

## ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТЕЇНІВ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ КЕРАТИНОВИХ ВОЛОКОН РІЗНИХ ТИПІВ

В. Гавриляк<sup>1</sup>, Г. Седіло<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Інститут біології тварин НААН України  
вул. В. Стуса, 38, Львів 79034, Україна  
e-mail: havvita@ukr.net*

<sup>2</sup>*Інститут сільського господарства Карпатського регіону НААН України  
вул. Грушевського, с. Оброшино, Львівська обл. 81115, Україна*

У статті представлено результати дослідження білкового спектра кератинів волосою людини, шура та вовняних волокон овець. За допомогою електрофоретичного розділення в ПААГ за денатурувальних умов виявлено поліпептиди у діапазоні молекулярних мас 30–10 кДа, 60–40 і 100 кДа, які відповідають білкам із високим вмістом сірки або кератин-асоційованим протеїнам, білкам із низьким вмістом сірки або інтермедіальним філаментам та високомолекулярним білкам. Зміни у співвідношенні протеїнових фракцій досліджуваних кератинів пов'язані з відмінностями у рівні біосинтезу різних типів білків.

*Ключові слова:* кератини, білки з високим вмістом сірки, білки з низьким вмістом сірки, матриксні білки, фібрилярні білки.

Кератини належать до високоспеціалізованих фібрилярних білків, із яких формуються зовнішні захисні покриви хребетних. Вони утворюють основну масу рогового шару епідермісу та його придатків – волосою, нігтів, рогів тощо. Відомо, що протеїни волосою поділяються на тверді  $\alpha$ -кератини, або інтермедіальні філаменти мікрофібрил і матриксні білки, які формують міжклітинний цемент. У свою чергу,  $\alpha$ -кератини поділяються на два типи: тип I – кислі кератини із молекулярною масою 40–50 кДа, до яких входить 4–9 груп білків і тип II – нейтрально-основні (55–65 кДа) протеїни, представлені 4–6 групами. Матриксні або кератин-асоційовані протеїни класифікують на білки з високим вмістом сірки (10–30 кДа) та білки з високим вмістом тирозину і гліцину (6–9 кДа) [6, 7].

Літературні дані свідчать, що характеристика кератинів різного походження залежить від співвідношення між інтермедіальними філаментами і кератин-асоційованими протеїнами. Зокрема, є повідомлення про міжвидові відмінності у кількісному співвідношенні різних груп кератинів. Так, було показано, що різні кератинові волокна мають подібні патерни в діапазоні 65–35 кДа, тоді як відмінності стосуються в основному матриксних білків (30–10 кДа) [3–5, 11].

Метою нашої роботи було дослідити протеїни, екстраговані із різних кератинових волокон, і з'ясувати, чи можлива їх диференціація шляхом порівняння електрофоретичних профілів. Варто також зауважити, що для характеристики кератинів ми використали людський волос, вовняне волокно та волос шура, які відрізняються між собою за морфологічною будовою. Відмінності полягають, насамперед, у будові кортексу, який у людини та вівці займає майже весь волос, тоді як у волоссі шура цей шар тонкий і становить не більше 1/10 його товщини, а практично всю частину волосою займає серцевина [1]. Такі результати можуть бути використані для ідентифікації волосою тварин в еволюційному аспекті, судовій експертизі, текстильній промисловості.

### Матеріали та методи

Об'єктом досліджень були зразки волосся людини, вовняні волокна асканійських кросбредних вівцематок і волос щура. Волокна промивали у нейтральному мийному розчині, ретельно споліскували та висушували. Поверхневі ліпіди екстрагували в апараті Сокслетта тетрахлорметаном упродовж 5 годин, а потім сумішшю етиловий спирт – діетиловий ефір (1:1, v/v). Екстракцію білків проводили за методом, описаним Накамураю та ін. (2002) [10]. Для цього волокна поміщали у 25 мМ тріс-НСІ (рН 8,5) буфер, який містив 2,6 М тіосечовину, 5 М сечовину, 5% 2-меркаптоетанол за температури 50°C протягом 3 діб. Після фільтрування розчин діалізували протягом 3 діб, центрифугували при 15 000 g протягом 20 хв. Вміст білка у супернатанті визначали колориметрично за допомогою реагента Бредфорда [2], калібрувальну криву будували з використанням бичачого сироваткового альбуміну, розчиненого у буфері, який використовували для екстракції.

Білки розділяли методом електрофорезу в 12,5% ПААГ у присутності 0,1% ДСН відповідно до загальноприйнятої методики [9]. Протеїни у гелі фарбували за допомогою 0,2% Кумасі R-250 та відмивали розчином, що містив 7% оцтову кислоту і 40% етанол. Для визначення молекулярної маси білків у екстрактах, отриманих із кератинових волокон, використовували стандарти білків із молекулярною масою в діапазоні 10–200 кДа (Ферментас, Литва). Електрофореграми сканували за допомогою сканера hp scanjet 2400, а відносний вміст білкових фракцій обчислювали за допомогою програми Biotest.

### Результати і їхнє обговорення

Результати електрофорезу білків, виділених із трьох різних видів волокон, представлені на рис. 1. Проведені дослідження показали, що концентрація білка у екстрактах волоса людини, щура та вовняному волокні була практично однакова і становила відповідно  $6,66 \pm 0,15$  мг/мл,  $6,52 \pm 0,21$  мг/мл і  $6,75 \pm 0,18$  мг/мл.

Слід відзначити, що застосування тіосечовини в екстракційному буфері дає змогу виділити і кортикальні білки, що узгоджується з результатами, отриманими [10], відповідно до яких поєднання сечовини із тіосечовиною забезпечує достатній ступінь екстракції протеїнів.

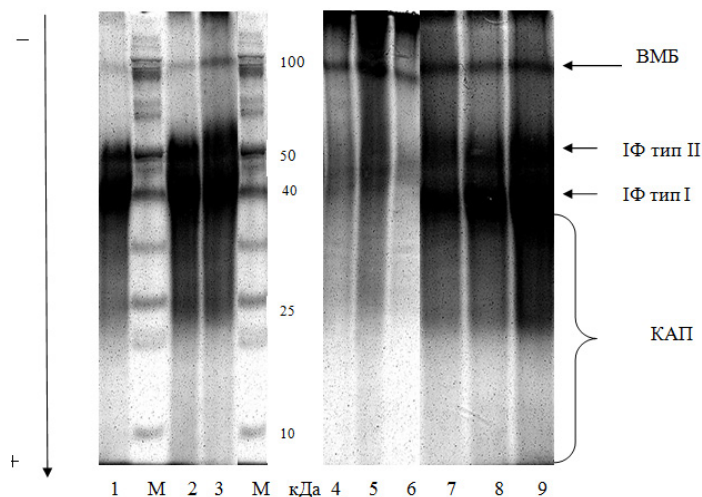


Рис. 1. Спектр білків різних кератинових волокон: ВМБ – високомолекулярні білки, ІФ тип I – інтермедіальні філаменти I типу, ІФ тип II – інтермедіальні філаменти II типу, КАП – кератин-асоційовані протеїни; 1–3 – волос щура; 4–6 – волос людини; 7–9 – вовняне волокно; М – маркер молекулярної маси (200–10 кДа).

Результати електрофорезу за денатурувальних умов показали, що екстраговані кератини розділяються на 2 поліпептидні ланцюги із молекулярною масою в діапазоні 50–40 кДа, які відповідають типу I і типу II інтермедіальних філаментів, або білків із низьким вмістом сірки. У низькомолекулярній ділянці виявлено 2–3 смуги білків із молекулярною масою 30–10 кДа. Це кератин-асоційовані протеїни, які формують матрикс волокна. Характерною особливістю цих білків є наявність високого вмісту сірки, тому їх ще називають білки, багаті на сірку. Крім того, на електрофореграмі вище від смуги білків інтермедіальних філаментів розміщена зона, яка відповідає мінорному білковому компонентіві із молекулярною масою 100 кДа, що узгоджується із даними, отриманими авторами [8].

Білкові профілі, представлені на електрофореграмі, свідчать, що фібрилярні білки фарбуються інтенсивніше, ніж матриксні, на що вказують автори [6], які спостерігали кращу здатність білків із низьким вмістом сірки зв'язувати барвник порівняно з білками з високим вмістом сірки.

У результаті проведених досліджень встановлено, що білки інтермедіальних філаментів різних волокон мають подібну молекулярну масу, проте відрізняються за інтенсивністю смуг. Так, білки із вовняного волокна та волоса щура мають подібні патерни в ділянці 50–40 кДа, натомість людський волос відрізняється меншою інтенсивністю цих смуг.

Результати денситометричної оцінки співвідношення білкових фракцій досліджуваних кератинів представлено на рис. 2.

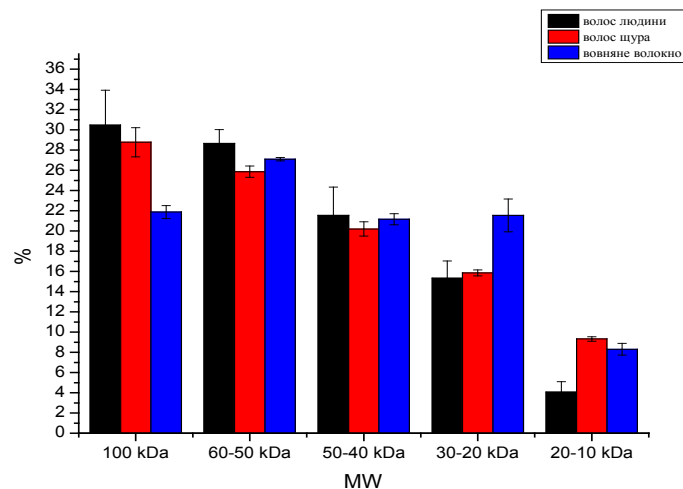


Рис. 2. Співвідношення білкових фракцій у різних кератинових волокнах, % ( $M \pm m$ ,  $n=3$ ). **Примітки:** \* – різниця достовірна між волосом людини і волосом щура; \*\* – різниця достовірна між волосом людини і вовняним волокном; + – різниця достовірна між волосом щура і вовняним волокном.

Електрофорезом виявлено певні відмінності у співвідношенні білкових фракцій, які головним чином стосувалися матриксних або кератин-асоційованих протеїнів. Так, якщо кількість білків у діапазоні молекулярної маси 30–20 кДа була практично однаковою для волоса людини і щура, то у вовняному волокні вміст цієї фракції збільшився на 38% ( $P < 0,02$ ). Нами встановлено відмінності щодо кількості низькомолекулярних білків у діапазоні 20–10 кДа, вміст яких був вірогідно вищий у вовняних волокнах і волосі

щура порівняно з людським волосом. Слід зазначити, що відносний вміст обох фракцій інтермедіальних філаментів у всіх досліджуваних волокнах був практично однаковий, а кількість високомолекулярних білків проявляла тенденцію до зменшення у вовняному волокні. Також літературні дані свідчать, що співвідношення між основними групами протейнів кератинових волокон можуть змінюватися у відповідь на дію аліментарних, генетичних чи фізіологічних чинників, наприклад, збільшення сірки у раціоні овець супроводжується посиленням синтезу у вовні білків із високим вмістом сірки [6, 12].

Отже, досліджувані кератинові волокна різняться між собою насамперед за співвідношенням між певними групами білків, що може бути результатом відмінностей у рівні біосинтезу основних поліпептидів кератинів.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Коцюмбас Г. І., Коцюмбас І. Я., Щербентовська О. М. та ін. Морфологічні особливості шкіри та волоса різних видів тварин і людини в аспекті судово-ветеринарної експертизи. Л.: ТзОВ ВФ "Афіша", 2010. 136 с.
2. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.
3. Folin M., Contiero E. Electrophoretic analysis of human hair keratins // *Anthropol. Anz.* 1996 a. Vol. 53. P. 337–348.
4. Folin M., Contiero E. Electrophoretic analysis of mammalian hair keratins // *Anthropol. Anz.* 1996 a. Vol. 54. P. 331–339.
5. Folin M., Contiero E. Electrophoretic analysis of non-human primates' hair keratin // *Forensic. Sci. Int.* 1996 b. Vol. 83. P. 191–199.
6. Gillespie J. M. The structural Proteins of Hair: Isolation, characterization, and regulation of biosynthesis. In *Physiology, biochemistry and molecular biology of skin*: Oxford, 1991. P. 625–658.
7. Harkey M. R. Anatomy and physiology of hair // *Forensic Sci. Int.* 1993. Vol. 63. P. 9–18.
8. Kon R., Nakamura A., Hirabayashi N., Takeuchi K. Analysis of damaged components of permed hair using biochemical technique // *J. Cosmetic Sci.* 1998. Vol. 49. P. 13–22.
9. Laemmly U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub> // *Nature.* 1970. Vol. 227. N 1. P. 680–685.
10. Nakamura A., Arimoto M., Takeuchi K., Fujii T. A rapid extraction procedure of human hair proteins and identification of phosphorylated species // *Biol. Pharm. Bull.* 2002. Vol. 25. P. 569.
11. Rane P. P., Barve S. S. Evaluating protein patterns of speciality fibres for identification to combat false labeling // *Int. J. Zool. Res.* 2010. Vol. 6. N 4. P. 286–292.
12. Sherlock R. G., Harris P. M., Lee J. et al. Intake and long-term cysteine supplementation change wool characteristics of Romney sheep // *Austr. J. Agric. Sci.* 2001. Vol. 52. P. 29–36.

Стаття: надійшла до редакції 05.12.12

доопрацьована 20.02.13

прийнята до друку 20.02.13

**ELECTROFORETICAL CHARACTERISTICS OF PROTEINS, EXTRACTED FROM  
DIFFERENT TYPE OF KERATIN FIBRES**

**V. Havrylyak<sup>1</sup>, H. Sedilo<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>Institute of Animal Biology, NAAS of Ukraine  
38, V. Stus St., Lviv 79034, Ukraine  
e-mail: havvita@ukr.net*

*<sup>2</sup>Institute of Agriculture of Carpathian Region, NAAS of Ukraine  
Hrushevskiyi St., Obroshyno, Lviv region 81115, Ukraine*

The data about the protein spectrum of keratins, isolated from human hair, rat hair and wool fibers by electrophoresis in SDS- PAGE were presented in the paper. It was established the presence of polypeptide bands in the range of molecular weights of 30–10 kDa, 60–40 kDa, and 100 kDa, which correspond to high sulfur proteins or keratin-associated proteins, low sulfur proteins or intermediate filaments and high molecular weight proteins. It was shown that the protein fractions of studied keratin fibers differ by intensity of biosynthesis of various types of proteins.

*Keywords:* keratins, high sulfur proteins, low sulfur proteins, matrix proteins, fibrous proteins.

**ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ  
КЕРАТИНОВЫХ ВОЛОКОН РАЗНЫХ ТИПОВ**

**В. Гавриляк<sup>1</sup>, Г. Седило<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>Институт биологии животных НААН Украины  
ул. В. Стуса, 38, Львов 79034, Украина  
e-mail: havvita@ukr.net*

*<sup>2</sup>Институт сельского хозяйства Карпатского региона НААН Украины  
ул. Грушевского, с. Оброшино, Львовская обл. 81115, Украина*

В статье представлены результаты исследований белкового состава кератинов, выделенных из волоса человека, крысы и шерстного волокна. С помощью электрофореза в денатурирующих условиях выявлено наличие полипептидных зон в диапазоне молекулярного веса 30–10 кДа, 60–40 кДа, и 100 кДа, которые соответствуют белкам с высоким содержанием серы или кератин-ассоциированным протеинам, белкам с низким содержанием серы или интермедиальным филаментам и высокомолекулярным белкам. Изменения в соотношении протеиновых фракций исследуемых кератинов связаны с отличиями в уровне биосинтеза различных типов белков.

*Ключевые слова:* кератины, белки с высоким содержанием серы, белки с низким содержанием серы, матриксные белки, фибриллярные белки.