

В. Г. КОНАРЕВ, И. П. ГАВРИЛЮК, А. А. ЯМАЛЕЕВА

ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ОТДЕЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ ГИСТОНОВ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 23 VII 1971)

Сыворотками на хроматин клеточных ядер выявлена высокая антигенная активность гистонов (^{1, 2}). Перекрестный иммунохимический анализ гистонов пшеницы и гороха, а также сравнительный анализ гистонов некоторых представителей из семейства бобовых и злаков показали, что преобладающая часть их высокоспецифична и что эта специфичность отчетливо проявляется на уровне трибы, а в ряде случаев на уровне рода и даже вида (³). В этом сообщении приводим данные о степени специфичности отдельных компонентов, главным образом на примере гистонов пшеницы и некоторых представителей других родов семейства злаковых.

Сыворотки на суммарные гистоны получены иммунизацией диссоциированного в 2 *M* NaCl ДНП (⁴). Последний выделяли из 2-дневных ростков *Triticum aestivum* L., *Triticum durum* L., *Triticum monoccoccum* L., *Secale cereale* по методу (^{5, 6}) с применением термической обработки для инактивации протеаз (^{4, 7}). Таким же методом получали ДНП из 2-дневных ростков других растений для проведения иммунохимических реакций и выделения гистонов.

Суммарные гистоны экстрагировали из нитей ДНП 0,2*N* HCl, затем 0,4*N* HCl и отделяли при 25 000 *g* на «Спинко L». Гистоновые фракции F₁, F_{2b}, F₃ и F_{2a} выделяли по методу Джонса (⁸). Очистку F₃ фракции проводили по методу Боннера (⁹). Фракции идентифицированы по концевым аминокислотам динитрофторбензольным методом.

Компонентный состав суммарных гистонов и фракций определен электрофоретически в ПАГ по методу Пэнним и Чэлкли (¹⁰) с некоторыми изменениями (¹). Таким путем в суммарном гистоне *T. aestivum* выявлено 11 компонентов; во фракциях F₁, F_{2a}, F_{2b} и F₃ соответственно 4, 2, 3 и 2—3 компонента (рис. 1). Все указанные компоненты отчетливо проявляются раствором аммиачного серебра. Фракция F₃ пшеницы с этим реактивом дает менее специфическое окрашивание, чем типичный аргининбогатый гистон тимуса.

Иммунохимический анализ гистонов проведен методом иммунодиффузии в 1% агара и агарозе в веронал-ацетатном буфере pH 8,6. Препараты ДНП вносились в раствор 2 *M* NaCl. Гистоновые компоненты ДНП в линиях преципитации идентифицировались в соответствующих постановках с применением чистых препаратов указанных выше гистоновых фракций, а также окрашиванием прочным зеленым при pH 8,1 и аммиачным серебром.

ДНП *T. aestivum* при проявлении гомологичной сывороткой дает 15 линий преципитации. Линии 1—5 и 15 от старта представляют собой негистоновые белки, остальные идентифицированы как компоненты гистоновых фракций. Схематически преципитации гистонов *T. aestivum* показан на рис. 2.

Гистон F₁ представлен четырьмя компонентами в линиях 7, 8, 12 и 14. Это соответствует числу компонентов F₁ на электрофореграмме (рис. 1). Все компоненты идентифицированы по препарату F₁ и реакцией с аммиачным серебром. Преобладающими являются компоненты в линиях 7 и 12.

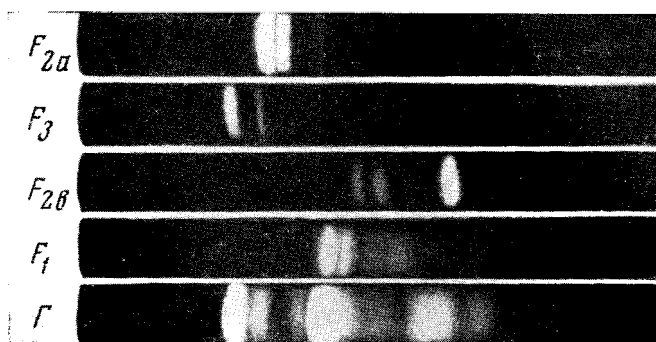


Рис. 1. Электрофоретические спектры гистонов *T. aestivum* в ПАГ. Г — суммарный гистон, F_1 , F_{2b} , F_3 , F_{2a} — фракции гистонов

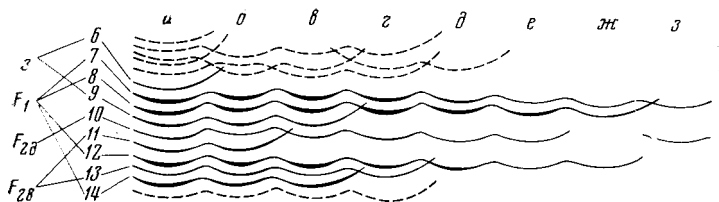


Рис. 2. Спектры преципитации гистонов и негистоновых белков ДНП 2-дневных ростков некоторых представителей семейства злаков при проявлении сывороткой на ДНП *T. aestivum*. Источники получения ДНП: *a* — *Triticum aestivum*; *b* — *Triticum monosocum*; *c* — *Hordeum sativum*; *d* — *Secale cereale*; *e* — *Panicum miliaceum*; *e* — *Avena sativa*; *ж* — *Zea mays*; *з* — *Oryza sativa*. F_3 , F_1 , F_{2a} , F_{2b} — фракции гистонов, 6—14 — линии преципитации гистонов. Пунктирные линии — негистоновые белки

Гистон F_{2b} идентифицирован по препарату в линиях преципитации 11 и 13.

Гистон F_{2a} сравнительно слабо проявляется одним компонентом в линии 10.

Гистон F_3 по препарату идентифицирован в линии 9. Аммиачное серебро реакцию на F_3 дает также с линией 6. Возможно, последняя содержит один из компонентов F_3 , который, однако, препаративно выделить из ДНП не удастся.

Некоторые реакции идентификации гистоновых компонентов в линиях преципитации приведены на рис. 3.

Расчлененность гистонов на фракции и компоненты, число которых примерно соответствует числу компонентов на электрофореграммах, дает основание считать, что принятые нами условия иммунодиффузии вполне обеспечивают диссоциацию ДНП и позволяют иммунохимически выявить все основные компоненты гистонов.

Аналогичные исследования проведены с ДНП *T. durum*, *T. monosocum* и *S. cereale*. Гомологичные сыворотки во всех случаях дают спектры преципитации гистонов, идентичные спектрам гистонов *T. aestivum*.

В то же время гетерологичные реакции показывают, что некоторые одноименные компоненты и фракции гистонов разного происхождения иммунохимически не идентичны. Особенно велико различие между гистонами растений разных семейств. Например, для гистонов гороха (*Pisum sativum*) и пшеницы (*T. aestivum*) общей является лишь незначительная часть фракции (рис. 3). Количество общих компонентов возрастает с повышением степени филогенетической близости организмов. Это хорошо иллюстрирует рис. 2, составленный на основе сравнительного иммунохимического анализа гистонов представителей разных родов и триб семей-

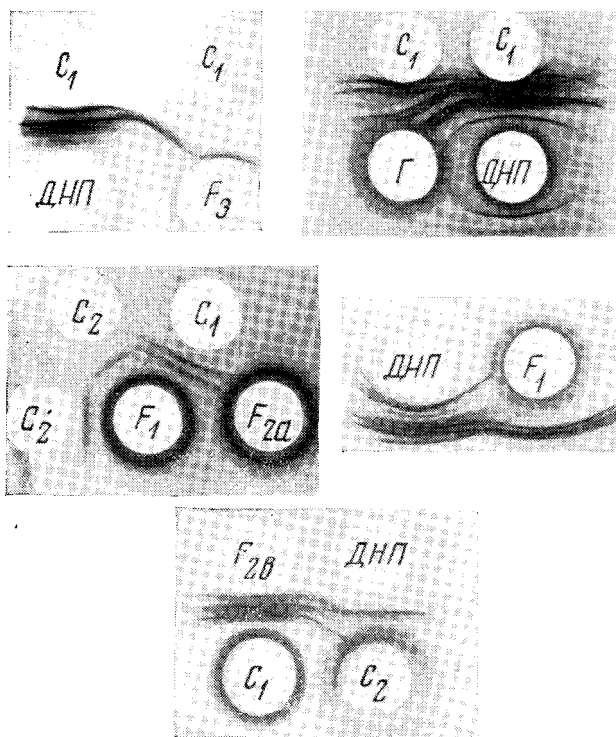


Рис. 3. Примеры идентификации гистоновых компонентов *T. aestivum* в реакциях иммунодиффузии. Γ — суммарные гистоны, F_1 , F_{2a} , F_{2b} , F_3 — фракции гистонов, ДНП — нуклеогистоп *T. aestivum*, C_1 — сыворотка на ДНП *T. aestivum*, C_2 — сыворотка на ДНП *Pisum sativum*

по общим компонентам и, в частности, по гистону F_1 линий 7 и 12. Это проявляется в ослаблении реакции преципитации их с сывороткой на ДНП пшеницы и свидетельствует об антигенной неоднородности каждого из компонентов. Гетерогенность последних хорошо просматривается в иммунохимических реакциях на идентичность, где специфические (неидентичные) субкомпоненты вычлняются из линии преципитации в виде «шпор».

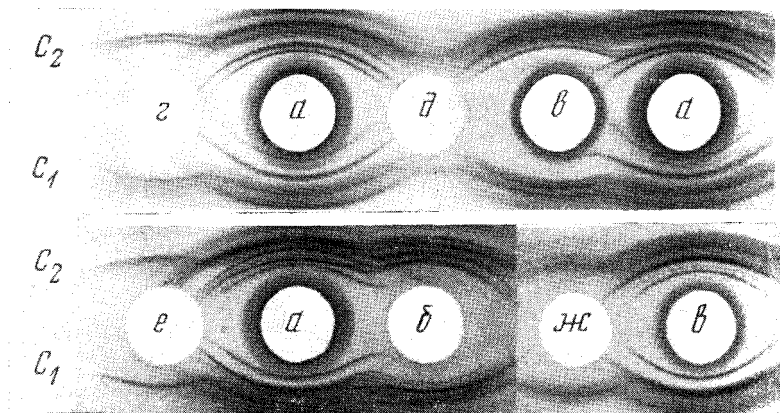


Рис. 4. Спектры преципитации ДНП 2-дневных ростков *T. aestivum* (a), *H. sativum* (б), *S. cereale* (в), *P. miliaecum* (г), *A. sativa* (д), *O. sativa* (e), *Z. mays* (ж). Проявлены сыворотками на ДНП *T. aestivum* (C_1) и *T. monosocum* (C_2).

стеа злаковых (см. также рис. 4). По степени специфичности на первое место следует поставить фракции F_3 и F_{2b} , затем F_{2a} . Особенно специфичны компоненты F_3 и F_{2b} , локализованные в линиях 6 и 11. Наименее специфичны компоненты F_1 , локализованные в линиях 7 и 12, затем компонент линии 8.

По наличию гистоновых компонентов, идентичных компонентам *T. aestivum*, из взятых нами растений ближе всего к пшенице стоят ячмень и рожь, за ними в порядке убывания числа общих компонентов идут просо, овес, кукуруза и рис.

Следует отметить, что по мере удаления от рода *Triticum* гистоны указанных выше растений постепенно утрачивают сходство с гистонами пшеницы также

Негистоновые белки ДНП пока неидентифицированы. В целом они более специфичны, чем гистоны. Среди них нет компонентов, которые выходили бы за пределы трибы.

Таким образом, иммунохимически в ДНП 2-дневных ростков пшеницы идентифицированы 11 гистоновых компонентов, из которых 4 принадлежат гистону F₁, 2 принадлежат гистону F_{2b}, 2 принадлежат гистону F₃ и 1 — гистону F_{2a}. Результаты сравнительного анализа ДНП 2-дневных ростков представителей разных родов и триб семейства злаковых дают основания заключить, что степень иммунохимической специфичности гистоновых фракций и их компонентов неодинакова. В целом наиболее специфична фракция аргининбогатых гистонов (F₃) и наименее специфична фракция лизинбогатых гистонов (F₁). Последняя, однако, весьма гетерогенна и включает в себе как малоспецифичные, так и высокоспецифичные компоненты.

Специфичность на уровне рода проявляют один из компонентов F₃ и один из компонентов F_{2b}. За пределы семейства выходит незначительная часть (субфракций) лизинбогатых гистонов F₁.

Поскольку гистоны являются белками хромосом, сравнительное изучение их на уровне фракций и компонентов дает возможность подойти к биохимическому и иммунохимическому анализу кариотипа.

Научно-исследовательский институт растениеводства
им. Н. И. Вавилова
Москва

Поступило
23 VII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Г. Конарев, И. П. Гаврилюк, II Всесоюз. биохимич. съезд, 1969, секция 6. ² И. П. Гаврилюк, В. Г. Конарев, II Всесоюз. биохимич. съезд, 1969, секция 6. ³ В. В. Сидорова, И. П. Гаврилюк, В. Г. Конарев, Физiol. раст., № 2 (1971). ⁴ А. А. Ямалеева, Сборн. тр. молодых ученых и аспирантов, Всесоюз. н.-и. инст. растениеводства, 1970. ⁵ E. W. Johns, J. A. Butler, Biochem. J., 84, 436 (1962). ⁶ Л. В. Гофштейн, В. И. Сафонов, Н. М. Сисакян, ДАН, 167, № 5 (1966). ⁷ M. Sluysen, P. J. Thung, P. Emmelot, Biochim. et biophys. acta, 108, 2, 249 (1965). ⁸ E. W. Johns, Biochem. J., 92, 155 (1964). ⁹ D. M. Fambrough, J. Bonner, J. Biol. Chem., 243, 4434 (1968). ¹⁰ S. Panyim, R. Chalkley, Arch. Biochem. and Biophys., 130, 1—2, 337 (1969).