

# ПРОТЕОМНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВ В ОБРАЗЦАХ СВИНИНЫ И ВЫРАБОТАННЫХ ИЗ НЕЕ МЯСНЫХ ПРОДУКТАХ

Л. И. Ковалев, С. С. Шишкин, М. А. Ковалева, А. В. Иванов,  
ФГБУ Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН  
Н. Л. Вострикова, канд. техн. наук, И. М. Чернуха, доктор техн. наук,  
ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова Россельхозакадемии

Проведен протеомный анализ белков в образцах свиного сырья, а также функциональных мясных продуктах, изготовленных на их основе. Масс-спектрометрическими методами идентифицировано 55 белков, включая несколько тканеспецифичных, которые могут быть использованы как потенциальные биомаркеры при анализе мясной продукции. Полученные результаты использованы при построении информационного модуля «Белки скелетной мышцы свиньи (*Sus scrofa*)» в отечественной базе данных «Протеомика мышечных органов».

→ Протеомные исследования белков в мышечных органах свиней (*Sus scrofa*) представляют значительный интерес по многим причинам, важнейшей из которых является ключевая роль этих животных при производстве мяса и мясных продуктов во многих странах мира [1]. Кроме того, в качестве существенных оснований для развития протеомного анализа свиных белков отмечают широкие возможности использования данного вида животных в изучении разнообразных биомедицинских проблем. Активизация в 21-ом веке разработок функциональных и, в частности, функциональных мясных продуктов (ФМП) способствовала увеличению внимания к различным органам свиней, содержащим поперечно-полосатые и гладкомышечные волокна, как к потенциальному сырью для ФМП [2]. Соответственно, протеомика приобретает особое значение для определения качества (по белковому составу) свиного сырья, включая влияние посмертного автолиза [3].

В данной статье представлены результаты протеомного исследования белков в образцах свиного сырья (скелетных мышцах, сердца и аорты), а также функциональных мясных продуктах, изготовленных на основе свиного сырья. Работа выполнялась в соответствии с заданиями Государственного контракта № 14.512.11.0038 по теме: «Разработка комплекса биотехнологических методов контроля качества пищевых продуктов, в том числе включающих использование протеомных технологий с апробацией их нановь созданных функциональных мясных продуктах».

## Материалы и методы

В работе исследовали следующие препараты свинины: образцы скелетных мышц, взятые вскоре (2-3

час) после забоя животных (М-1) или прошедшие 96 часов автолиза (М-2); образцы сердечной мышцы, взятые вскоре (2-3 час) после забоя животных (С-1) или прошедшие 96 часов автолиза (С-2); образцы аорты прошедшие 96 часов автолиза (Ар-2). Автолиз изучавшихся образцов проходил 4 суток. ФМП изготавливались в виде паштетов, основную долю в которых (до 65%) составляла свинина.

Для придания специфических функциональных свойств при изготовлении ФМП использовалась свинина, специально полученная от животных, перенесших экспериментально вызванный геморрагический инсульт по разработанной ранее методике [4]. При этом было изготовлено три варианта ФМП-1: а) до 10% свинины заменяется добавкой 2% гидролизата куриного белка (ФМП-1а); б) 2% гидролизата куриного белка добавлено без замены свинины (ФМП-1б); в) свинина без добавки гидролизата (ФМП-1в). Кроме того, в качестве контроля изготавливается паштет из обычной (без геморрагического инсульта) свинины (ФМП-1к). В качестве функционального ингредиента - гидролизата куриного белка, был выбран и отдельно изучался коммерческий препарат НСР-Р-150 (фирма «Poliver», Бельгия). Все указанные биоматериалы были получены (и/или произведены) в ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова.

В качестве основных протеомных технологий применяли различные модификации двумерного электрофореза по O`Farrell с изоэлектрофокусированием в амфолиновом (IEF-PAGE) или иммобилиновом (IPG-PAGE) градиентах pH [5, 6]. Детекция белков на гелевых пластинах проводилась окрашиванием Кумасси R-250, а также с использованием азотнокислого серебра. Полученные цифровые изобра-

УДК 637.5.045:577.21

**Ключевые слова:** свинина, протеомика, мышечные белки, биомаркёры.

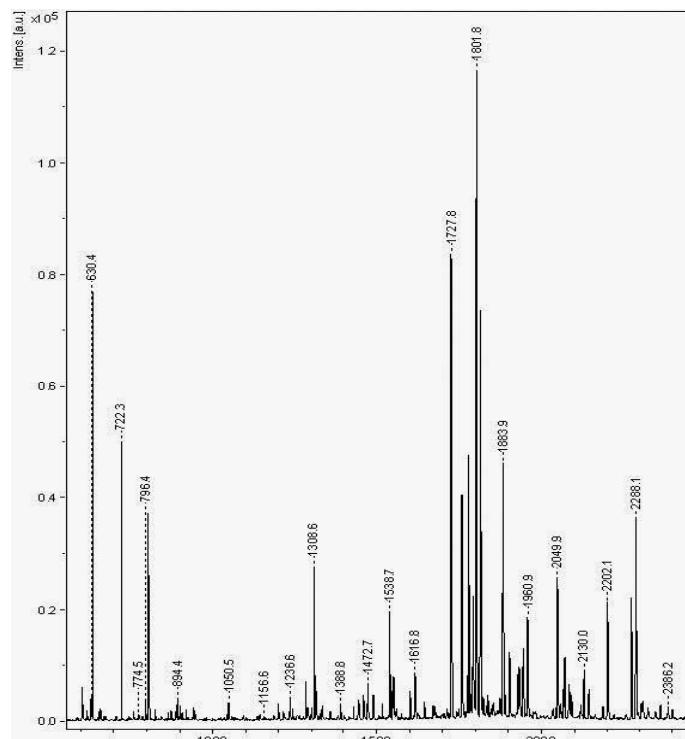
жения редактировали в графическом редакторе из пакетов программ ImageMaster 2D Platinum версия 7 («GE Healthcare», Швейцария).

Идентификацию белковых фракций на ДЭ проводили после трипсинолиза методами MALDI-TOF MS и MS/MS масс-спектрометрии на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex («Bruker», Германия) с УФ-лазером (336 нм) в режиме положительных ионов в диапазоне масс 500-8000 Да с калибровкой их по известным пикам автолиза трипсина. Анализ полученных масс-спектров триптических пептидов выполняли с помощью программы Mascot, опция Peptide Fingerprint («Matrix Science», США), с точностью определения массы МН<sup>+</sup> равной 0,01%, осуществляя поиск по базам данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI).

Формирование информационного модуля «Белки скелетной мышцы свиньи (*Sus scrofa*)» осуществляли с помощью пакета управляющих программ, имеющихся в отечественной базе данных «Протеомика мышечных органов» (<http://mp.inbi.ras.ru>).

### Результаты и обсуждение

Фракционирование двумя модификациями двухмерного электрофореза с изоэлектрофокусированием в амфолиновом (IEF-PAGE) или иммобилиновом (IPG-PAGE) градиентах pH белковых экстрактов из образцов свиного сырья обеспечило получение от нескольких десятков до сотни белковых фракций, окрашиваемых Кумасси R-250. Эти фракции располагались в широком диапазоне молекулярных масс (Мм) и изоэлектрических точек (рI). В частности, некоторые фракции обладали Мм со значениями более 150 кДа, а другие – около 10 кДа.



**Рисунок 1. Масс-спектр триптических пептидов, полученный при MALDI-TOF MS идентификации фракции α-тропомиозин *Sus scrofa***

Проведенный протеомный анализ позволил четко выявить зоны расположения фракций ряда структурных мышечных белков – миозинов, актинов и тропомиозинов.

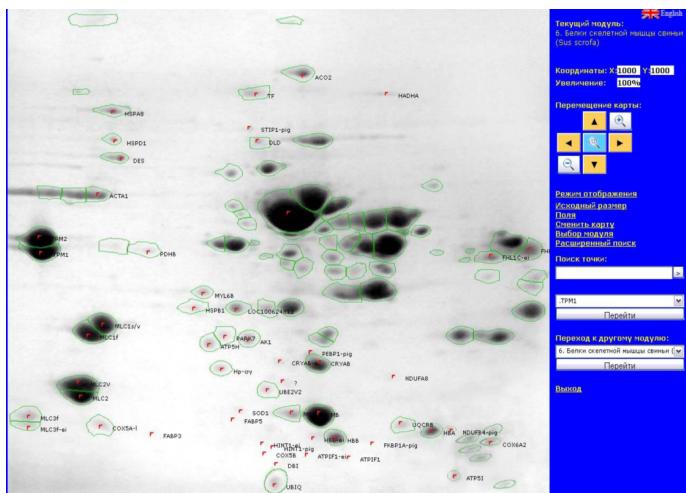
В качестве примера на рисунке 1 представлены результаты масс-спектрометрической идентификации α-тропомиозина, которые дали достаточно высокие показатели Score / № match peptides - 155/24 (часто используют в англоязычной литературе обозначения: Score – показатель соответствия или «счет очков», № match peptides – количество совпадавших пептидов), а также показатель «coverage» – 58% (% покрытия выявленными триптическими пептидами всей последовательности идентифицируемого белка). При этом надо отметить, что для идентифицированной фракции экспериментально определенные значения Мм в кДа и рI оказались также весьма близкими к расчетным данным (33,5/4,71 и 32,7/4,71, соответственно).

Сравнение протеомных профилей свидетельствует, что модификации IPG-PAGE и IEF-PAGE выявляли почти одинаковое распределение фракций, принадлежащих актинам, тропомиозинам и миозиновым легким цепям. Вместе с тем количественная представленность актина на ДЭ, полученной при IPG-PAGE, оказалась существенно большей, чем у той же фракции, полученной при IEF-PAGE. По-видимому, причиной этого различия стала стартовая агрегация белков, след которой наблюдается на левом краю IEF-PAGE ДЭ.

В тоже время видно, что в центральной и правой частях IEF-PAGE ДЭ регистрировалось много больше фракций, чем на IPG-PAGE ДЭ. Специально проведенные измерения показали, что при проведении изоэлектрофокусирования в стандартных условиях на стрипах с иммобилиновым градиентом pH 3-10 не удается обеспечивать разделение (и последующее выявление) белков с рI  $\frac{24}{12}$  6,2-6,5. В связи с этим далее в большинстве протеомных анализов использовали описанную ранее, собственную модификацию Д-ЭФ, включающую изоэлектрофокусирование в амфолиновом градиенте pH [5].

Сравнение ДЭ анализируемых образцов разных видов мясного сырья показало, что для каждого из этих видов имеются характерные особенности в распределениях фракций миозиновых легких цепей и особенно тропомиозинов. Таким образом, указанные белковые фракции, очевидно, можно рассматривать как потенциальные биомаркеры.

Надо отметить также, что в образцах сырья, прошедших 96-часовой автолиз, при протеомном анализе на фоне достаточно сохранных белковых профилей удавалось выявлять (при окраске нитратом серебра) фракции тяжелых миозиновых цепей, которые обычно отсутствовали на ДЭ образцов свежих мышц. Соответственно, можно сделать заключение о том, что, с одной стороны, проведенный 94-часовой автолиз не привел к ярким протеолитическим повреждениям мажорных мышечных белков, а, с другой стороны, этот процесс способствовал солубилизации высокомолекулярных белков – миозиновых тяжелых цепей.



**Рисунок 2. Общий вид информационного модуля «Белки скелетной мышцы свиньи (*Sus scrofa*)» базы данных «Протеомика мышечных органов» БД «ПМО»**

Существенно иные результаты были получены при протеомном анализе ФМП. На полученных ДЭ обнаруживались многочисленные и разнообразные проявления деградации мышечных белков. Однако, несмотря на это, всё же достаточно четко выявлялись фракции актинов, тропомиозинов и миозиновых легких цепей. Кроме того, проведенный протеомный анализ показал присутствие в этих образцах ряда белковых фракций с  $M_r > 72$  кДа (особенно при окраске нитратом серебра). Как следствие, полученные результаты дают основания для того, чтобы рассматривать фракции актинов, тропомиозинов и миозиновых лёгких цепей как потенциальные биомаркёры, пригодные для характеристики качества ФМП.

В соответствии с общей стратегией протеомных исследований для обеспечения дальнейшего применения протеомных технологий при анализе образцов свиного мясного сырья и изготавливаемых из него продуктов представлялось необходимым формирование специального отечественного биоинформационного ресурса, подобного описанному ранее [7]. В качестве первых шагов в указанном направлении была построена синтетическая двумерная карта белков скелетной мышцы *Sus scrofa*, как ранее описывалось для скелетной мышцы человека [5] и проведена идентификация 55 мажорных белковых фракций на ДЭ мышечных белков *Sus scrofa*. Среди идентифи-

цированных белков оказались основные участники мышечного сокращения (миозины, актин, тропомиозины), ферменты гликолиза и других метаболических процессов (альдолаза, дигидролипоилдегидрогеназа, NADH-дегидрогеназы и другие ферменты митохондрий), белки теплового шока, а также новый белок (гипотетический белок, содержащий кристаллический домен, продукт гена из локуса LOC494560).

Полученные результаты протеомного изучения были суммированы и использованы при построении информационного модуля «Белки скелетной мышцы свиньи (*Sus scrofa*)» в отечественной базе данных «Протеомика мышечных органов» (<http://mp.inbi.ras.ru>). Эта многомодульная, четырехуровневая база данных выполнена в виде интерактивного web-ресурса на основе СУБД MySQL.

Основой модуля «Белки скелетной мышцы свиньи (*Sus scrofa*)» стала описанная выше синтетическая двумерная карта, на которой показаны белки, идентифицированные с помощью масс-спектрометрии и других методов (первый информационный уровень). При этом на карте помечены все идентифицированные белки на картах путем создания специальных ссылок («кнопок») для перехода на следующие информационные уровни – второй, третий и четвертый, которые предназначены для различных сведений об указанных белках. Доступ к соответствующим уровням происходит под визуальным контролем. Далее на втором информационном уровне представлены собственные данные, полученные при изучении свойств каждого из идентифицированных белков, на третьем уровне собраны различные литературные сведения об этом белке и имеются гиперссылки, связывающие описание белка в модуле с соответствующими записями в публичных базах данных NCBI и UniProt (четвертый уровень).

Общий вид первого информационного уровня построенного модуля «Белки скелетной мышцы свиньи (*Sus scrofa*)» представлен на рисунке 2.

В целом, полученные результаты на примере исследований образцов свинины показывают эффективность и перспективность применения протеомных технологий для оценки качества сырья и мясной продукции по их белковому составу, а также для выявления потенциальных белковых биомаркёров, которые позволяют определять их тканевую принадлежность. →

## Литература

1. de Almeida AM, Bendixen E. Pig proteomics: a review of a species in the crossroad between biomedical and food sciences // J Proteomics. 2012. 75. 4296-4314.
2. Fernandez-Gines JM, Fernandez-Lopez J, Sayas-Barbera E, Perez-Alvarez JA. Meat Products as Functional Foods: A Review // J Food Sci. 2005. 70. R37-R43.
3. Di Luca A, Elia G, Hamil R, Mullen AM. 2D DIGE proteomic analysis of early post mortem muscle exudate highlights the importance of the stress response for improved water-holding capacity of fresh pork meat // Proteomics. 2013. 13. 1528-1544.
4. Irina Chemukha, Andrey Listysin, Alexander Makarenko, Lilia Fedulova Pork - a Supplementary Aid in Treatment after Intracerebral Hemorrhagic Apoplectic Shock // 55th ICoMST, August, 2009, Copenhagen, Denmark. Proceedings, 2009, PE9.27
5. Ковалева М.А. , Ковалев Л.И., Торопыгин И.Ю. и др. Протеомный анализ белков скелетной мышцы (m.vastus lateralis) человека, идентификация 89 белковых продуктов генной экспрессии // Биохимия. 2009. 74. 1524-1538.
6. Shishkin S, Kovaleva M, Ivanov A. et al. Comparative proteomic study of proteins in prostate cancer and benign hyperplasia cells // J. Cancer Sci. Ther. 2011. S1. <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5956.S1-003> (P.1-8)
7. Шишкин С.С., Ковалев Л.И., Ковалева М.А. и др. База данных «Протеомика рака простаты» // Acta naturae, 2010. Т.2. №4. 104-114.

## Контакты:

Леонид Иванович Ковалев,  
Сергей Сергеевич Шишкин,  
Марина Анатольевна Ковалева,  
Алексей Викторович Иванов  
+7 (495) 952-5886  
Наталья Леонидовна Вострикова,  
Ирина Михайловна Чернуха  
+7 (495) 676-7211