

Э. Н. ЗЯБРЕВА

К ВОПРОСУ О КОМПОНЕНТНОМ СОСТАВЕ ЗЕИНА МУТАНТА ОПАК-2 И ОБЫЧНОЙ ЗУБОВИДНОЙ КУКУРУЗЫ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 11 VI 1970)

Исследования белкового комплекса мутанта кукурузы Опак-2 на уровне различных по растворимости белковых фракций (¹⁻³) выявили характерную для опака специфичность в количественном отношении фракций зеин/глютелин. В три раза меньше (по сравнению с обычной кукурузой) содержание зеина и в два раза большее содержание глютелинов в общем белке эндосперма Опак-2 повышают биологическую ценность зерна этого мутанта. Нами проводятся работы в поиске специфики белков мутантов в пределах различных по растворимости фракций. Данная статья посвящена восстановительному расщеплению спиртоэкстрагируемой фракции зеина, электрофоретическому разделению диссоциированного комплекса и качественному аминокислотному составу некоторых компонентов.

Для анализа были взяты две формы зубовидной кукурузы — сорт-синтетик Оpaque-2 Synthetic A, генотип (O₂O₂O₂) и обычная линия Ку 102A, генотип (+++). Общие биохимические анализы показали, что в эндосперме линии O₂ Synthetic A содержится 11,31% белка и 3,11% суммарного лизина. В эндосперме линии Ку 102 A содержится 10,69% белка и 1,99% суммарного лизина. Зеин эндосперма этой линии составляет 41,7%, на долю незейнового белка приходится 58,33%. Зеин сорта-синтетика Опак-2 состав-

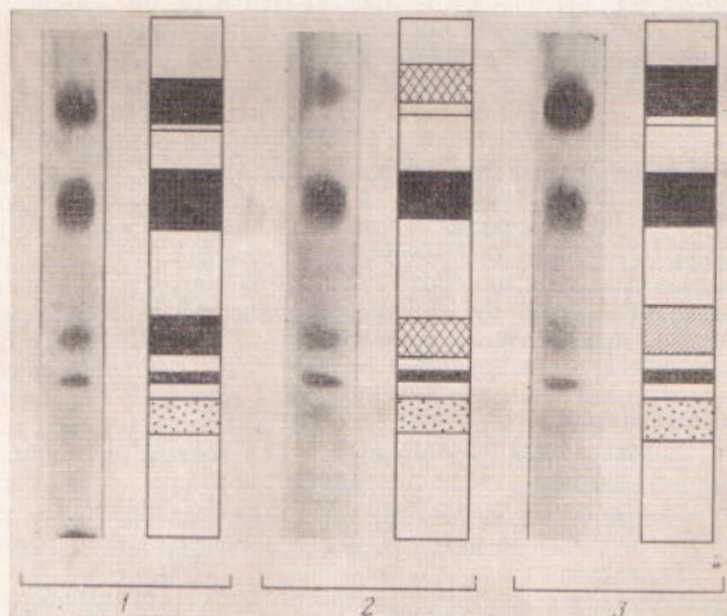


Рис. 1. Электрофореграммы субъединиц зеина, расщепленных с помощью додецилсульфата натрия. Обычная кукуруза, линия T44 (1), линия Ку 303 (2), Опак-2 кукуруза, сорт-синтетик O₂ Synthetic A (3)

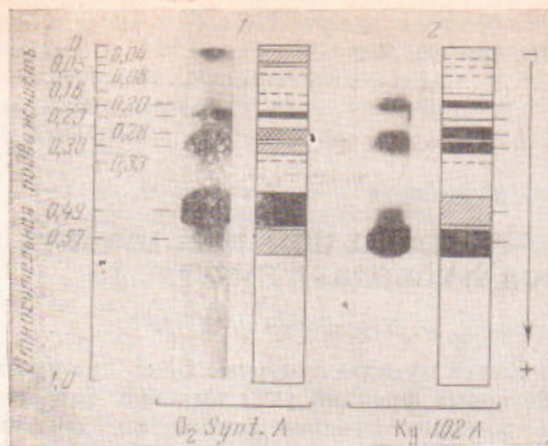


Рис. 2. Электрофореграммы зеина, расщепленного по водородным, гидрофобным и дисульфидным связям. Онан-2 кукуруза, сорт-синтетик O_2 Synthetic A (1), обычная кукуруза, линия Ky 102 A (2)

дисульфидным связям проводили по методу Саммерса и Майзеля с некоторыми дополнениями (4). Зеин (900 мкг) растворяли в 0,1 мл ледяной уксусной кислоты и добавляли 0,4 мл 0,1 M натрий-фосфатного буферного раствора с pH 7,2, 4% додецилсульфат натрия (СДС), 0,5 M мочевины и 0,1 M β -меркаптоэтанол. В качестве защитных добавок использовали 0,005 M цистин, 0,05 M ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота — Натсоль), 0,05 M аскорбиновую кислоту (5, 6). Реакция проводилась в вакуум-эксикаторе, заполненном аргоном, в течение 4 час. при температуре 30° (10). По истечении реакции в качестве алкилирующего агента добавлялась 0,2 M моноиодуксусная кислота с предварительным введением 0,005 M цистина и 0,05 M аскорбиновой кислоты (5, 7). Чтобы свести побочные процессы алкилирования и частичное разрушение белка (возможное в результате окисления) к минимуму, реакция проводилась в темноте в течение 15—20 мин. при комнатной температуре. Избыток моноиодуксусной кислоты тотчас связывался добавлением 0,2 M β -меркаптоэтанола. Обработанный таким образом зеин подвергался диализу против 0,01 M натрий-фосфатного буферного раствора, pH 7,2 (в 200-кратном объеме), содержащего 0,1% 0,5 M мочевины, в течение 24 час. при комнатной температуре. Проводилась двукратная смена диализационных растворов.

Зафиксированные и окрашенные белковые компоненты электролировались с геля по методу, принятому на кафедре органической и биологической химии Московского педагогического института им. В. И. Ленина, с дополнительным введением в электролирующий раствор СДС, растворяющего белковые компоненты, осажденные трихлоруксусной кислотой. Выделенный белок гидролизовали 24 часа при 104° 20% HCl. В полученных растворах определяли качественный аминокислотный состав методом тонкослойной хроматографии с использованием порошка целлюлозы марки MN-300 и системы растворителей бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода (94 : 63 : 19 : 75) (8) и методом хроматографии на бумаге (9).

Согласно литературным данным (8), спиртоэкстрагируемые белки растений (пшеницы, риса, кукурузы) содержат значительное число дисульфидных связей и отличаются трудностью электрофоретического разделения (11—13). Лучшему электрофоретическому разделению препарата зеина способствует разрушение надмолекулярной структуры белковых молекул. Электрофоретическое разделение нативного и восстановленного по ди-

ляет 21,00% от суммарного белка, на долю незееинового белка приходится 79%. Зеин выделялся из обезжиренной муки эндосперма 70% этиловым спиртом в течение часа при комнатной температуре. Экстракт подвергался центрифугированию (15 мин., 3000 об/мин). Диализ зеина против дистиллированной воды длился 48 час. при +2° со сменой воды через 4 часа. Выпавший в осадок зеин отделялся центрифугированием (15 мин., 3000 об/мин), осадок зеина подвергался лиофильной сушке. Расщепление зеина по водородным, гидрофобным и

сульфидным связям зеина (⁶) в крахмальном и агаровом геле позволило отметить в нативном препарате 8 компонентов, 2 из которых наиболее крупные. По данным работы (⁶), у зеина, расщепленного на субъединицы, после электрофоретического с разделением в крахмальном геле отмечается присутствие 4 компонентов, причем 2 из них крупные. Число компонентов и концентрация каждого из них у окисленного, сульфид-восстановленного и восстановленного - алкилированного препаратов зеина были одинаковыми. Сравнение подвижности этих субъединиц позволяет отметить лишь незначительные различия между белковыми компонентами, полученными разными методами расщепления препарата.

Сходство диссоциированных компонентов, полученных разными способами, в том числе сходство в концентрации и подвижности, свидетельствует о том, что разрушение дисульфидных связей зеина приводит к образованию индивидуальных полипептидных цепей, способных мигрировать в геле.

Электрофорез зеина обычной зубовидной кукурузы и мутантов Опак-2 и Флаури-2 в крахмальном геле в присутствии 6 М мочевины (¹³) позволил обнаружить в различных препаратах от 5 до 13 компонентов, 4 из которых наиболее крупные. Различий в числе компонентов у мутантов и обычной кукурузы не было отмечено. Однако наблюдаются различия в интенсивности окрашивания отдельных компонентов. Результаты, полученные Конаревым и сотрудниками (¹⁴) при электрофоретическом разделении зеина различных подвидов кукурузы и мутанта Опак-2 в полиакриламидном геле в присутствии 35% уксусной кислоты и 5 М мочевины, позволили обнаружить 8 компонентов, из которых 2 наиболее крупные. Характерной особенностью электрофоретических спектров зеина Опак-2 кукурузы является обедненный компонентный состав. У образцов с полным насыщением в ге-

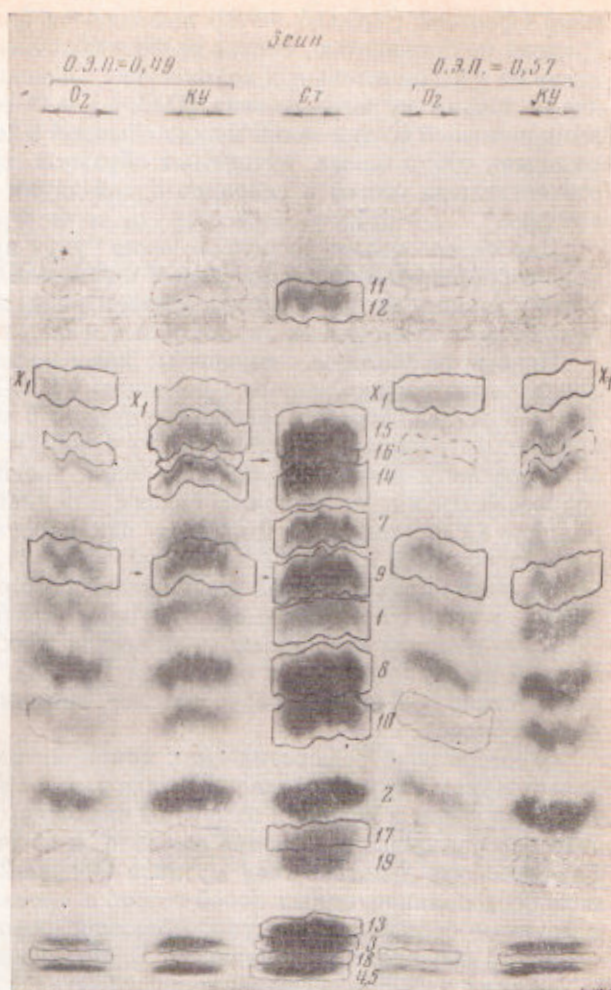


Рис. 3. Бумажная хроматограмма аминокислотного состава субъединиц зеина эндосперма. O_2 — опаквый сорт-синтетик O_2 Synthetic A, Ky — линия обычной кукурузы Ky 102 A. $Ст.$ — стандартная смесь аминокислот: 11, 12 — цистины, X — неидентифицированное пятно, 15 — лизин, 16 — гистидин, 14 — аргинин, 7 — аспарагиновая кислота, 9 — серин, 1 — глицин, 8 — глютаминовая кислота, 10 — треонин, 17 — пролин, 19 — тирозин, 13 — метионин, 3 — валин, 18 — фенилаланин, 4 — лейцин, 5 — изолейцин

поме Ораque-2 ($O_2O_2O_2$) четко выявляются два крупных компонента со средней подвижностью, синтез других подавлен, однако возможно присутствие их в незначительных количествах. Образцы кукурузы Опак-2 с одной-двумя дозами мутантного гена (O_2O_2+) и O_2++) имеют промежуточный компонентный состав зеина между обычной и мутантной кукурузой. Следовательно, отбор новых мутантных образцов при насыщении эндосперма отечественных линий и гибридов одной-двумя дозами гена Ораque-2 затруднен.

Нас интересовало, насколько четко будут проявляться различия в компонентах зеиновой фракции Опак-2 и обычной кукурузы при диссоциации этого сложного белка под воздействием ряда химических реагентов, расщепляющих водородные, гидрофобные и дисульфидные связи.

Первые результаты, полученные нами по электрофоретическому разделению зеина расщепленного с помощью 1% СДС, свидетельствуют о наличии у образцов Опак-2 и обычной кукурузы 6 компонентов, имеющих близкую относительную подвижность (¹¹) (рис. 1). Последние исследования по электрофоретическому разделению зеина, расщепленного по водородным, гидрофобным и дисульфидным связям в полиакриламидном геле, показали наличие 11 компонентов, имеющих одинаковую относительную подвижность у обычной и Опак-2 кукурузы (рис. 2), четыре из них наиболее интенсивно окрашены. Два подвижных компонента (о.э.п. 0,49 и 0,57) имеют у мутанта и обычной кукурузы противоположное окрашивание.

Качественный аминокислотный состав этих компонентов зеина, выявленный на тонкослойной и бумажной (рис. 3) хроматограммах, отражает присутствие большинства аминокислот, типичных для растительных и животных белков.

Сходство электрофоретических компонентов в числе и подвижности и качественном аминокислотном составе двух наиболее подвижных компонентов у опаковой и обычной кукурузы свидетельствует о значительном сходстве диссоциированного зеина мутанта и обычной зубовидной кукурузы. Вероятно, что действие гена мутанта Ораque-2 не сказывается на синтезе исходных полипептидных цепей зеина, а проявляется на уровне сборки их в крупные белковые молекулы, подавляя синтез некоторых из них.

Автор выражает благодарность В. И. Сафонову и М. П. Сафоновой за внимание к работе и обсуждение результатов.

Институт физиологии растений
им. К. А. Тимирязева
Академии наук СССР
Москва

Поступило
10 VI 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. T. Mertz, O. Nelson et al., *Adv. Chem. Series*, 57, 228 (1966). ² А. Мусийко, П. Ключко и др., *Вестн. с.-х. науки*, № 5, 60 (1969). ³ М. Хаджинов, М. Будная и др., *Вестн. с.-х. науки*, № 6, 11 (1969). ⁴ D. F. Summers, J. V. Maizel jr., J. E. Darnell, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 54, 2, 505 (1965). ⁵ Byoung-kuk-Seon, *J. Biochem.*, 61, 5, 606 (1967). ⁶ J. E. Turner, J. Boundy, R. Dimler, *Cereal Chem.*, 42, 5, 452 (1965). ⁷ M. Sela, F. White jr., Ch. Aneinsen, *Biochim. et biophys. acta*, 31, 2, 417 (1959). ⁸ C. L. de Ligny, E. C. M. Kok, *J. Chromatogr.*, 38, № 2, 224 (1968). ⁹ Ю. Б. Филиппович, *Уч. зап. кафедры органической и биологической химии Московск. гос. пед. инст. им. В. И. Ленина*, в. 9, 147 (1958). ¹⁰ E. T. Mertz, N. E. Lloyd, R. Bressani, *Cereal Chem.*, 35, 146 (1958). ¹¹ В. И. Сафонов, Э. Н. Зябрева, *Сборн. Физиология и биохимия сорта, ч. I, Иркутск, 1969*, стр. 96. ¹² А. Б. Силаев, *Ле Зоан Зиец*, В. И. Сафонов, *Прикл. биохим. и микробиол.*, 1, № 2, 250 (1965). ¹³ J. Mosse, *Federat. Proc.*, 25, 6, 1663 (1966). ¹⁴ В. Г. Конарев, Ю. В. Перуанский, А. Ю. Рубченко, *Докл. ВАСХНИЛ*, № 9, 28 (1969).