

УДК 577.112:57.043.017.3:595.767.29

О.К. Гулевський*, О.О. Грищенко, Л.І. Реліна, Д.В. Третяк

Преципітація білків із холодоадаптованих личинок *Tenebrio molitor* у присутності ПЕГ-6000

UDC 577.112:57.043.017.3:595.767.29

О.К. Gulevsky*, О.О. Grischenkova, Л.І. Relina, D.V. Tretyak PEG-6000 Induced Precipitation of Proteins from Cold-Acclimated *Tenebrio molitor* larvae

Реферат: У порівняльному аспекті досліджено спектри преципітованих ПЕГ-6000 білків неаклімованих та аклімованих личинок *Tenebrio molitor*. Показано, що якісний склад криопреципітованих білків аклімованих і неаклімованих личинок *T. molitor* має відмінності. Зокрема, у білкових спектрах фільтратів із аклімованих личинок з'являлися білки з м. м. 11 кДа, які відсутні у неаклімованих комах. Під час преципітації білків із гомогенатів холодоаклімованих і неаклімованих личинок спостерігалася значуща різниця в кількості преципітату при концентраціях поліетиленгліколю 12% і більше. Білки із фільтратів аклімованих личинок у присутності 6%-го розчину ПЕГ-6000 осаджувалися на 44 і 56% більше, ніж білків із неаклімованих особин при 22 і 4°C відповідно. Збільшення концентрації ПЕГ-6000 з 4 до 6% призводило до появи в преципітатах із аклімованих личинок білків у діапазоні м. м. 30–42,5 кДа, які відсутні у неаклімованих комах.

Ключові слова: холодова аклімація, білки, поліетиленгліколь, преципітація, електрофорез.

Реферат: В сравнительном аспекте исследованы спектры преципитированных ПЭГ-6000 белков неакклимированных и акклимированных личинок *Tenebrio molitor*. Показано, что качественный состав криопреципитированных белков акклимированных и неакклимированных личинок *T. molitor* имеет отличия. В частности, в белковых спектрах фильтратов из акклимированных личинок появлялись белки с м. м. 11 кДа, которые отсутствуют у неакклимированных насекомых. При преципитации белков из гомогенатов холодоакклимированных и неакклимированных личинок наблюдалась значимая разница в количестве преципитата при концентрациях полиэтиленгликоля 12% и более. Белки из фильтратов акклимированных личинок в присутствии 6%-го раствора ПЭГ-6000 осаждались на 44 и 56% больше, чем белки из неакклимированных особей при 22 и 4°C соответственно. Увеличение концентрации ПЭГ-6000 от 4 до 6% приводило к появлению в преципитатах из акклимированных личинок белков в диапазоне м. м. 30–42,5 кДа, которые отсутствуют у неакклимированных насекомых.

Ключевые слова: холодовая акклимация, белки, полиэтиленгликоль, преципитация, электрофорез.

Abstract: Spectra of PEG-6000-precipitated proteins from cold-acclimated and non-acclimated *Tenebrio molitor* larvae were comparatively studied. The composition of precipitated proteins from cold-acclimated and non-acclimated *T. molitor* larvae was shown as differed qualitatively. In particular, the protein spectra of filtrates from cold-acclimated larvae had proteins with molecular weight of 11 kDa, which were absent in non-acclimated insects. There was observed a significant difference in precipitate content at polyethyleneglycol concentrations of 12% and higher during protein precipitation from homogenates of cold-acclimated and non-acclimated larvae. Proteins from the filtrates of cold-acclimated larvae in the presence of 6% PEG-6000 were precipitated by 44 and 56% greater, than those from non-acclimated species at 22 and 4°C, respectively. The increasing of PEG-6000 concentration from 4 to 6% resulted in appearance in the precipitates from cold-acclimated larvae of proteins with molecular-weight range of 30–42.5 kDa, which were absent in non-acclimated insects.

Key words: cold acclimation, proteins, polyethyleneglycol, precipitation, electrophoresis.

Особливістю просторової функції білка є здатність поліпептидного ланцюга до утворення певної структури, яка має необхідні динамічні властивості для здійснення біологічних функцій. При обговоренні проблеми стабільності білків особлива увага приділяється гідрофобним взаємодіям, які відіграють суттєву роль у формуванні макромолекул і є одним із важливих факторів їх стабілізації.

Раніше нами було показано, що в процесі холодової аклімації склад синтезованих білків *Tenebrio*

The feature of protein spatial function is the ability of polypeptide chain to create the certain structure with necessary dynamic properties for implementing biological functions. When discussing the problem of protein stability a special attention is paid to hydrophobic interactions, playing a significant role in macromolecule formation and being one of the important factors of their stabilisation.

We have previously shown, that during cold-acclimation the composition of synthesized proteins in

Відділ біохімії холодової адаптації, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-41-35, факс: (+38 057) 373-30-84,
електронна пошта: profgulevskyy@gmail.com

Надійшла 23.06.2015
Прийнята до друку 07.09.2015

Проблеми кріобіології і кріомедицини. – 2015. – Т. 25, №4. – С. 350–358.
© 2015 Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Department of Biochemistry of Cold Adaptation, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 3734135, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: profgulevskyy@gmail.com

Received June, 23, 2015
Accepted September, 07, 2015

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25(4): 350–358.
© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

molitor змінюється кількісно та якісно [1]. Крім якісних модифікацій спектра білків холодостійких організмів у процесі низькотемпературних адаптацій, можлива зміна гідрофобних властивостей поліпептидів. Тенденція до збільшення гідрофобності деяких протеїнів спостерігається у багатьох видів арктичних риб [12, 13, 18] та бактерій [8–10], протеом яких у цілому має бути холодостабільним. Це дозволяє зберігати його нативну конформацію та функціонувати в умовах низьких температур. Можливо, це поширюється й на інші види тварин, наприклад комах, які здатні до холодової адаптації. Для виявлення модифікації білків у літературі наведено відомості щодо використання дегідратуючих агентів, зокрема поліетиленгліколю [6, 7], який при охолодженні призводить до преципітації білків залежно від ступеня їх гідрофобності. Метою даної роботи було проведення порівняльного аналізу преципітації білків із холодоаклімованих та неаклімованих личинок *Tenebrio molitor* при використанні ПЕГ-6000, а також вивчення електрофоретичного розподілу білків із гомогенатів та осадів.

Матеріали та методи

Роботу проводили на личинках великого борошняного хрущака *T. molitor* (*Coleoptera: Tenebrionidae*) останніх віків розвитку, які саме на цій стадії онтогенезу стають холодостійкими [5]. Для аклімації личинок утримували протягом трьох тижнів при 5...7°C.

Гомогенат одержували із *T. molitor* у 0,6%-му розчині NaCl на Na-фосфатному буфері 0,1 M (pH 7,4) у розрахунок 2 мл буфера на 6 личинок. Потім його центрифугували 10 хв при 1800g. З надосаду відбирали аліквоту для проведення електрофорезу, а надосад пропускали через фільтруючий картридж «Sartopore GF2» («Sartorius», Німеччина) для видалення клітинного детриту. З фільтрату відбирали аліквоту для електрофоретичного дослідження. До фільтрату додавали ПЕГ-6000 у співвідношенні 1:1, перемішували та проводили реакцію преципітації з кінцевими концентраціями ПЕГ у розчині 2, 4, 6 та 8% при 22 та 4°C упродовж 1,5 години, одержану суміш центрифугували 10 хв при 1800g та відбирали надосадову рідину в окремі пробірки.

Осад (~50 мкл) після преципітації ресуспендували в 0,6%-му розчині NaCl на 0,1M Na-фосфатному буфері (pH 7,4). З отриманого розчину відбирали аліквоту для проведення електрофорезу. Всі об'єми розчинених осадів переносили в діалізні мішечки (плівка «Visking type 8/32» («Serva», Німеччина)) діаметром 6 мм та довжиною приблизно 5 см, які мають межу відсікання речовин із

Tenebrio molitor was changed quantitatively and qualitatively [8]. In addition to qualitative modifications of protein spectrum in cold-resistant organisms during low temperature adaptations, a change in hydrophobic properties of polypeptides is also possible. The tendency to hydrophobicity increase in certain proteins is observed in many Arctic fishes [4, 6, 16] and bacteria [1–3], which proteome should be generally cold-stable. This allows preserving its native conformation and functioning at low temperatures. This tendency may be also extended to other animal species, insects for example, which are capable of cold adaptation. To reveal the protein modification one uses dehydrating agents, in particular polyethylene glycol [7, 10], which during cooling results in precipitation of proteins depending on a degree of their hydrophobicity. This research was aimed to comparatively analyze the precipitation of proteins from cold-acclimated and non-acclimated *Tenebrio molitor* larvae using PEG-6000 and to study an electrophoretic distribution of proteins from homogenates and sediments.

Materials and methods

The research was carried-out in *T. molitor* larvae (*Coleoptera: Tenebrionidae*) of last age, which namely at this ontogenesis stage became cold-resistant [20]. Larvae were maintained for 3 weeks at 5...7°C for cold-acclimation.

Homogenate was obtained from *T. molitor* in 0.6% NaCl solution with Na-phosphate buffer 0.1 M (pH 7.4) in amount of 6 larvae per 2 ml buffer. Thereafter it was centrifuged for 10 min at 1800g. The aliquot was collected from the supernatant for electrophoresis and the supernatant was passed through a filter cartridge Sartopore GF2 (Sartorius, Germany) to remove cell detritus. The aliquot was collected from filtrate for electrophoretic study. Filtrate was supplemented with PEG-6000 in 1:1 ratio, stirred and the reaction of precipitation was performed with final PEG concentrations in solution of 2, 4, 6 and 8% at 22 and 4°C for 1.5 hrs. The obtained mixture was centrifuged at 1800g for 10 min and a supernatant was collected into separate vials.

The precipitate (~50 ml) was re-suspended in 0.6% NaCl solution with 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 7.4). From the obtained solution we collected the aliquot for electrophoresis. All the amounts of dissolved precipitates we transferred into dialysis tubing (Visking type 8/32 (Serva, Germany)) of 6 mm diameter and about 5 cm length, which had a molecular weight cut-off for the substances with MW of 8–15 kDa. At the first stage we carried out dialysis of precipitate in 0.6% NaCl solution in 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 7.4) at 22°C and a constant stirring for 1.5 hrs for PEG



м. м. 8–15 кДа. На першому етапі проводили діаліз осаду в 0,6%-му розчині NaCl на 0,1М Na-фосфатному буфері (рН 7,4) при 22°C та постійному перемішуванні впродовж 1,5 години з метою видалення ПЕГ. На другому етапі дослідження мішечок переносили в насичений розчин ПЕГ-40 000 та здійснювали концентруючий діаліз (22°C) при постійному перемішуванні протягом 1,5 години. Після двохетапного діалізу відбирали аліквоти для електрофорезу. На кожному етапі експерименту вимірювали вміст білка за методом Бредфорда [4]. SDS-електорофорез проводили в градієнтному (10–25%) поліакріламідному гелі (ПААГ) за стандартною методикою [3]. Для електрофорезу використовували реактиви фірм «Sigma» (США) та «Serva» (Німеччина). Кількісну оцінку виявлених фракцій білків на доріжках SDS-ПААГ проводили за допомогою комп'ютерної програми «ImageJ» (National Institutes of Health, США). Для статистичного аналізу експериментальних даних використовували програмний пакет «StatgraphicWin 2.1» за непараметричним критерієм Манна-Уїтні. Значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Важливу роль у процесі розчинення білка у полярних системах відіграє розподіл гідрофільних і гідрофобних амінокислотних залишків на його поверхні. Саме кількість полярних амінокислотних залишків впливає на ступінь гідратації протеїнів.

Відомо, що високомолекулярні поліетиленгліколи використовуються для преципітації макромолекул, зокрема білків [6, 7] та нуклеїнових кислот [16, 17, 21]. В основі механізму осадження білків розчинами ПЕГ лежить процес дегідратації. Взаємодія ПЕГ із білками у розчині полягає в стеричному виключенні молекул ПЕГ із білкової зони за рахунок зв'язування води полімером [11, 20]. У результаті розчинність білків зменшується, що призводить до неспецифічної їх агрегації та преципітації. Ступінь осадження протеїнів залежить від багатьох параметрів, одним із яких є концентрація ПЕГ. У роботі Л.Б. Королевської та співавт. [2], у якій вивчали вплив ПЕГ на імунні комплекси, показано, що при низьких концентраціях ПЕГ відбувається преципітація переважно макромолекулярних імунних білків, а при збільшенні концентрації полімеру осаджуються білкові комплекси як великого, так і малого розміру. Зокрема, при отриманні імуноглобулінів за допомогою ПЕГ проводили оцінку агрегатного стану отриманих комплексів [2]. Встановлено, що використання двох концентрацій ПЕГ (3 та 4%) дозволяє диференціювати імунні білки (Ig M, G та A) за розміром.

removal. At the second stage we transferred tubing into the PEG-40000-saturated solution and performed concentrating dialysis at 22°C and constant stirring for 90 min. After two-stage dialysis the aliquots were collected for electrophoresis. At each stage of the experiment we measured a protein content according Bradford [18]. The SDS-electrophoresis was carried-out in gradient (10–25%) polyacrylamide gel (PAAG) by the standard technique [13]. For electrophoresis we used the Sigma (USA) and Serva (Germany) reagents. The revealed protein fractions in SDS-PAGE tracks were qualitatively assessed using ImageJ software (National Institutes of Health, USA). Experimental data were statistically processed with the Statgraphics Win 2.1 software using nonparametric Mann-Whitney U-test. Differences at $p < 0.05$ were considered as significant.

Results and discussion

The distribution of hydrophilic and hydrophobic amino acid residues on protein surface plays an important role in its dissolving in polar systems. Right the amount of polar amino acid residues affects the degree of protein hydration.

The high molecular polyethylene glycols are used for precipitation of macromolecules, particularly proteins [7, 10] and nucleic acids [14, 15, 21]. The mechanism of protein precipitation with PEG solutions is based on dehydration. The interaction of PEG with proteins in solution consists in a steric exclusion of PEG molecules from a protein environment due to water binding by polymer [5, 19]. As a result the solubility of proteins decreases, and their non-specific aggregation and precipitation occurs. The degree of protein precipitation depends on many parameters, one of which is PEG concentration. L.B. Korolevskaya *et al.* [9] studied the PEG effect on immune complexes, and demonstrated that at low concentrations of PEG the precipitation of mainly macromolecular immune proteins occurred, while when increasing the polymer concentration the protein complexes of both large and small sizes were precipitated. In particular, when obtaining immunoglobulins PEG was used to assess an aggregate state of the obtained complexes [9]. The use of two PEG concentrations (3 and 4%) was established to differentiate the immune proteins (Ig M, G and A) by size.

Due to the mentioned above facts there was a logical assumption that during a qualitative change in protein spectrum, particularly in synthesis of specific proteins (nucleator, cold shock and antifreeze proteins), or after changing their conformation during cold acclimation, the modification of protein hydration shell occurred. Application of a dehydrating agent PEG may



На підставі викладених фактів логічно було припустити, що при якісній зміні спектра білків, зокрема синтезу специфічних білків (білки-нуклеатори, білки холодового шоку, антифризні білки), або зміні їх конформації під час холодової аклімації відбувається модифікація гідратної оболонки білків. Непрямим методом виявлення таких трансформацій може бути використання дегідруючого агента ПЕГ. Припущення щодо зміни спектра білків або їх конформації під час аклімації підтверджено результатами наших експериментів. Із рис. 1, 2 видно, що в результаті преципітації за допомогою ПЕГ-6000 у діапазоні концентрацій 4–20% білки, які отримані із аклімованих личинок *T. molitor*, випадають в осад у значно більшій кількості, ніж із неаклімованих комах.

Підвищення концентрації ПЕГ-6000 від 4 до 20% призводило до збільшення кількості білка в осаді із гомогенатів аклімованих і неаклімованих личинок *T. molitor*. Значуща різниця в кількості преципітату, одержаному від аклімованих і неаклімованих особин, спостерігалась при концентраціях ПЕГ 12% і більше (рис. 1, 2). Слід зазначити, що температура, за якої проводилося осадження білків, суттєво не впливала на кількість осадженого білка. Кількість преципітованого білка при 4 та 22°C значуще не відрізнялась у аклімованих і неаклімованих личинок.

be an indirect method for revealing these transformations. The assumption as to the changes in proteins spectrum or their conformation during cold-acclimation has been confirmed by our findings. Fig. 1 and 2 show that as a result of precipitation by means of PEG-6000 within a concentration range of 4–20% the proteins, derived from cold-acclimated *T. molitor* larvae, precipitate much greater than those from non-acclimated insects.

An increase in PEG-6000 concentration from 4 to 20% led to the augmentation of protein amount in sediment from homogenates of cold-acclimated and non-acclimated *T. molitor* larvae. A significant difference in the amount of precipitate, obtained from cold-acclimated and non-acclimated species, was observed at PEG concentrations of 12% and more (Fig. 1, 2). It should be noted that the temperature, at which the proteins were precipitated, did not significantly affect the amount of precipitated protein. The amount of precipitated protein at 4 and 22°C did not significantly differ in cold-acclimated and non-acclimated larvae.

Since the dissolving the proteins in water is due to their hydration, and the stabilisation of protein molecule depends on its charge and hydration shells, consisting of the oriented water molecules, the effect of any factor, breaking hydration processes and destroying hydration shells of proteins (the main principle of dehydrating agent action), leads to their precipitation.

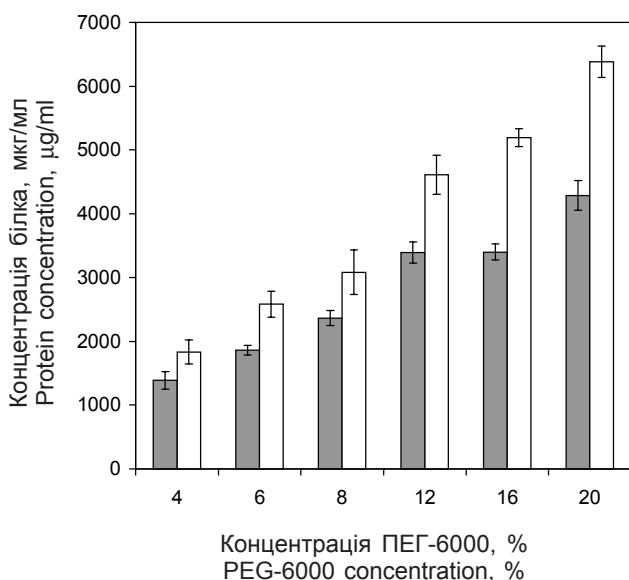


Рис. 1. Концентрація білка в осадах, отриманих після преципітації ПЕГ-6000 при 22°C із тканин личинок *T. molitor*: ■ – неаклімовані; □ – аклімовані.

Fig. 1. Concentration of proteins from *T. molitor* larvae in sediment after precipitation with PEG-6000 at 22°C: ■ – non-acclimated; □ – cold-acclimated.

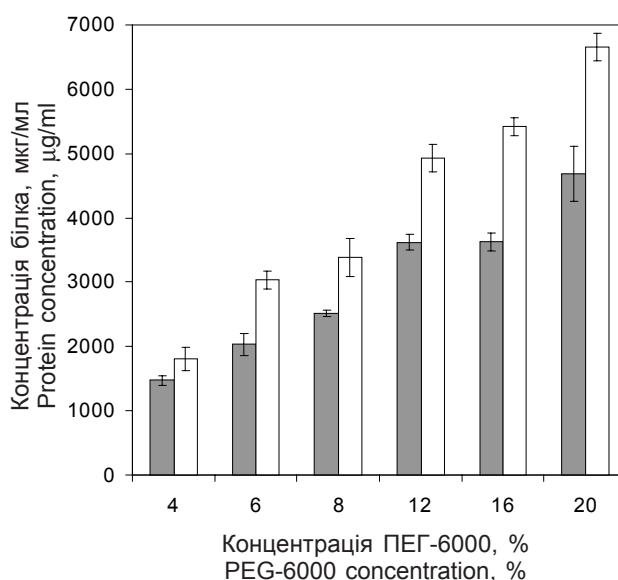


Рис. 2. Концентрація білка в осадах, отриманих після преципітації ПЕГ-6000 при 4°C із тканин личинок *T. molitor*: ■ – неаклімовані; □ – аклімовані.

Fig. 2. Concentration of proteins from *T. molitor* larvae in sediment after precipitation with PEG-6000 at 4°C: ■ – non-acclimated; □ – cold-acclimated.



Оскільки розчинення білків у воді пов'язане з їх гідратацією, а стабілізація молекули білка залежить від її заряду та гідратних оболонок, що складаються з орієнтованих молекул води, то вплив будь-яких факторів, які порушують процес гідратації та руйнують гідратні оболонки білків (головний принцип дії дегідратуючих агентів), призводить до їх осадження. Тобто можна зробити припущення, що у процесі холодової адаптації білки личинок *T. molitor* зазнають конформаційних змін, які призводять до перерозподілу полярних та неполярних груп на їх поверхні, що контактують із розчинником, обумовлюючи зниження їх стабільності у розчині ПЕГ-6000.

При порівнянні білкових спектрів фільтратів із аклімованих і неаклімованих личинок *T. molitor* було встановлено, що вони мають якісні зміни, а особливо це помітно в діапазонах м. м. 10–15 та 15–85 кДа. Зокрема, в зоні, яка відповідає м. м. 10–15 кДа, у зразках із аклімованих *T. molitor* з'являється низькомолекулярна білкова смуга з м. м. 11 кДа, а в зоні м. м. 15–85 кДа у аклімованих комах зникають білки з м. м. 22,5, 49 та 75 кДа (рис. 3). Можна припустити, що низькомолекулярні протеїни (11 кДа) належать до родини антифризних білків, які накопичуються у *T. molitor* під час холодової аклімації [14, 15, 19].

Оскільки процес дегідратації білків у присутності органічних полімерів призводить до їх агрегації, яка обумовлена електростатичними взаємодіями та ван-дер-ваальсовими силами між білковими молекулами, то на підставі отриманих даних можна припустити, що якісні зміни спектра білків або їх конформації у процесі аклімації призводять до зменшення гідрофільності частини білків та їх стабільності в присутності дегідратуючого агента ПЕГ. Висловлене припущення підтверджується даними SDS-електрофорезу осадів, отриманих під час преципітації білків із аклімованих і неаклімованих личинок *T. molitor* за допомогою ПЕГ-6000.

Як було зазначено у роботі Л.Б. Королевської та співавт. [2] у присутності ПЕГ-6000 відбувається агрегація імуноглобулінів, причому з підвищенням концентрації полімеру розмір агрегатів значно збільшується. Оскільки величина агрегатних комплексів впливає на процес електрофорезу при використанні іонного детергента SDS, а водні розчини ПЕГ із м. м. вище 3000 Да мають високу в'язкість, що призводить до спотворення електрофоретичної рухливості білкових молекул у присутності полімеру, тому нами для SDS-електрофоретичного аналізу білкових спектрів були вибрані низькі концентрації ПЕГ-6000.

Therefore we can assume that cold adaptation of the *T. molitor* larvae is accompanied with conformational changes of proteins, and thus to redistribution of polar and non-polar groups on their surfaces, which contact with solvent, thereby stipulating a decrease in their stability in PEG-6000 solution.

Comparing the protein spectra of filtrates from cold-acclimated and non-acclimated *T. molitor* larvae revealed the qualitative changes, especially noticeable within the molecular weight ranges of 10–15 and 15–85 kDa. In particular, in the MW area of 10–15 kDa, the samples from cold-acclimated *T. molitor* showed a new low-molecular protein band with 11 kDa MW, and in 15–85 kDa weight area of cold-acclimated insects the proteins with 22.5, 49 and 75 kDa MW disappeared (Fig. 3). We can assume that low molecular proteins (11 kDa) belonged to antifreeze protein family, which are accumulated in *T. molitor* during cold acclimation [11, 12, 17].

Since dehydration of proteins in the presence of organic polymers results in their aggregation, stipulated by electrostatic interactions and van-der-Waals forces

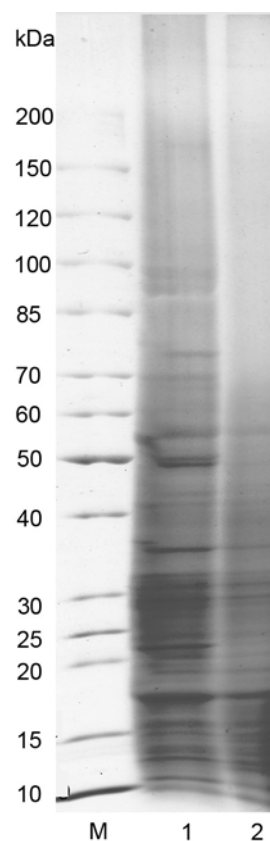


Рис. 3. Спектри білків фільтратів гомогенатів личинок *Tenebrio molitor*: М – маркери молекулярної маси; 1 – неаклімовані личинки; 2 – аклімовані личинки.

Fig. 3. Protein spectra of *Tenebrio molitor* larvae homogenate filtrates: M – molecular weight markers; 1 – non-acclimated larvae; 2 – cold-acclimated larvae.



Спектр білків преципітатів, які випадають в осад із фільтратів гомогенатів аклімованих та неаклімованих личинок *T. molitor* у присутності 4% ПЕГ-6000 при 22°C, якісно відрізняється. У преципітатах із аклімованих комах відсутні смуги з м. м. 73 та 18 кДа, які були виявлені у неаклімованих особин, а також з'являються білки з м. м. 41,5; 31,5; 28,5; 27,5; 25; 20 та 14,5 кДа. Склад білкових осадів після преципітації протеїнів із аклімованих та неаклімованих личинок за допомогою 4%-го розчину ПЕГ-6000 при 4°C також відрізняється: у аклімованих комах зникає смуга 45 кДа, а кількість білка з м. м. 56 кДа зменшується по відношенню до білкових спектрів із неаклімованих комах. При цьому в осаді з аклімованих личинок спостерігаються білки

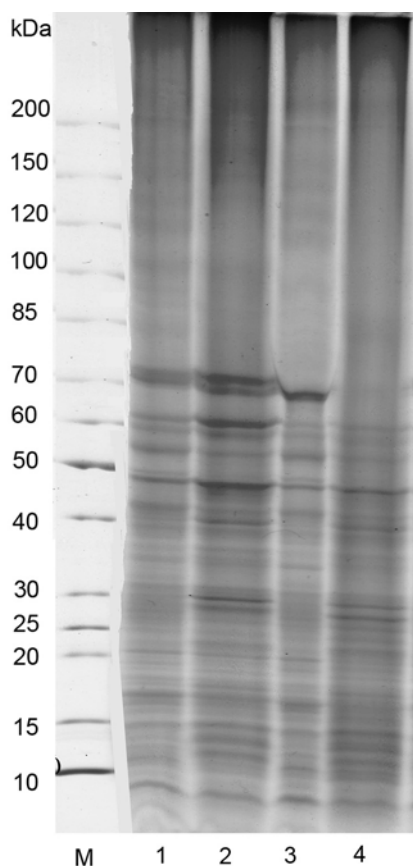


Рис. 4. Спектр білків до та після холодової аклімації *T. molitor* після преципітації їх за допомогою 4%-го ПЕГ-6000: М – маркери молекулярної маси; 1, 3 – неаклімовані личинки; 2, 4 – аклімовані личинки; 1, 2 – преципітація при 4°C; 3, 4 – преципітація при 22°C.

Fig. 4. Spectra of proteins prior to and after cold acclimation of *T. molitor* after their precipitation with 4% PEG-6000, М – molecular weight markers; 1, 3 – non-acclimated larvae; 2, 4 – cold-acclimated larvae; 1, 2 – precipitation at 4°C; 3, 4 – precipitation at 22°C.

between the protein molecules, the obtained data allowed to assume that either qualitative changes in protein spectrum or their altered conformation during acclimation resulted in a decreased hydrophilicity of some proteins and therefore their stability in the presence of a dehydrating agent PEG. The suggested assumption was confirmed by SDS-electrophoresis data of sediments, obtained during protein precipitation from cold-acclimated and non-acclimated *Tenebrio molitor* larvae using PEG-6000.

L.B. Korolevskaya *et al.* [9] described the aggregation of immunoglobulins in the presence of PEG-6000, moreover the higher was the polymer concentration the bigger was size of aggregates. Since the dimensions of aggregate complexes may affect the electrophoresis when using ionic detergent SDS, and aqueous PEG solutions with molecular weight above 3000 Da have a high viscosity, resulting in distortion of electrophoretic mobility of protein molecules in polymer presence, we selected only low concentrated PEG-6000 for SDS-electrophoretic analysis of protein spectra.

The protein range in precipitates from homogenate filtrates of cold-acclimated and non-acclimated *T. molitor* larvae in the presence of 4% PEG-6000 at 22°C, was qualitatively different. In the precipitates from cold-acclimated insects no bands with 73 and 18 kDa MW were found, unlike non-acclimated species, where these as well as the proteins with 41.5, 31.5, 28.5, 27.5, 25, 20 and 14.5 kDa MW were present. The composition of protein sediments after precipitating proteins from cold-acclimated and non-acclimated larvae using 4% PEG-6000 solution at 4°C was also different: 45 kD band disappeared in cold-acclimated insects, and the amount of protein of 56 kD MW decreased in respect to the protein spectra from non-acclimated insects. Moreover, in the precipitate from cold-acclimated larvae we observed the proteins with 42.5, 31.5, 30, 20 and 15 kDa MW. In those from acclimated larvae the amount of proteins with 62.5 and 59 kDa MW also increased during precipitation at 4°C (Fig. 4).

Thus, the spectra of revealed protein fractions from filtrates of cold-acclimated and non-acclimated *T. molitor* larvae, precipitated with 4% PEG-6000 at different temperature conditions were different.

Qualitative composition of sediment proteins, obtained by precipitation with 6% PEG-6000 from cold-acclimated and non-acclimated *T. molitor* larvae did not significantly differ from the precipitates obtained in the presence of 4% PEG-6000 (Fig. 5). Changing the precipitation temperature conditions in the presence of 6% PEG-6000 did not significantly affect a quali-

з м. м. 42,5; 31,5; 30; 20 та 15 кДа. Також у преципітатах із аклімованих личинок збільшується кількість білків із м. м. 62,5 та 59 кДа при осадженні за температури 4°C (рис. 4).

Отже, спектри виявлених білкових фракцій із фільтратів аклімованих і неаклімованих личинок *T. molitor*, преципітованих за допомогою 4%-го ПЕГ-6000 за різних температурних умов, відрізняються.

Якісний склад білків осадів, отриманих під час преципітації за допомогою 6%-го розчину ПЕГ-6000 із аклімованих і неаклімованих личинок *T. molitor*, суттєво не відрізняється від преципітатів, одержаних у присутності 4% ПЕГ-6000 (рис. 5). Зміна температурних умов преципітації у присутності 6%-го ПЕГ-6000 значно не впливає на якісний склад білкових спектрів, отриманих за умов осадження білків *T. molitor* за допомогою 4% ПЕГ-6000 при аналогічних температурах. Однак у осадах, отриманих із гомогенатів аклімованих личинок *T. molitor* під час преципітації за допомогою 6% ПЕГ-6000 при 22°C, з'являються білкові смуги із м. м. 73 та 62,5 кДа, які відсутні за умов преципітації 4%-м розчином ПЕГ-6000 при аналогічних температурах.

Отже, як видно з проведених досліджень із використанням SDS-електрофорезу та дегідратуючого агента ПЕГ-6000, у процесі холодової адаптації личинок *T. molitor* спостерігаються якісні зміни їх білків, про що свідчать поява білкових смуг на електрофореграмах із іншою електрофоретичною рухливістю та випадання в осад значно більшої кількості білків із гомогенатів аклімованих личинок. Виявлені факти можуть бути пов'язані з процесами перепрограмування генетичного апарату холодостійких комах у процесі їх аклімації або з формуванням альтернативних форм існуючих білків (ізоформ), або з конформаційними змінами білків, які відбуваються за рахунок наявності у аклімованих комах низькомолекулярних криозахисних речовин (цукри та поліоли), які в результаті взаємодії з протеїнами призводять до стабілізації білків в умовах переохолодження.

Висновки

У результаті проведених досліджень виявлена різниця в електрофоретичній рухливості білків із фільтратів аклімованих і неаклімованих личинок *T. molitor*. Доведено, що білки холодоаклімованих личинок *T. molitor* випадають в осад у більшій кількості, ніж білки з неаклімованих комах, що може свідчити про конформаційні зміни білків у процесі холодової адаптації.

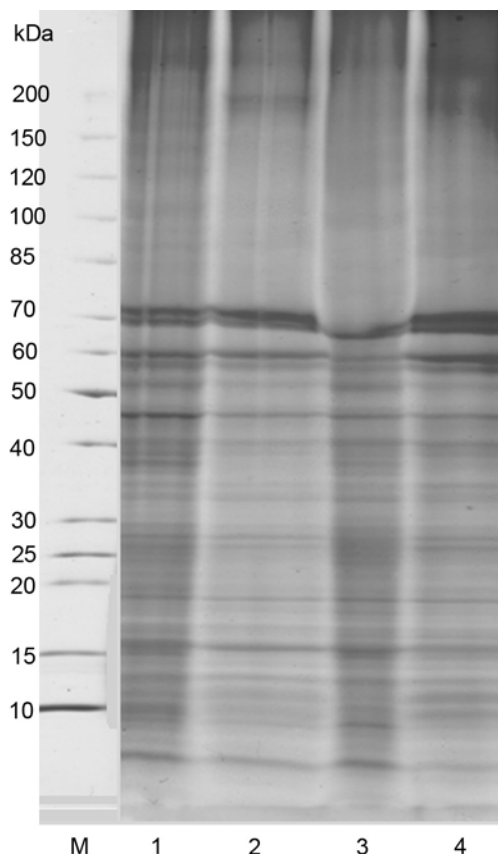


Рис. 5. Спектр білків до та після холодової аклімації *T. molitor* після преципітації їх за допомогою 6%-го ПЕГ-6000: М – маркери молекулярної маси; 1, 3 – неаклімовані личинки; 2, 4 – аклімовані личинки; 1, 2 – преципітація при 4°C; 3, 4 – преципітація при 22°C.

Fig. 5. Spectra of proteins prior to and after cold acclimation of *T. molitor* after their precipitation with 6% PEG-6000, M – molecular weight markers; 1, 3 – non-acclimated larvae; 2, 4 – cold-acclimated larvae; 1, 2 – precipitation at 4°C; 3, 4 – precipitation at 22°C.

tative composition of protein spectra obtained during *T. molitor* protein precipitation with 4% PEG-6000 at similar temperatures. However, in the sediments, obtained from homogenates of cold-acclimated *T. molitor* larvae during precipitation with 6% PEG-6000 at 22°C, the protein bands with 73 and 62.5 kDa MW appeared, which were absent in precipitates with 4% PEG-6000 under similar temperature conditions.

Thus, the studies with SDS-electrophoresis and dehydrating agent PEG-6000 allowed to reveal the qualitative changes in proteins following *T. molitor* larvae cold adaptation, evidenced as the appearance of protein bands with other electrophoretic mobility in electrophoregrams and precipitation of significantly higher amount of proteins from homogenates of cold-acclimated larvae. Our findings may be associated either with the reprogramming of genetic apparatus of



Литература

1. Гулевский А.К., Рязанцев В.В., Грищенко Е.А., Релина Л.И. Изменения в спектре белков личинок большого мучного хрущака (*Tenebrio molitor*) в период холодной акклимации // Проблемы криобиологии. – 1995. – №4. – С. 29–32.
 2. Королевская Л.Б., Шмагель К.В. Спектротурбидиметрическое определение размера иммунных агрегатов сывороток крови, образованных в полиэтиленгликоле // Иммунология. – 2010. – Т. 31, №2. – С. 108–111.
 3. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. – М.: Наука, 1981. – 288 с.
 4. Скоупс Р. Методы очистки белков: пер. с англ. проф. В.К. Антонова. – М.: Мир, 1985. – 358 с.
 5. Яхонтов В.В. Вредители сельскохозяйственных растений и продуктов Средней Азии и борьба с ними. – Ташкент: Госиздат УзбССР, 1953. – 663 с.
 6. Пат. № 2264826, РФ, МПК А61К39/395. Способ получения антитимоцитарного глобулина для внутривенного введения / В.Л. Голубева, Е.В. Титова, Л.И. Новикова и др.; заявл. 30.12.2004; опубл. 27.11.2005.
 7. Пат. № 2112799, РФ, МПК С12Н5/02. Способ получения ростовых протеинов из сывороток крови различных видов животных / Г.А. Костина, И.Ф. Радаева, С.Б. Шмелева, М.А. Андреева; заявл. 16.02.1996; опубл. 10.06.1998.
 8. Aghajari N., Feller G., Gerday C. et al. Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplanctis* α -amylase give insights into cold adaptation at a molecular level // Structure. – 1998. – Vol. 6, №12. – P. 1503–1516.
 9. Alvarez M., Zeelen J.P., Mainfroid V. et al. Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273, №4. – P. 2199–2206.
 10. Arnorsdottir J., Smaradottir R.B., Magnusson O. et al. Characterization of a cloned subtilisin-like serine proteinase from a psychrotrophic *Vibrio* species // Eur. J. Biochem. – 2002. – Vol. 269, №22. – P. 5536–5546.
 11. Bhat R., Timasheff S.N. Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols // Protein Science. – 1992. – Vol. 1. – P. 1133–1143.
 12. Ciardiello M.A., Camardella L., Carratore V. et al. L-glutamate dehydrogenase from the antarctic fish *Chaenocephalus aceratus*. Primary structure, function and thermodynamic characterisation: relationship with cold adaptation // Biochim Biophys Acta. – 2000. – Vol. 1543, №1. – P. 11–23.
 13. Fields P.A., Houseman D.E. Decreases in activation energy and substrate affinity in cold-adapted A4-lactate dehydrogenase: evidence from the Antarctic notothenioid fish *Chaenocephalus aceratus* // Mol. Biol. Evol. – 2004. – Vol. 21, №12. – P. 2246–2255.
 14. Liou Y.C., Daley M.E., Graham L.A. et al. Folding and structural characterization of highly disulfide-bonded beetle antifreeze protein produced in bacteria // Protein Expr. Purif. – 2000. – Vol. 19, №1. – P. 148–157.
 15. Marshall C.B., Daley M.E., Graham L.A. et al. Identification of the ice-binding face of antifreeze protein from *Tenebrio molitor* // FEBS Lett. – 2002. – Vol. 529, №2–3. – P. 261–267.
 16. Paithankar K.R., Prasad K.S. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol // Nucleic Acids Res. – 1991. – Vol. 19, №6. – P. 1346.
 17. Peng J., Xia Z., Chen L. et al. Rapid and Efficient Isolation of High-quality small RNAs from recalcitrant plant species rich in polyphenols and polysaccharides // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, №5. – e95687.
 18. Rizzello A., Romano A., Kottrab G. et al. Protein cold adaptation strategy via a unique seven-amino acid domain in the icefish (*Chionodraco hamatus*) PEPT1 transporter // PNAS. – 2013. – Vol. 110, №17. – P. 7068–7073.
- cold-resistant insects during their cold-acclimation or the formation of alternative forms of existing proteins (isoforms), or conformational changes in proteins, occurring due to the presence in cold-acclimated insects of low molecular cryoprotective substances (sugars and polyols), which could lead to their stabilisation during supercooling as a result of interaction with proteins.

Conclusions

In our findings we revealed the difference in electrophoretic mobility of proteins from filtrates of cold-acclimated and non-acclimated *T. molitor* larvae. It was proven that the proteins from cold-acclimated *T. molitor* larvae precipitated in greater amount, than those from non-acclimated insects, that might indicate conformational changes in proteins during cold adaptation.

References

1. Aghajari N., Feller G., Gerday C. et al. Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplanctis* α -amylase give insights into cold adaptation at a molecular level. Structure 1998; 6 (12): 1503–1516.
2. Alvarez M., Zeelen J.P., Mainfroid V. et al. Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. J Biol Chem 1998; 273 (4): 2199–2206.
3. Arnorsdottir J., Smaradottir R.B., Magnusson O. et al. Characterization of a cloned subtilisin-like serine proteinase from a psychrotrophic *Vibrio* species. Eur J Biochem 2002; 269 (22): 5536–5546.
4. Ciardiello M.A., Camardella L., Carratore V. et al. L-glutamate dehydrogenase from the antarctic fish *Chaenocephalus aceratus*. Primary structure, function and thermodynamic characterisation: relationship with cold adaptation. Biochim Biophys Acta 2000; 1543 (1): 11–23.
5. Bhat R., Timasheff S.N. Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols. Protein Science 1992; 1: 1133–1143.
6. Fields P.A., Houseman D.E. Decreases in activation energy and substrate affinity in cold-adapted A4-lactate dehydrogenase: evidence from the Antarctic notothenioid fish *Chaenocephalus aceratus*. Mol Biol Evol 2004; 21 (12): 2246–2255.
7. Golubeva V.L., Titova E.V., Novikova L.I. et al. A method for producing antithymocyte globulin for intravenous administration. Patent of Russian Federation N2264826; IPC A61K39/395. 2005 Nov 27.
8. Gulevsky A.K., Ryazantsev V.V., Grischenkova Ye.A., Relina L.I. Changes in protein composition of mealworms (*Tenebrio molitor*) during cold acclimation. Problems of Cryobiology 1995; (4): 29–32.
9. Korolevskaya L.B., Shmagel K.V. Spectroturbidimetric determination of serum aggregates formed in polyethylene glycol. Immunologiya 2010; 31 (2): 108–111.
10. Kostina G.A., Radaeva I.F., Shmeleva S.B., Andreeva M.A. A method for producing growth proteins from blood serum of different animal species. Patent of Russian Federation N2112799 IPC C12N5/02. 1998 June 10.
11. Liou Y.C., Daley M.E., Graham L.A. et al. Folding and structural characterization of highly disulfide-bonded beetle antifreeze protein produced in bacteria. Protein Expr Purif 2000; 19 (1): 148–157.



19. Qin W., Walker V.K. *Tenebrio molitor* antifreeze protein gene identification and regulation // *Gene*. – 2006. – Vol. 367. – P. 142–149.
20. Shulgin I.L., Ruckenstein E. Preferential hydration and solubility of proteins in aqueous solutions of polyethylene glycol // *Biophysical Chemistry*. – 2006. – Vol. 120. – P. 188–198.
21. Zhangyong He., Ying Zhu., Hongchen Gu. A new method for the determination of critical polyethylene glycol concentration for selective precipitation of DNA fragments // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2013. – Vol. 97, №20. – P. 9175–9183.
12. Marshall C.B., Daley M.E., Graham L.A. et al. Identification of the ice-binding face of antifreeze protein from *Tenebrio molitor*. *FEBS Lett* 2002; 529 (2–3): 261–267.
13. Osterman L.A. *Methods of investigating proteins and nucleic acids: Electrophoresis and ultracentrifugation*. Moscow, Nauka; 1981.
14. Paithankar K. R., Prasad K. S. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Res* 1991; 19 (6): 1346.
15. Peng J., Xia Z., Chen L. et al. Rapid and efficient isolation of high-quality small RNAs from recalcitrant plant species rich in polyphenols and polysaccharides. *PLoS ONE* 2014; 9 (5): e95687.
16. Rizzello A., Romano A., Kottrab G. et al. Protein cold adaptation strategy via a unique seven-amino acid domain in the icefish (*Chionodraco hamatus*) PEPT1 transporter. *PNAS* 2013; 110 (17): 7068–7073.
17. Qin W., Walker V.K. *Tenebrio molitor* antifreeze protein gene identification and regulation. *Gene* 2006; 367: 142–149.
18. Scopes R. *Methods of protein purification*. Moscow, Mir; 1985.
19. Shulgin I.L., Ruckenstein E. Preferential hydration and solubility of proteins in aqueous solutions of polyethylene glycol. *Biophysical Chemistry* 2006; 120: 188–198.
20. Yakhontov V.V. *Pests of agricultural plants and products of Central Asia and actions against them*. Tashkent, Gosizdat UzSSR; 1953.
21. Zhangyong He., Ying Zhu., Hongchen Gu. A new method for the determination of critical polyethylene glycol concentration for selective precipitation of DNA fragments. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013; 97 (20): 9175–9183.

