

В. Г. КЛИМЕНКО, Р. И. ТКАЧЕНКО

**ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВ СОЗРЕВАЮЩИХ СЕМЯН ГОРОХА  
ХРОМАТОГРАФИЕЙ НА ДЭАЭ-ЦЕЛЛЮЛОЗЕ И ЭЛЕКТРОФОРЕЗОМ  
НА БУМАГЕ**

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 10 III 1970)

На ранних стадиях созревания семян гороха в них содержится больше вицилина, чем легумина, к концу же созревания отношение становится обратным. В процессе созревания биосинтез вицилина и легумина протекает с различной скоростью и независимо один от другого (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>). Решающее влияние на количественное соотношение вицилина и легумина оказывает стадия созревания семян. Однако до настоящего времени нет достаточно убедительных данных об изменчивости состава и электрофоретического поведения легуминов и вицилинов, а также соотношения белков и нуклеиновых кислот в созревающих семенах гороха.

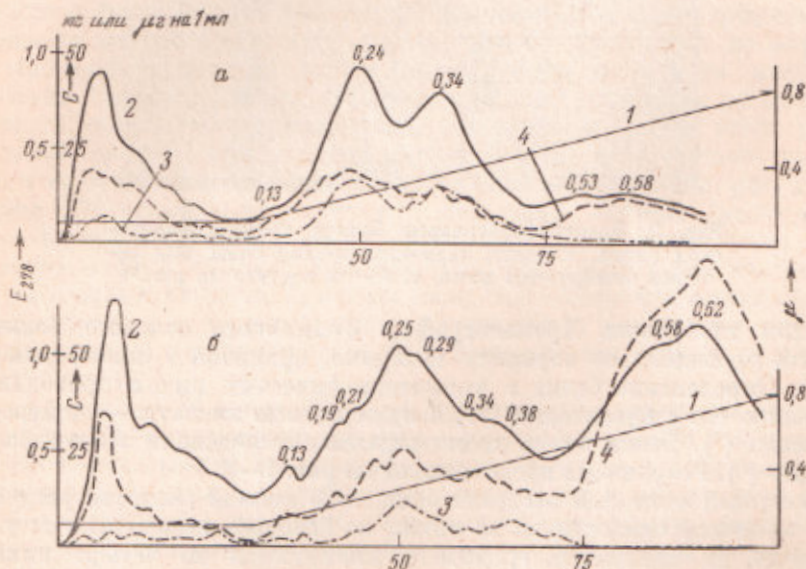


Рис. 1. Хроматограммы суммарных солевых белковых экстрактов семян гороха. а — полная спелость, б — молочная спелость. Колонки  $30 \times 1,3$  см. Нанесено белка  $\sim 100$  мг. Скорость элюирования 15 мл/час. 1 — ионная сила буфера (рН 7,9); 2 — экстинкция при 278 м $\mu$ ; 3 — концентрация (С) белка (мг/мл), 4 — концентрация (С) нуклеиновых кислот (μг/мл)

Целью настоящих исследований было разделение белкового комплекса семян гороха полной и молочной спелости хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе, а в хроматографических фракциях (пиках) — определение содержания белков и нуклеиновых кислот, а также изучение белков фракций при помощи электрофореза на бумаге.

Для исследований были взяты семена гороха сорт Кормовой-24. Стадию созревания определяли по содержанию в семенах влаги (<sup>3</sup>). После

освобождения семян от створок бобов их как можно быстрее освобождали от кожуры и осевой части зародыша, замораживали и подвергали лиофильной сушке. Высушенные семядоли молочной спелости, содержавшие 83% воды, и семядоли полной спелости превращали в тончайшую муку, которую обезжиривали этиловым эфиром. Суммарные белки количественно извлекали 1 M NaCl, забуференным фосфатами до pH 7,0. Независимо от стадии созревания семян, около 90% белков полученного экстракта

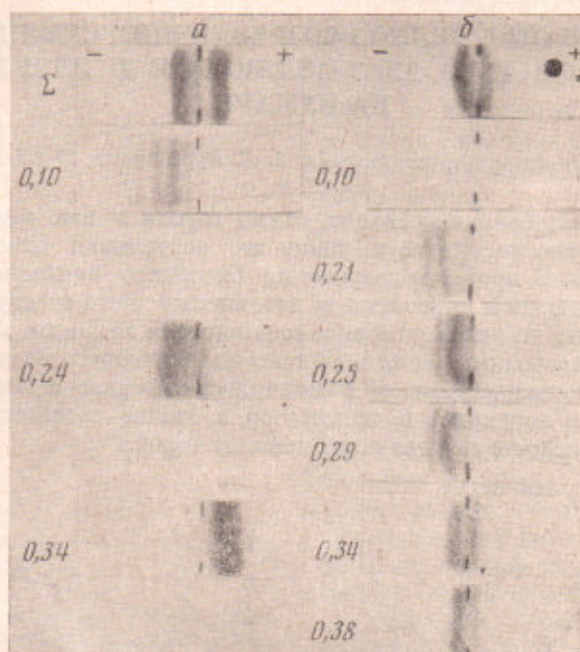


Рис. 2. Электрофореграммы белков хроматографических пиков. Указаны величины ионной силы, при которых элюируются пикки. а, б — то же, что на рис. 1

составляли глобулины. Хроматографию суммарного солевого белкового экстракта проводили по варианту методики, принятой в нашей лаборатории (4). Определение белка в хроматографических пиках проводили по связыванию его с красителем (5), а нуклеиновые кислоты — спектрофотометрически (6). Белки пиков хроматограммы исследовали электрофорезом на бумаге (7). Результаты представлены на рис. 1—3.

Суммарный белковый экстракт семядолей полной спелости разделился на 9, а молочной спелости на 13 пиков, из которых, независимо от стадии созревания, до наложения градиента элюируются по четыре пика. На хроматограмме семядолей молочной спелости обнаружены пикки 0,19; 0,21; 0,29 и 0,38, которые отсутствуют на хроматограмме семядолей полной спелости. В пиках хроматограммы семядолей молочной спелости, по сравнению с семядолями полной спелости содержится больше нуклеиновых кислот и меньше белка. Независимо от стадии созревания, из суммарных белковых экстрактов при высоких ионных силах элюируются пикки 0,53; 0,58 и 0,58; 0,63, в которых полностью отсутствуют белки и обнаружены только свободные нуклеиновые кислоты. То, что эти пикки представлены свободными нуклеиновыми кислотами, подтверждается и спектрами их поглощения (см. рис. 3). Отсутствие белка доказано отрицательной реакцией с ТХУ и отсутствием осадка при насыщении их растворов серно-кислым аммонием.

Судя по спектрам поглощения, суммарные белковые экстракты семядолей молочной спелости представлены белковыми, смешанными (белки

с нуклеиновыми кислотами) и небелковыми (свободными нуклеиновыми кислотами) пиками, тогда как в суммарных белковых экстрактах семядолей молочной спелости белковые пики отсутствуют, а обнаружены только смешанные и небелковые пики (см. рис. 3). Хотя спектры поглощения в общем и отражают природу хроматографических пиков, все же прямое определение нуклеиновых кислот показало, что в отдельных пиках количество их незначительно, но зато присутствуют они во всех пиках хроматограмм. Белки сосредоточены в пиках, элюирующихся исходным буфером и после наложения градиента при ионной силе 0,34—0,38. Отсюда следует, что только при сочетании данных спектров поглощения и прямого определения белков и нуклеиновых кислот можно получить результаты высокой достоверности.

Не лишены интереса данные об электрофоретическом поведении белков хроматографических пиков. Суммарный белковый экстракт семядолей полной и молочной спелости при электрофорезе разделился на две зоны — анодную и катодную. Следовательно, на качественный электрофоретический состав белков стадия созревания влияния не оказывает. Однако на белки первого пика, элюирующегося до наложения градиента, стадия созревания влияет значительно. Белки этого пика из семядолей полной спелости при электрофорезе дали четыре катодных зоны, а из семядолей молочной спелости — только одну (см. рис. 2). Белки пика 0,21, который отсутствует в семядолях полной спелости, при электрофорезе разделились на три катодные зоны. Белок пика  $R_f$  0,24 семядолей полной спелости при электрофорезе разделился на три зоны, одна из которых анодная, белок же пика 0,25 семядолей молочной спелости дал только две катодные зоны. Аналогичные результаты электрофореза получены и по белкам пика 0,29, который отсутствует в семядолях полной спелости.

Белки пиков 0,34 разделились на две электрофоретические зоны независимо от стадии созревания, но если в семядолях полной спелости анодная зона количественно превалирует над катодной, то в семядолях молочной спелости анодная и катодная зоны находятся в практически равных соотношениях. То же отмечается и в электрофоретическом поведении белков пика 0,38, который не обнаружен в семядолях полной спелости. Создается впечатление, что по мере созревания семян появляются анодные электрофоретические зоны, свидетельствующие о нарастании содержания легуминоподобных белков.

Полученные данные свидетельствуют о том, что на ранних стадиях созревания семян в них из белков в основном синтезируются глобулины. По качественному электрофоретическому составу между суммарными глобулинами семядолей молочной и полной спелости различий не обнаружено, но анодный компонент семядолей полной спелости количественно преобладает над катодным компонентом, тогда как в семядолях молочной спелости больше катодного и меньше анодного компонента. Следовательно, на ранних стадиях созревания происходит преимущественно биосинтез вицилинов, к концу же созревания усиливается биосинтез легуминов.

Таким образом, в хроматографическом поведении белков, элюирую-

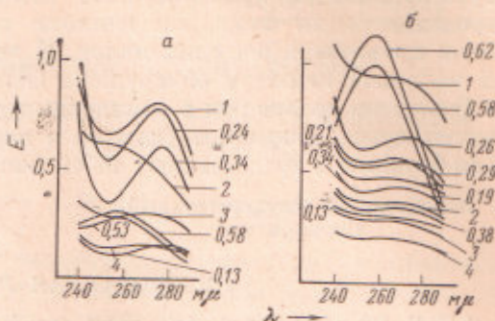


Рис. 3. Спектрограммы хроматографических пиков. Указаны величины ионной силы, при которых элюируются пики. а, б — то же, что на рис. 1

щихся при различных ионных силах буфера, и в электрофоретическом составе белков хроматографических пиков между белками семядолей молочной и полной спелости обнаружены существенные различия, выражающиеся в том, что на хроматограмме суммарных белковых экстрактов семядолей молочной спелости обнаружены пики 0,19, 0,21, 0,29 и 0,38, отсутствующие на хроматограмме семядолей полной спелости. Стадия созревания семян оказывает влияние и на электрофоретический состав белков хроматографических пиков. В хроматографических пиках семядолей молочной спелости обнаружено больше нуклеиновых кислот и меньше белков по сравнению с семядолями полной спелости. Судя по данным электрофореза, вицилины (катодные компоненты) не являются однородными белками, а представляют собой сложные соединения.

Кишиневский государственный  
университет

Поступило  
9 III 1970

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> С. Е. Danielsson, Acta chem. scand., 6, 149 (1952). <sup>2</sup> В. Г. Клименко, Р. И. Пинегина, Биохимия, 29, 377 (1964). <sup>3</sup> А. А. Прокофьев, В. П. Холодова, Физиол. раст., 6, 190 (1959). <sup>4</sup> И. А. Вайнтрауб, А. Д. Шутов, Биохимия, 29, 863 (1964). <sup>5</sup> Ю. Я. Гофман, Авт. свид. СССР № 159059, 1963; Бюлл. изобр. № 23, 61 (1963). <sup>6</sup> А. С. Спириц, Биохимия, 23, 656 (1958). <sup>7</sup> В. В. Саянова, Биохимия, 29, 590 (1964).