

# PABERELEKTROFOREES JA NEUTRAALSETE SOOLADEGA VÄLJASOOLAMISE MEETODID KALADE VERESEERUMI VALKUDE UURIMISEL

L. Seppa

Organismi füsioloogiliste näitajate uurimisel on eriline tähtsus sisekeskkonna vedelikel verel ja lümfil. Et vereseerum on valguliste ainete poolest eriti rikas (käesoleva ajani on avastatud ja kirjeldatud üle 80 valgulise komponendi (Todorov 1963)), siis on füsioloogide suur huvi selle kehavedeliku vastu täiesti põhjendatud.

Vereseerumi valgulise koostise määramisega on tegelnud paljud uurijad nii kliinilistel kui ka füsioloogilistel eesmärkidel. Lähtudes mitmetest nii praktilist (töömaht, aparatuuri lihtsus ja kättesaadavus, kemikaalide hind ja kättesaadavus) kui teoreetilist (andmete täpsus ja usaldatavus, teatud fraktsioonide eriline esiletoomine jne.) laadi kaalutlustest, on kasutatud ühe ja sama analüüsi läbiviimiseks väga erinevaid meetodeid. Ka suurema täpsuse ja mitmekülgsuse huvides on vaja katsetada erisuguseid uurimismeetodeid, et leida uuritava objekti jaoks ja püstitatud eesmärgi saavutamiseks sobivaim.

Meie vabariigis on kalade vereseerumi uurimiseks kasutatud paberelektroforeesi meetodit (TA ZBI, A. Kirsipuu), teisi valkude uurimise meetodeid (näit. väljasoolamine) aga mitte. Mainitud meetoditega saadud tulemuste võrdlemine on aga vajalik otstarbeka meetoodika valimiseks edaspidisteks füsioloogilisteks uurimisteks.

## Materjal ja meetodid

Analüüsiks kasutatud kalad püüti Võrtsjärvest võrkude ja mõrdadega 1964. a. suvel ning 1965. a. märtsi- ja aprillikuus. Üldse analüüsiti 65 kala, nendest 39 haugi, 5 koha, 8 latikat, 9 lutsu, 1 ahven ja 3 säinast. Seerumi saamiseks vajalik veri võeti kalade südamest klaaspipeti abil.

Vereseerumi valkude uurimiseks kasutati paralleelselt kolme meetodit: paberelektroforeesi, Wolfsoni, Cohni, Calvary ja Ishiba

kirjeldatud neutraalsete sooladega väljasoolamise meetodit (Petrunkina 1961) ja Karpjuki kirjeldatud väljasoolamise ekspressmeetodit (Karpjuk 1962).

Vereseerumi valkude elektroforeetiline uurimine toimus filterpaberiribade vertikaalse asetusega elektroforeesikambris A. Kirsi-puu (1965) kirjeldatud meetodil. Elektroforeesil eraldus 4—6 fraktsiooni: albumiinid (1—2),  $\alpha$ -globuliinid (1—2),  $\beta$ -globuliinid (1—2) ja  $\gamma$ -globuliinid.

Wolfsoni jt. esitatud biureetreaktsioonil põhinev valkude määramise meetod on vene keeles avaldatud A. M. Petrunkina poolt 1961. a. Andmeid selle välismaal küllaltki levinud väljasoolamismeetodi rakendamise kohta Nõukogude Liidus autor ei leidnud.

Ekspressmeetodi kirjeldus ilmus esmakordselt 1955. a. J. C. Aulli ja W. M. McCordi sulest. 1962. a. täiendas ja kirjeldas meetodit S. A. Karpjuk, keda huvitas kiire ja aparatuuri suhtes vähenõudliku meetodi kasutatavus kliiniliseks otstarbeks (Karpjuk 1962).

### Töö tulemused ja nende analüüs

Lähtudes tabelis 1 esitatud andmetest, täheldame küllaltki märgatavaid liigilisi erinevusi üksikute fraktsioonide valgusisalduse osas. Lisaks sellele esinevad ka määramismeetodist tingitud kindlasuunalised muutused.

Enamiku liikide kohta saadud andmed näitavad, et albumiinide ja  $\gamma$ -globuliinide osas annavad kõik kolm vaatluse all olnud meetodit lähedasi tulemusi.  $\alpha$ - ja  $\beta$ -globuliinide osas on paberelektroforeesi ja Wolfson-Cohn-Calvary-Ishiba meetodiga saadud tulemused vastupidised: paberelektroforeesi andmetel on suurimaks  $\alpha$ -globuliinide, Wolfsoni jt. meetoditega aga  $\beta$ -globuliinide fraktsioon.

Lähtudes erisuguste meetodite andmetest  $\alpha$ - ja  $\beta$ -globuliinide kohta, võib oletada, et nende vahel eksisteerib veel mingi fraktsioon, mille täielikuks eraldamiseks ei ole käesolevad meetodid küllaldased. Seetõttu ta liitub kord ühe, kord teise valgufraktsiooniga, olenevalt analüüsimeetodist. Imetajate ontogeneesis on täheldatud valgufraktsioonide liikuvuse vähenemist. See võib viidata analoogilisele protsessile ka fülogeneesis, s. t. areng kulgeb fraktsioonide liikuvuse vähenemise suunas. Et kalade vereseerumi valgufraktsioonide iseloomustamisel on lähtutud inimese vereseerumi fraktsioonide arvust, arvestamata liikide süstemaatilist asendit loomariigis, on täiesti võimalik, et tegelikult on kaladel vereseerumi valgufraktsioonide arv suurem kui inimesel ja tuleb leida teid nende täpsemaks eraldamiseks ja määramiseks.

Ekspressmeetod annab  $\alpha$ - ja  $\beta$ -globuliinide osas küllaltki labiilsed ja teiste meetodite suhtes vahepealsed tulemused.

Vereseerumi valkude protsendiliste suhete sõltuvus kala liigist, soost ja uurimismeetodist

Fraktsioon	Liik	H a u g			K o h a			A h v e n	
	Mee- tod Sugu	Elektro- forees	Wolfson- Cohn	Ekspress	Elektro- forees	Wolfson- Cohn	Ekspress	Elektro- forees	Wolfson- Cohn
Album.	♀	19,24 (25)	35,33 (5)	30,43 (7)	38,53 (1)	30,14 (2)	—	—	34,29 (1)
	♂	22,26 (6)	31,40 (1)	—	40,60 (1)	28,75 (1)	—	—	—
α-glob.	♀	48,70 (25)	11,99 (5)	26,57 (7)	42,49 (1)	25,04 (2)	—	—	10,00 (1)
	♂	46,96 (6)	34,88 (1)	—	—	—	—	—	—
β-glob.	♀	19,21 (25)	34,06 (5)	18,93 (7)	10,20 (1)	25,79 (2)	—	—	40,71 (1)
	♂	18,06 (6)	22,09 (1)	—	—	—	—	—	—
γ-glob.	♀	12,85 (25)	18,62 (5)	24,07 (7)	8,78 (1)	19,03 (2)	—	—	15,00 (1)
	♂	11,72 (6)	11,63 (1)	—	5,67 (1)	—	—	—	—
Album.	♀ ♂	S ä i n a s			L a t i k a s			L u t s	
		Elektro- forees	Wolfson- Cohn	Ekspress	Elektro- forees	Wolfson- Cohn	Ekspress	Elektro- forees	Wolfson- Cohn
Album.	♀	36,72 (2)	—	—	22,10 (2)	—	—	19,17 (3)	39,19 (1)
	♂	—	14,75 (1)	27,41 (1)	27,90 (3)	—	45,81 (2)	22,30 (5)	34,33 (1)
α-glob.	♀	42,35 (2)	—	—	41,34 (2)	—	—	52,74 (3)	17,57 (1)
	♂	—	13,11 (1)	49,03 (1)	35,81 (3)	—	30,89 (2)	53,58 (5)	10,45 (1)
β-glob.	♀	—	—	—	25,74 (2)	—	—	28,09 (3)	22,97 (1)
	♂	10,99 (1)	59,02 (1)	15,06 (1)	24,45 (3)	—	16,60 (2)	24,12 (5)	47,76 (1)
γ-glob.	♀	—	—	—	10,82 (2)	—	—	0,00 (3)	20,27 (1)
	♂	3,58 (1)	13,12 (1)	8,50 (1)	(11,83 (3))	—	6,70 (2)	0,00 (5)	7,46 (1)

Märkus: Arvude taga sulgudes on analüüsitud isendite arv.

Kõigil käesoleva artikli autori poolt kasutatud meetodeil on praktilise kasutamise seisukohalt nii puudusi kui ka häid külgi. Eriti sobiv kalade vereseerumi valkude uurimiseks on elektrofoores, sest analüüsiks vajalik seerumi hulk on väike ja juba umbes 15 cm pikkustelt kaladelt kättesaadav. Võrreldes Wolfson-Cohni ja ekspress-meetodiga on analüüs elektrofooresimeetodil väga pikaajaline (12—16 t.), kuid protsessi kulgemise aega saab uurija kasutada mitmesuguste kõrvaltööde läbiviimiseks. Sama meetodi puuduseks on ka üsna kallis aparatuur, puhverlahuste valmistamiseks vajalike kemikaalide raske kättesaadavus ja nende kõrge hind, kromatograafilise paberi halb kvaliteet.

Wolfsoni jt. meetodi läbiviimiseks kulub küll vähem aega kui elektrofooresiks, kuid see aeg on täidetud suurt tähelepanu nõudva pingelise tööga, kusjuures analüüsides arv on küllaltki piiratud, olenedes uurija käsutuses olevast aparatuurist (näit. tsentrifuug) ja mõõtmiskiirusest. Reaktiivide suure hulga ja analüüsimiseks vajalike laboratooriumitarvete tõttu ei ole meetod sobiv välitöödel kasutamiseks. Samuti ei sobi meetod piiratud analüüsides arvu ja suure töömahu tõttu massiliste analüüsides läbiviimiseks.

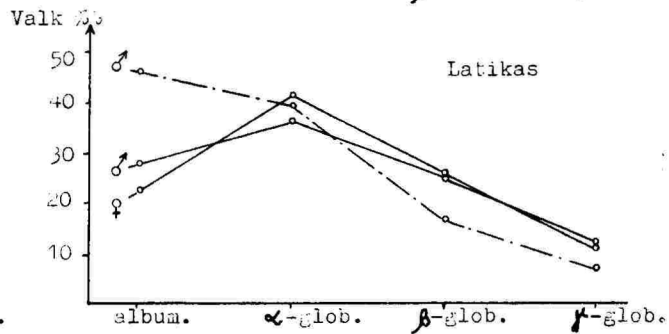
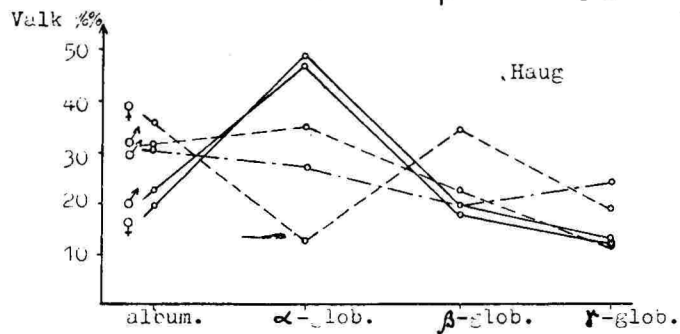
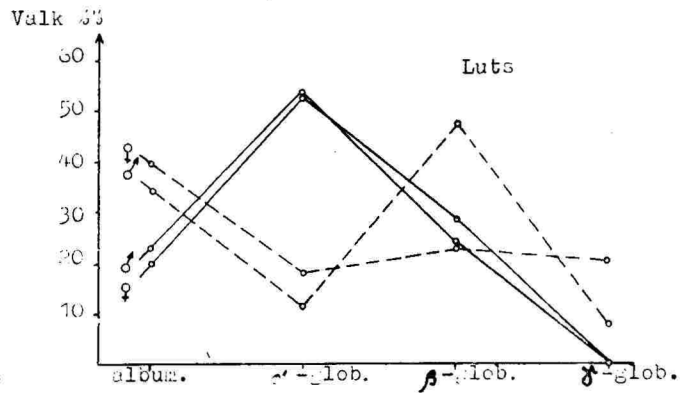
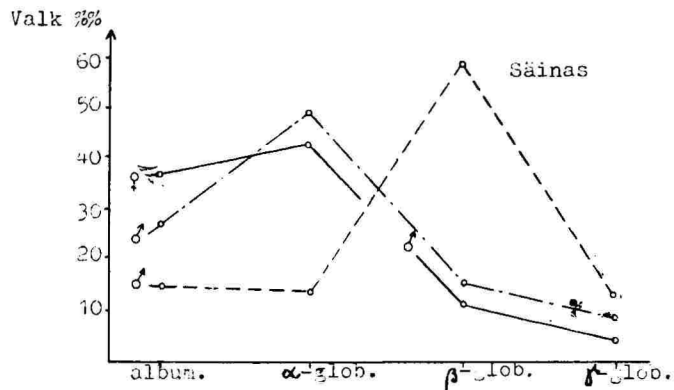
Massiliste analüüsides läbiviimiseks on sobivaim Karpjuki kirjeldatud vähese töömahuga ekspress-meetod, mis ei vaja keerukat aparatuuri, kättesaamatuid reaktiive ega pikka analüüsiaega. Ainsaks raskusi tekitavaks asjaoluks on analüüsiks vajaliku seerumi hulk (0,5 ml), mille saamine keskmise suurusega või väiksemalt kaladelt on kaunis raske.

Valgu üldhulga otsest määramist kalibreerimiskõveralt või

Tabel 2

Valgu üldhulga (g%) sõltuvus kala liigist, soost ja uurimismeetodist

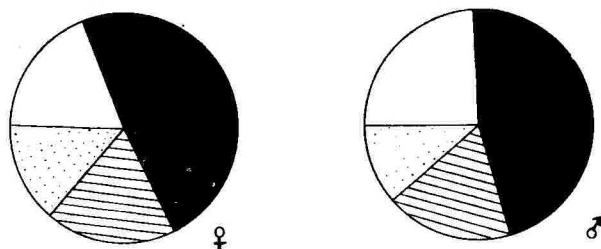
Liik	Sugu	Keskmine valgu hulk (g%)	
		Refraktomeetria	Wolfson-Cohn
Haug	♀	6,77 (31)	6,17 (15)
	♂	7,87 (7)	6,10 (1)
Koha	♀	6,53 (1)	7,20 (3)
	♂	9,35 (1)	5,67 (1)
Säinas	♀	5,54 (1)	—
	♂	7,27 (1)	4,33 (1)
Latikas	♀	7,15 (3)	5,71 (2)
	♂	6,32 (5)	4,33 (1)
Luts	♀	9,29 (4)	5,32 (3)
	♂	7,93 (5)	5,33 (2)



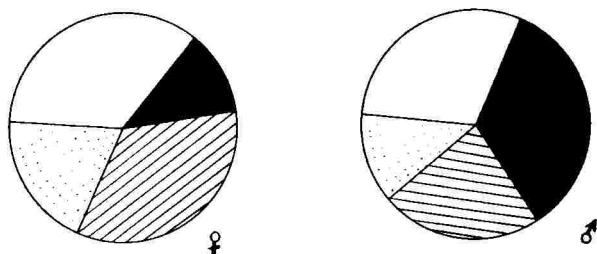
Joonis 1. Erinevatel meetoditel määratud keskmine valgu hulk fraktsioonides. — elektroforese, --- Wolfson-Cohn; -.-.- ekspress-meetod.

maldas kasutatud meetoditest ainult Wolfsoni jt. meetod. Teiste meetodite puhul määrati refraktomeetriga PЛ-2 seerumi murdumisnäitaja ja leiti sellele vastav valgu absoluutne hulk (g%) empiirilisest tabelist (Travina 1955). Nagu näeme tabelist 2, on seerumi murdumisnäitaja alusel saadud tulemused keskmiselt 13,5% kõrgemad Wolfson-Cohni meetodil saadud väärtustest.

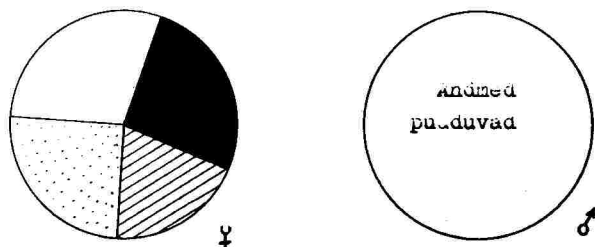
Andmete võrdlemisel on käesolevas töös kasutatud fraktsioonide protsendilisi suhteid. Erinevatest meetoditest piltlikuma ülevaate saamiseks on võrdlevad andmed koondatud joonisele 1 ja esitatud haugi (suurim analüüsitud isendite arv) vereseerumi



Faberelektroforeesi meetod



Wolfson-Cohn-Calvary-Ishiba meetod



Ekspress-meetod

Joonis 2. Valgufraktsioonide protsendilised suhted haugi vereseerumis erinevate analüüsimeetodite andmetel.

fraktsioonide võrdlev diagramm joonisel 2. Kõverate võrdlemisel näeme, et albumiinide osas on kõigi meetodite puhul saadud üsna lähedased keskmised tulemused. Hoopis teine pilt on globuliinide osas. Kui elektroforeesi andmetel on kõikide liikide puhul suuri maks fraktsiooniks  $\alpha$ -globuliinid, siis Wolfsoni jt. meetodi andmetel on  $\alpha$ -globuliinide hulk madalam isegi albumiini hulgast. Seevastu osutub valgurikkaks  $\beta$ -globuliinide fraktsioon, mis mõnel juhul ületab isegi albumiinide hulga ja läheneb enam-vähem paberelektroforeesil saadud  $\alpha$ -globuliinide hulgale.  $\gamma$ -globuliinide osas annab kõrgemad näidud Wolfson-Cohni meetod, teised kaks annavad omavahel lähedasi tulemusi.

Ka teiste paberelektroforeesi ja Wolfson-Cohni meetodit paralleelselt kasutanud autorite (Eriksen jt. 1956) andmetel saadi albumiinide osas väga hästi ühtivaid tulemusi,  $\gamma$ -globuliini osas hästi ühtivaid,  $\alpha$ - ja  $\beta$ -globuliini osas aga erinevaid tulemusi.

Ekspress-meetodil saadud tulemused on kahe eelmise meetodi tulemuste vahepealsed. Oma 1962. a. ilmunud artiklis väidab S. Karpjuk, et kirjeldatud ekspress-meetod annab paberelektroforeesiga võrreldes tunduvalt erinevaid tulemusi, kuid omavaheliseks võrdluseks ja vereseerumis toimuvate muutuste tuvastamiseks olevat ekspress-meetodil saadud andmed täiesti kasutatavad.

Kasutatud meetoditest andis kõige stabiilsemaid tulemusi paberelektroforeesi meetod. Wolfson-Cohn-Calvary-Ishiba ja ekspress-meetodi tulemuste stabiilsus on enam-vähem võrdne, autori arvates aga mitterahuldav.

### Järeldused

1. Käesolevas töös kasutatud paberelektroforeesi, Wolfson-Cohn-Calvary-Ishiba ja ekspress-meetod annavad kalade vereseerumi uurimisel erinevaid tulemusi.

2. Albumiinide ja  $\gamma$ -globuliinide osas annavad nimetatud meetodid lähedasi tulemusi.

3.  $\alpha$ -globuliinide ja  $\beta$ -globuliinide osas annavad paberelektroforeesi ja Wolfson-Cohn-Calvary-Ishiba meetodid vastupidiseid tulemusi: paberelektroforeesil on suurimaks valgufraktsiooniks  $\alpha$ -globuliinid, Wolfson-Cohn-Calvary-Ishiba meetodil  $\beta$ -globuliinid. Ekspress-meetodil on  $\alpha$ - ja  $\beta$ -globuliinide hulk peaaegu võrdne.

4. Lutsu vereseerumi elektroforeesil  $\gamma$ -globuliinid ei eraldunud, kuid fraktsioneerimisel Wolfson-Cohn-Calvary-Ishiba meetodil eralduvad  $\gamma$ -globuliinid hästi.

5. Valgu üldhulga ( $g\%$ ) refraktomeetrilisel määramisel saadakse kõrgem valgu hulk kui Wolfson-Cohn-Calvary-Ishiba meetodil.

6. Kalade vereseerumi uurimisel võib omavahel võrrelda ainult ühel ja samal meetodil saadud andmeid.

Eriksen, N., Ellerbrook, L., Lippincott, S., 1956. Serum Protein Analysis by Electrophoresis and by the Wolfson-Cohn Chemical Method. — Clin. Chem., 2, Nr. 5. : 334—346.

Карпюк С. А. 1962. Определение белковых фракций сыворотки крови экспресс-методом. «Лаб. Дело», 7.

Кирсипуу А. 1965. О белковых фракциях сыворотки крови некоторых промысловых рыб Эстонии. Автореферат дисс. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук. Тарту.

Петрункина А. М. 1961. Практическая биохимия. М.

Тодоров И. 1963. Клинические лабораторные исследования и педиа-трии. София.

Травина О. В. 1955. Руководство по биохимическим исследованиям. М.

## О СРАВНЕНИИ МЕТОДОВ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА БУМАГЕ И ВЫСАЛИВАНИЯ НЕЙТРАЛЬНЫМИ СОЛЯМИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ РЫБ

Л. Сеппа

Резюме

В настоящей работе были использованы три параллельных метода: 1) электрофорез на бумаге, 2) метод высаливания, описанный Вольфсоном, Коном, Кальвари и Ишиба, и 3) экспресс-метод, описанный Карпюком. Нашей задачей было выяснение пригодности этих методов при изучении белков сыворотки крови рыб.

Материалом послужили анализы крови 65 рыб следующих видов: 39 щук, 5 судаков, 8 лещей, 9 налимов, 1 окунь и 3 язя. Рыбы были выловлены из оз. Выртсъярв с августа 1964 г. по апрель 1965 г.

В отношении альбуминов и  $\gamma$ -глобулинов эти три метода дали близкие результаты. В отношении  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинов они дали различные результаты. По данным, полученным электрофорезом на бумаге, самой большой фракцией оказались  $\alpha$ -глобулины, а по данным метода Вольфсона—Кона  $\beta$ -глобулины. По экспресс-методу количества  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинов оказались почти равными.

Общее количество белков в сыворотке (в %) фиксировалось как методом Вольфсона—Кона, так и при помощи рефрактометра. Рефрактометр дал более высокое содержание белка, чем метод Вольфсона—Кона—Кальвари—Ишиба.

Электрофорез на бумаге обеспечил более стабильные результаты. Стабильность метода Вольфсона—Кона—Кальвари—Ишиба и экспресс-метода более или менее одинаковая, но на наш взгляд неудовлетворительная. При изучении сыворотки крови рыб можно использовать данные, полученные только одним и тем же методом.

# PAPER ELECTROPHORESIS AND METHODS OF SALTING OUT BY NEUTRAL SALTS IN THE SERUM PROTEIN STUDIES OF FISH

L. Seppa

## Summary

In the present paper three parallel methods were used: 1) paper electrophoresis, 2) the method of salting out by neutral salts described by Wolfson, Cohn, Calvary and Ishiba and 3) the express-method of salting out described by S. Karpjuk. The aim was to elucidate the suitability of the mentioned methods in the serum protein studies of fish.

65 fish, of them 39 pikes, 5 pike-perches, 8 breams, 9 burbot, 1 perch and 3 ides were analyzed. The studied material was caught in Lake Vörtsjärv from August 1964 till April 1965.

As regards the albumins and  $\gamma$ -globulins the three methods provided similar results. Big differences could be observed as regards the  $\alpha$ -globulins and  $\beta$ -globulins. According to the data achieved by paper electrophoresis the biggest fraction was that of  $\alpha$ -globulins while according to Wolfson-Cohn's method it was the fraction of  $\beta$ -globulins. The amount of  $\alpha$ - and  $\beta$ -globulins was almost equal when using the express-method.

The total amount of proteins in the serum (g%) was fixed refractometrically and by Wolfson-Cohn's method. The refractometrical method gave a higher protein content than Wolfson-Cohn-Calvary-Ishiba's method.

Paper electrophoresis provided the stablest results. The stability of Wolfson-Cohn-Calvary-Ishiba's method and that of the express-method was more or less equal but unsatisfactory in our opinion. Only data achieved by the same method may be compared in the blood serum studies of fish.