



УДК 641.14/3:639

## Получение низкомолекулярной ДНК из молок рыб Байкальского региона

В. Ж. Цыренов, С. В. Гомбоева, М. А. Захарова

*Восточно-Сибирский государственный университет  
технологий и управления, г. Улан-Удэ  
E-mail: [office@esstu.ru](mailto:office@esstu.ru)*

**Аннотация.** Проведены исследования содержания нуклеиновых кислот в молоках (зрелых семенниках) 12 видов рыб Байкальского региона. Описана схема получения комплекса ДНК из молок этих рыб, определена активность протеолитических и нуклеолитических ферментов. Приведены результаты идентификации полученного комплекса ДНК методом ВЭЖХ. Содержание ДНК в молоках рыб Байкальского региона колеблется в широких пределах – от 0,96 % у леща до 3,73 % у окуня, 3,75 % у байкальского омуля и 6,27 % у песчаной широколобки. Перспективными биообъектами для получения препаратов ДНК являются молоки песчаной широколобки, омуля и окуня.

**Ключевые слова:** ДНК, семенники рыб, нуклеиновые кислоты, нуклеазная и протеолитическая активность.

### **Введение**

В настоящее время достоверно показана биологическая активность нуклеиновых кислот различного происхождения при их применении в качестве биологически активных добавок к пище и для специального (детского, лечебного, спортивного) питания, использовании в косметологии и в виде лекарственных препаратов.

Низкомолекулярная ДНК (молекулярная масса  $2-5 \times 10^5$  Да) из молок лососевых разрешена к применению как биологически активная пищевая добавка и обладает целым рядом лечебно-профилактических свойств (повышение физической и умственной работоспособности, иммуномоделирующее, противовирусное, кардиопротекторное и противоопухолевое действие) [8]. Среди иммуномодуляторов и противовирусных средств, полученных из молок осетровых, особое место занимают коммерческие препараты Деринат и Ферровир.

Основным источником получения низкомолекулярной ДНК являются гонады лососевых, осетровых рыб и кальмаров. Молоки прочих видов пресноводных видов рыб также могут служить источником нуклеиновых кислот. Однако до настоящего времени нет сведений о количественном содержании в них ДНК и ферментов, участвующих в её деградации. Иссле-

дования последних в основном касаются ДНКаз пищеварительных органов и печени рыб. Например, ДНКазы I, расщепляющая нативную ДНК по ударному механизму, активируемая ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , была выделена из печени карпа и карася, а кислые дезоксирибонуклеазы – из печени и молок некоторых видов пресноводных и морских рыб [5]. Сведений о протеолитических и нуклеолитических ферментах молок пресноводных рыб в литературе не обнаружено.

Учитывая положительное воздействие ДНК на организм человека, перспективным является её изыскание в пресноводных видах рыб. Несмотря на большое количество разработок в этой сфере, проблема поиска новых перспективных источников сырья для получения низкомолекулярной ДНК остается актуальной. В данной работе проведено исследование содержания нуклеиновых кислот в гонадах самцов разных видов рыб Байкальского региона.

### **Материалы и методы**

В качестве сырья для проведения исследований были использованы гонады 3–4 стадии зрелости самцов следующих видов пресноводных рыб: омуля *Coregonus migratorius*, окуня *Perca fluviatilis*, песчаной широколобki *Paracottus (Leocottus) kessleri*, тайменя *Hucho taimen*, налима *Lota lota*, язя *Leuciscus idus*, ельца *Leuciscus baicalensis*, чёрного хариуса *Thymallus baicalensis*, леща *Abramis brama*, ленка *Brachymystax lenok*, плотвы *Rutilus rutilus*, карася *Carassius auraris gibelio*, которые в замороженном виде доставлялись в лабораторию. Образцы рыб отлавливали в осенне-весенний период в реках и озёрах Бурятии. Срок хранения замороженного сырья при температуре  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  не превышал 3 мес.

Количественное содержание ДНК в сырье определяли по методу Дише [5]; содержание РНК – по методу Мейбаума [12]; содержание нуклеиновых кислот в препарате определяли по методу Спирина [5]; по разнице поглощения азотистых оснований (при 270 и 290 нм), полученных в результате гидролиза ДНК 0,5%-ной хлорной кислотой при 100–105  $^{\circ}\text{C}$  [1].

Определение биохимических свойств гидролизатов и препарата ДНК проводили по общепринятым методам. Количественное определение белка проводили по методу Лоури [2]. Качественную реакцию на белки проводили с реактивом Миллона. Содержание массовой доли белка, влаги, золы проводили согласно ГОСТ 7636-85 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки» [6].

Полученный сухой порошок ДНК измельчали в ступке и взвешивали на аналитических весах с абсолютной погрешностью  $\pm 0,0002\text{ г}$ .

В качестве субстратов для определения протеолитической активности использовали казеин по Гаммерстену («Биолар», Латвия), эфирные субстраты: ТАМЭ, БТЭЭ («Sigma», США), нуклеазной – ДНК («ICN», США). При проведении электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в качестве маркеров использовали наборы олигонуклеотидов pUC/Msp 1 и pBR 322/Alu 1 («СибЭнзим», Россия).

Удельную активность протеолитических ферментов определяли по модифицированному методу Е. Д. Каверзневой [10] в щелочной среде по скорости гидролиза казеина, а в кислой – гемоглобина. Активность кислой и щелочной Са, Mg-зависимой ДНКаз оценивали по количеству кислоторастворимых олигонуклеотидов, образующихся в процессе гидролиза нативной ДНК [9].

Для получения низкомолекулярной ДНК использовали метод, разработанный учёными ТИПРО-центра, который включает солевую экстракцию с последующим осаждением конечного вещества из раствора этиловым спиртом и удаление влаги сушкой на воздухе при комнатной температуре (Патент РФ № 915446) [11].

Идентификацию и определение массовой доли ДНК в готовом препарате осуществляли методом гель-электрофореза в 20%-ном (C=3,2) полиакриламидном геле. Денситограммы с пластинок снимали на денситометре Ultrascan XL (LKB, Швеция).

Молекулярную массу нуклеиновых кислот определяли по калибровочным графикам, построенным в координатах зависимости Rf от молекулярной массы по значениям, соответствующим наборам стандартных маркерных молекул рUC/Msp 1: 15,6, 20,4, 40,2, 66,0, 114,0, 145,0, 198,0, 242,4, 302,4 кДа.

Высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили с помощью хроматографа Agilent 1100 («Agilent Technologies», США) с ультрафиолетовым детектором переменной частоты, установленным на 260 нм.

Регистрацию пиков определяемых веществ осуществляли по времени удерживания и спектральным отношениям (220 и 260 нм) с соответствующими параметрами хроматограмм стандартных ДНК маркеров («ICN», США).

Расшифровку полученных пиков исследовали с помощью спектральных характеристик (УФ-спектр при длине волны 220 и 260 нм) низкомолекулярных ДНК соотношением их с библиотекой спектров нуклеиновых кислот.

Пробы на острую токсичность препаратов, полученных из гонад рыб проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ № 755 от 12.08.77).

### ***Результаты и обсуждение***

Результаты проведённого анализа показали, что наибольшее содержание ДНК установлено в молоках песчаной широколобки (6,27 %), омуля (3,75 %) и окуня (3,73 %). В икре пресноводных рыб всех видов, кроме леща, содержание ДНК оказалось значительно более низким по сравнению с молоками.

Как показали исследования, содержание ДНК в семенниках одинаковых стадий зрелости у пресноводных рыб оказалось ниже, чем установленное у морских [9], за исключением песчаной широколобки, содержание ДНК в молоках которой сопоставимо с таковым у кеты и горбуши, а также

омуля и окуня (содержание ДНК в молоках сопоставимо с таковым у трески, наваги и минтая).

Был проведён анализ химического состава и качественное определение нуклеопротеида, входящего в состав молок обозначенных перспективных по содержанию ДНК видов пресноводных рыб.

Наиболее постоянной величиной является суммарное содержание воды в молоках рыб различных видов, близкое к 80 %.

Гонады пресноводных рыб являются потенциальными поставщиками ценных белков. Наибольшее содержание белка наблюдается в молоках омуля (16,5 %). В молоках окуня, песчаной широколобки и хариуса содержание белка приблизительно одинаково (13–15 %).

В настоящее время предполагают, что нуклеопротеиды молок лососевых рыб обладают наиболее эффективным фармакологическим действием, так как их основным белком является протамин. Только в молоках лососей и сельдей обнаружены белки специфического состава – протамины, в то время как у большинства других видов (в частности тресковых) в молоках содержатся гистоны [13].

Эти два основных белка можно различить с помощью реакции Миллона: гистоны дают положительный результат, протамины – отрицательный. Опираясь на результаты проведённой качественной реакции на тирозин, мы предположили, что основным белком, составляющим комплекс с ДНК в молоках омуля, язя, налима является гистон, а в молоках широколобки и окуня – протамин. Это позволяет сделать предварительный вывод о наличии фармакологических свойств у группы «ДНК – протамин», то есть у молок песчаной широколобки и окуня.

Оценка уровня активности эндогенных ферментов важна для определения степени деградации ДНК на начальных технологических стадиях гидролиза – гомогенизации и экстракции. Поэтому при получении из новых видов сырья препаратов, содержащих нуклеиновые кислоты и их производные, одной из задач является определение активности и специфичности тканевых гидролаз.

В условиях проведения гидролиза во всех исследуемых сырьевых источниках отмечена более высокая активность кислых дезоксирибонуклеаз, которые могут играть определённую роль в деградации ДНК на первых стадиях гидролиза, когда рН гомогенизированной ткани находится в слабокислой или нейтральной области. Самая высокая активность кислых нуклеаз отмечена в молоках песчаной широколобки, омуля, окуня и леща, самая низкая – в молоках ленка.

Наиболее высокая активность Са, Mg-зависимых щелочных дезоксирибонуклеаз обнаружена в молоках язя, омуля, песчаной широколобки и окуня. Активность щелочной нуклеазы при данных условиях не проявлялась у ельца и ленка. Активность щелочных нуклеаз на порядок ниже, чем кислых, такая разница в активности, по-видимому, связана с физиологическими особенностями объектов исследования.

При сопоставлении активности щелочных ДНКаз и содержания ДНК в гонадах можно предположить взаимосвязь между этими показателями. За некоторыми исключениями (язь) в объектах с высокой активностью ДНКаз наблюдалось наименьшее содержание ДНК.

Активность данных ферментов в молоках исследуемых пресноводных видов рыб в среднем в 1,2–2 раза выше, чем в морских объектах, что позволяет ожидать более глубокий процесс деструкции ДНК при её выделении.

В молоках исследуемых рыб активность щелочных протеаз на порядок выше, чем кислых протеаз.

Высокая казеинолитическая активность, обычно рассматриваемая как общая протеолитическая, у омуля (9,045 Е/г), карася (7,982 Е/г) и леща (7,727 Е/г) проявлялась при  $\text{pH} = 8$  и  $t = 37$  °С. В молоках прочих видов активность щелочных протеаз низкая, возможно, содержащиеся в них протеазы требовали других условий или отличались иной субстратной специфичностью. Активность кислых протеаз не проявилась в молоках тайменя, карася и язя, наиболее высокая наблюдалась в молоках ленка (2,927 Е/г) и налима (1,173 Е/г).

Полученные значения протеолитической активности в молоках пресноводных видов рыб заметно превышают таковые у морских [9].

При выделении ДНК из молок пресноводных рыб, растворы препаратов ДНК неустойчивы и быстро образуют гель-раствор, поэтому для каждого вида подбирали необходимые условия  $\text{pH}$ , гомогенизации, температуры и длительности кипячения. Для выделения ДНК из молок песчаной широколобки, окуня и омуля требуется  $\text{pH}$  8,0–8,5 среды; тайменя, ельца и язя – 7,0–7,5. Не удалось подобрать оптимальный  $\text{pH}$  среды для выделения ДНК из молок карася. Кроме того, для молок омуля, окуня, язя и ленка требуется меньшее время выдерживания на водяной бане (до 2 ч.).

Выход сухого препарата ДНК из 5 г молок широколобки составил 0,1 г. Выделенный препарат ДНК представляет собой аморфный порошок светло-кремового цвета, растворимый в воде при нагревании и нерастворимый в органических растворителях. Содержание ДНК в препарате достигает 68–73 %.

Препараты ДНК из молок пресноводных рыб, полученные указанным способом, исследовали на растворимость в зависимости от  $\text{pH}$  и температуры. Показано, что при  $\text{pH}$  6,5 и 7,0 даже через 15 и 20 мин соответственно суспензия ДНК из молок окуня, омуля, тайменя в воде остается устойчивой и только при  $\text{pH}$  8,0–8,5 достигается полная прозрачность. В то же время ДНК песчаной широколобки и налима при заданном диапазоне  $\text{pH}$  (5,5–9,0) растворяется в течение часа.

Полученные с помощью метода ВЭЖХ хроматографические профили препаратов ДНК молок пресноводных рыб Байкальского региона совпадают с определёнными пиками стандартной ДНК по времени удерживания. В препаратах ДНК омуля, окуня и язя найдено по два фрагмента, приближенных к двум пикам из стандартного набора ДНК (пики 0,87 и 1,13), широколобки и налима (пики 0,751 и 0,754 соответственно) – по одному, а

тайменя – три фрагмента, совпавшие по времени удерживания с пиками 0,85, 1,15 и 1,37 стандарта ДНК.

Расшифровка полученных пиков показала практически полное сходство состава азотистых оснований в нуклеиновых кислотах исследованных объектов. Совпадение пиков при одних и тех же длинах волн (220 и 260 нм) свидетельствует о весьма близком количественном соотношении азотистых оснований в ДНК исследованных объектов, а различные величины пиков соответствуют установленной разнице в количественном содержании фракций ДНК в препаратах.

Согласно данным элетрофоретического анализа, препарат ДНК из молок омуля содержал одну фракцию с молекулярной массой 380 кДа. В нуклеопротеидном комплексе широколобки обнаружены два пика с молекулярной массой 260 и 290 кДа. Известно, что низкомолекулярная ДНК с молекулярным весом 270–500 кДа применяется в медицине и фармации.

При проведении проб на острую токсичность препаратов, полученных из гонад гидробионтов, гибели экспериментальных животных не наблюдалось.

### **Выводы**

Установлено, что содержание ДНК в молоках рыб Байкальского региона колеблется в широких пределах – от 0,96 % у леща до 6,27 % у песчаной широколобки. Перспективными биообъектами для получения препаратов ДНК являются молоки песчаной широколобки, омуля и окуня.

Содержание белка в молоках исследованных видов выше, чем в молоках морских рыб. Показано, что гистоны являются основным (истинным) белком, составляющим комплекс с ДНК в молоках омуля, язя и налима, а протамины – в молоках песчаной широколобки и окуня.

В молоках пресноводных рыб имеются активные гидролазы – дезоксирибонуклеазы (ДНКазы) и протеазы, которые имеют следующие существенные особенности – активность щелочных эндонуклеаз на порядок ниже, чем кислых, в то время как активность щелочных протеаз на порядок выше, чем кислых. Активность ДНКаз в молоках пресноводных рыб несколько (в 1,2 раза) выше, чем в молоках морских видов рыб и имеют наибольшую активность в кислой зоне рН.

Активность ДНКаз и протеаз хорошо сохраняется при хранении исходных материалов, вызывая постепенный гидролиз биополимеров.

### **Список литературы**

1. Амелина В. С. Кислые нуклеазы и их роль в приспособительных реакциях водных организмов : дис. ... канд. биол. наук / В. С. Амелина. – М., 2006. – 175 с.
2. Беседнова Н. Н. Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) из молок рыб – перспективы клинического применения / Н. Н. Беседнова, Л. М. Эпштейн. – Владивосток : ТИНРО-центр. – 2002. – 38 с.
3. Гафуров Ю. М. Дезоксирибонуклеазы. Методы исследования и свойства / Ю. М. Гафуров. – Владивосток : Дальнаука, 1999. – 230 с.
4. Дэвидсон Дж. Биохимия нуклеиновых кислот / Дж. Дэвидсон. – М. : Мир. – 1976. – 412 с.

5. Иммунотропные свойства дезоксирибонуклеиновой кислоты из молок лососевых рыб / Н. Н. Беседнова [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – № 10 – С. 13–15.
6. Исследование активности эндогенных и экзогенных ферментов при получении препаратов из молок различных видов рыб и моллюсков / Ю. М. Позднякова [и др.] // Изв. ТИПРО-центра. – 2001. – Т. 129. – С. 197–202.
7. Каверзнева Е.Д. Стандартный метод определения протеолитической активности для комплексных препаратов протеаз // Прикл. биохим. и микробиол. – 1971. – Т. 7. – № 2. – С. 225–228.
8. Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа. ГОСТ 7636-85 от 01.12.2005. – 123 с
9. Северина С. Е. Практикум по биохимии / С. Е. Северина, Г. А. Соловьева. – М. : Изд-во МГУ, 1989. – 509 с.
10. Пат. № 915446 СССР, Способ получения ДНК из молок рыб / М. А. Гаймула, В. Х. Кална, У. Я. Микстайс, Л. М. Эпштейн ; заявитель и патентообладатель НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, Владивосток ; заявл. 10.10.80 ; опубл. 01.07.91, Бюл. № 5.
11. Шварц Г. Л. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ: методические указания по изучению новых нестероидных противовоспалительных препаратов / Г. Л. Шварц, Р. Д. Сюзбаев. – М., 2000. – 236 с.
12. Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues / J. Folch, M. Less, G. H. Sloane-Stanley // J. Biol. Chem. – 1957. – Vol. 226, N 1. – P. 497–509.
13. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, N 1. – P. 265–276.

## Preparation of Low Molecular Weight DNA from the Milts of the Fishes of Baikal Region

V. Zh. Tsyrenov, S. V. Gomboeva, M. A. Zakharova

*East-Siberian State University of Technology and Management, Ulan-Ude*

**Abstract.** The investigations of nucleic acids in the gonads of 12 species of aquatic organisms in the Baikal region, defined in them nucleasic and proteolytic activity. The scheme of the complex and obtained DNA from the sperm of freshwater fish. Results Identification of the DNA obtained by HPLC. The resulting complex of sperm DNA freshwater fish. An assessment of the acute toxicity of the DNA and its harmlessness. Spotted pharmacological activity of a test DNA complex.

**Keywords:** DNA, fish, milts, nucleic acids, nuclease and proteolytic activity.

*Цыренов Владимир Жигжитович  
доктор биологических наук, профессор  
зав. кафедрой, Институт пищевой  
инженерии и биотехнологии  
Восточно-Сибирский государственный  
университет технологий и управления*

*Tsyrenov Vladimir Zhigzhitovich  
Doctor of Sciences (Biology), Professor,  
Head of Department, Institute of Food  
Engineering and Biotechnology  
East-Siberian State University  
of Technology and Management*

670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40-а  
тел. (3012) 41–71–46  
факс (3012) 43–14–15  
e-mail: office@esstu.ru

40a, Klyuchevskaya st., Ulan-Ude, 670013  
tel.: (3012) 41–71–46  
fax: (3012) 43–14–15  
e-mail: office@esstu.ru

Гомбоева Саяна Владимировна  
кандидат биологических наук  
Восточно-Сибирский государственный  
университет технологий и управления  
Институт пищевой инженерии  
и биотехнологии  
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40-а  
тел. (3012) 41–71–46  
факс (3012) 43–14–15  
e-mail: s.gomboeva@mail.ru

Gomboeva Sayana Vladimirovna  
Candidate of Sciences (Biology)  
East-Siberian State University  
of Technology and Management  
Institute of Food Engineering  
and Biotechnology  
40a, Klyuchevskaya st., Ulan-Ude, 670013  
tel.: (3012) 41–71–46  
fax: (3012) 43–14–15  
e-mail: s.gomboeva@mail.ru

Захарова Марина Александровна  
кандидат биологических наук  
Восточно-Сибирский государственный  
университет технологий и управления  
Институт пищевой инженерии  
и биотехнологии  
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40-а  
тел. (3012) 41–71–46  
факс (3012) 43–14–15  
e-mail: zakharmarina@mail.ru

Zakharova Marina Aleksandrovna  
Candidate of Sciences (Biology)  
East-Siberian State University  
of Technology and Management  
Institute of Food Engineering and Bio-  
technology  
40a, Klyuchevskaya st., Ulan-Ude, 670013  
tel: (3012) 41–71–46  
fax: (3012) 43–14–15  
e-mail: zakharmarina@mail.ru