

Э. Е. ХАВКИН, А. И. АНТИПИНА, С. И. МИШАРИН

ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВ ЗОН РОСТА КОРНЯ КУКУРУЗЫ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 25 IX 1970)

Клеточный рост и дифференцировку связывают с изменениями в наборе ферментных и структурных белков растительной клетки (¹⁻³). Уникальная специфичность иммунохимических методов позволяет использовать их при изучении хемодифференцировки (⁴), однако применение этих методов для исследования белков высших растений все еще носит ограниченный характер.

С помощью метода двойной иммунодиффузии (⁵) прослежена динамика девяти антигенов в растущих coleoptilyах пшеницы и выявлены антигены, характерные для фазы деления и фазы растяжения. Иммунологические и иммунохимические методы (^{6, 8}) позволили установить специфику изменений в антигенном спектре белков в клетках интактной и культивируемой сердцевинной паренхимы табака в ходе дедифференцировки, меристематизации и последующей дифференцировки. Методы иммуноэлектрофореза и количественной преципитации выявили качественные и количественные изменения в наборе антигенов в формирующихся и закончивших рост запасующих чешуях репчатого лука (^{9, 10}).

Растущий кончик корня является одним из удобных и хорошо изученных объектов для анализа последовательных этапов роста и дифференцировки растительных клеток. Смена фаз роста в клетках корня сопровождается накоплением белка, увеличением активности большинства изученных ферментов и качественными изменениями в наборе белков и изoenzymов ферментов общего метаболизма (^{3, 10}). Предварительное изучение белков меристемы (0—2 мм) и закончивших рост клеток корня кукурузы (14—24 мм от кончика) с помощью иммуноэлектрофореза показало, что прекращение роста клеток приводит к резкому обеднению антигенного спектра. Утрата фазоспецифичных белков в закончивших рост клетках была подтверждена при использовании метода количественной преципитации (¹⁰).

Для более детального изучения белков зон роста корня были проведены исследования с использованием трех антисывороток: на белки меристемы, на белки зоны растяжения и на белки закончивших рост в длину клеток. Для выделения зон роста корня трехдневных проростков кукурузы гибрид Буковинский 3 разрезали на отрезки 0—2; 2—10 и 10—20 мм от кончика и пробы отрезков замораживали сухой углекислотой. Замороженный материал растирали, смешивали с дополнителем Фрейнда и подкожно вводили кроликам (по три животных на вариант). В первом цикле (в три приема с недельными интервалами) вводили примерно по 75 мг белка и при реиммунизации через месяц — по 40 мг белка. Дозы белка рассчитывали по общему белковому азоту ткани. Через две недели после реиммунизации из сердца животных брали кровь, отделяли сыворотку и хранили ее на холоде с мертиолатом. Проверку титра сыворотки методом двойной иммунодиффузии, разделение белков иммуноэлектрофорезом и определение содержания антигенов методом количественной преципитации проводили по прописям (¹¹), с незначительными изменениями (⁹). Для иммуноэлектрофоретического разделения использовали бесклеточные экстракты

тнани в 0,1 М трис-НСl-буфере рН 8,1. Для количественной преципитации использовали очищенную фракцию растворимых белков (¹²).

Иммунохимическое выявление антигенов с гомологичными сыворотками после электрофореза в агаре во всех случаях дает больше дуг преципитации, чем в перекрестных реакциях (рис. 1 А — В). Белки меристемы

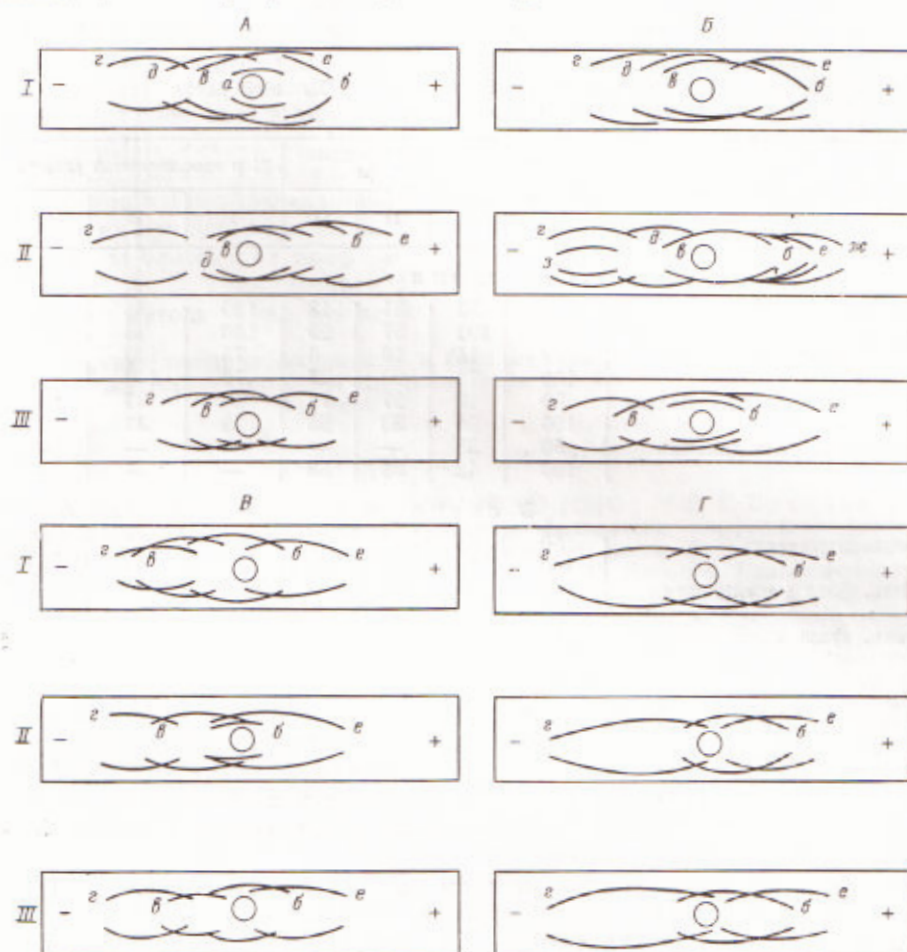


Рис. 1. Иммуноэлектрофорез белков зон роста корня и coleoptилей кукурузы. А — зона деления (0—2 мм), В — зона растяжения (2—10 мм), В — зона зрелых клеток (10—20 мм), Г — coleoptили в фазе деления. I—III — антисыворотки соответственно на белки А—В

характеризуются шестью, зоны растяжения — семью, а белки зрелых клеток — четырьмя дугами преципитации, что согласуется с ранее полученными данными (¹⁰). Для того чтобы вычлениить антигены, специфичные именно для корня, мы провели иммуноэлектрофоретическое изучение белков coleoptилей двухдневных проростков (фаза клеточного деления). Реакция со всеми тремя антисыворотками выявила в coleoptилях три антигена (b, c и e), которые присутствуют на всех фазах роста корня и, по-видимому, являются общими для двух органов прироста (рис. 1Г).

Анализ прямых и перекрестных реакций белков зон роста с гомологичными и гетерологичными поливалентными антисыворотками показал, что клетки меристемы содержат, по меньшей мере, один фазоспецифичный антиген a, исчезающий с переходом клеток в фазу растяжения. В белковом спектре фазы растяжения клеток появляются два новых антигена

ж и з, которых не было в фазе деления. С прекращением роста клеток в длину исчезают не только антигены ж и з, но и антиген д, общий для меристемы и зоны растяжения. В прекративших рост клетках, кроме антигенов б, г и е, удается обнаружить еще только один антиген в, присутствующий во всех отрезках корня, но отсутствующий в coleoptилах.

Таблица 1

Реакция преципитации белков зон роста корня и coleoptила кукурузы при реакции с сыворотками на белки меристемы (I), зоны растяжения (II) и зрелых клеток корня (III), $\mu\text{г}$

Источник антигенов	Количество антигена, $\mu\text{г}$	Величина преципитата, $\mu\text{г}$			% к гомологичной реакции		
		I	II	III	I	II	III
1 серия							
Корень, меристема	50	53	31	13	100	58	24
	100	102	57	25	100	55	25
Корень, фаза растяжения	50	14	19	6	73	100	31
	100	72	90	27	70	100	30
Корень, фаза зрелых клеток	50	19	27	72	26	37	100
	100	26	30	93	28	33	100
Колеонтили, фаза деления	50	35	—	—	—	—	—
	100	42	35	33	—	—	—
2 серия							
Корень, меристема	50	45	25	17	100	55	37
	100	70	49	23	100	70	32
Корень, фаза растяжения	50	6	14	3	42	100	21
	100	16	25	6	64	100	24
Корень, фаза зрелых клеток	50	13	20	52	25	38	100
	100	20	51	98	20	52	100

Таким образом, из восьми антигенов, обнаруженных в корне кукурузы, три (б, г и е) являются органоспецифичными, а один (в) — специфичным для корня, но фазонеспецифичным. Антиген д специфичен для обеих фаз роста, в то время как антиген а характерен только для фазы деления, а антигены ж и з — только для фазы растяжения. Природа этих антигенов остается пока не выясненной.

При анализе белков корня методом количественной преципитации к стандартному количеству антисыворотки (0,14 мл) добавляли различное количество растворимых антигенов. В качестве контроля учитывали величины преципитатов при взаимодействии антигена с контрольной сывороткой (от неиммунизированных кроликов), контрольной сыворотки с физиологическим раствором и специфичной антисыворотки с физиологическим раствором. Полученные этим методом данные приведены в табл. 1. Как и следовало ожидать, наибольшие преципитаты дает реакция белков с гомологичными сыворотками. Перекрестные реакции белков и антисывороток зон деления и растяжения указывают на сравнительное преобладание среди растворимых белков тех антигенов, которые являются общими для этих двух фаз роста клетки. С прекращением роста клетки в длину содержание этих белков уменьшается, и перекрестные реакции белков зрелых клеток с гетерологичными антисыворотками заметно ослабевают.

Реакция трех антисывороток с белками coleoptилей была сопоставима с другими гетерологичными реакциями. Наибольший преципитат был обнаружен при взаимодействии с сывороткой на белки меристемы корня.

Две серии опытов по количественной преципитации дали несколько различающиеся, но вполне сопоставимые результаты. Величина преципитата в значительной мере обусловлена реакцией поливалентных сывороток с органо- и фазонеспецифичными антигенами клеток корня. Однако даже на этом фоне вполне определенно выявляется появление одних и

утрата других фазоспецифичных антигенов при переходе клеток от деления к растяжению и особенно — при завершении роста в длину.

Очистка бесклеточных экстрактов ткани от белков, нерастворимых в физиологическом растворе, может приводить к потере плохорастворимых антигенов, способных передвигаться при электрофорезе. Поэтому результаты опытов с использованием метода количественной преципитации нельзя непосредственно соотносить с данными, полученными при иммуноэлектрофорезе. Тем не менее, качественно результаты, полученные двумя методами, хорошо согласуются между собой. Эти данные еще раз указывают на интенсивное новообразование белков в фазе клеточного растяжения, констатируют появление «новых» белков, но ничего не говорят о качественной специфике этих белков. Препаративное выделение фазоспецифичных белков с помощью истощенных сывороток позволит, как мы надеемся, изучить их природу химическими и энзимологическими методами.

Авторы благодарят проф. Ф. Э. Реймерса за руководство и внимание к работе, А. Д. Володарского, И. П. Гаврилюк и Н. Д. Шаскольскую — за ценные методические указания.

Сибирский институт физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения Академии наук СССР
Иркутск

Поступило
22 IX 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. Brown, Brookhaven Symp. Biol., 16, 157 (1964). ² Р. Г. Бутенко, Культура изолированных растительных тканей и физиология морфогенеза растений, «Наука», 1964. ³ Э. Е. Хавкин, Индуцированный синтез ферментов в процессах роста и морфогенеза растений, «Наука», 1969. ⁴ Ж. Браше, Биохимическая эмбриология, ИЛ, 1961. ⁵ S. T. C. Wright, Symp. Soc. Expt. Biol., 17, 48 (1963). ⁶ А. Д. Володарский, Рост и клеточная дифференцировка растений, «Наука» 1967, стр. 168. ⁷ Р. Г. Бутенко, А. Д. Володарский, Физиол. раст., 14, 965 (1967). ⁸ Н. Н. Дмитриева, Р. Г. Бутенко, Физиол. раст., 17, 330 (1970). ⁹ С. И. Мишарин и др., Рост, развитие и устойчивость растений, Иркутск, 1969, стр. 47. ¹⁰ Ф. Э. Реймерс, Э. Е. Хавкин, Физиол. раст., 17, 337 (1970). ¹¹ Иммунохимический анализ, М., 1968. ¹² Э. Е. Хавкин и др., Рост и клеточная дифференцировка растений, «Наука», 1967, стр. 85.