆ T.: »Promjene u elektroforetskoj slici proteina i lipoproteina nekih endemskih slatkovodnih riba u toku stajanja seruma na +4 °C« Zbornik III Kongresa medicinskih biokemičara Jugoslavije (1971-d).
- JADRIĆ S., ABINUN A., PERIĆ B., WINTERHALTER M., TANACKOVIĆ F.: »Changes in agar gel lipoproteinogram of stored human and fish sera« Protides of the Biological Fluids. Abstr. XIX Colloquium, 76 (1971-e).
- KALUĐERČIĆ M., KALUĐERČIĆ D., VUKOVIĆ T., PAVLIĆ S.: »Serum proteini nekih ciprinidnih vrsta riba« III Kongres biologov Jugoslavije. Knjiga plenarnih referatov in povzetkov. Ljubljana (1969).
- KALUĐERČIĆ M., KALUĐERČIĆ D., KOSORIĆ Đ., VUKOVIĆ T.: »Białka surowicy niekatorych słodkowodnych ryb Bośni i Hercegowiny« VII Zjazd hydrobiologov polskich. Streszczenia referatov. 60—61 (1970).
- LEWIS J. H.: »Studies on the plasma proteins of various vertebrates« u: Peeters H. (Ed.): »Protides of the Biological Fluids« Vol. 12, 149—154, 1964. (1965).
- NIKOLIĆ V.: neobjavljeni podaci (1972).
- SCHEIDEGGER J. J.: »Une micro-methode de l'Immuno-electrophorese« Int. Arch. Allergy 7, 103—110 (1955).
- WINTERHALTER M., JADRIĆ S., MILADINović Z., TANACKOVIĆ B.: »Elektroforetska i imunoelktroforetska analiza proteina i lipoproteina seruma Neretvanske glavatice (*Salmo marmoratus* Cuv.) Zbornik VII Kongresa fiziologa Jugoslavije, Beograd, 183 (1971).