

В. Г. КЛИМЕНКО, Т. Я. ВЫСОКОС

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВ СОЗРЕВАЮЩИХ
СЕМЯН ПОДТРИБЫ ФАСОЛЕВЫХ ХРОМАТОГРАФИЕЙ
НА ГИДРОКСИЛАПАТИТЕ**

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 6 VII 1971)

В созревающих семенах гороха обнаружено, что биосинтез глобулиновых компонентов вицилина и легумина протекает с различной скоростью и независимо один от другого (¹, ²). Семена подтрибы фасолевых также содержат вицилино- и легуминоподобные белки, однако до последнего времени не появилось исследований об их изменчивости в процессе созревания семян. Отсутствуют данные и о влиянии стадии созревания семян на соотношение белков и нуклеиновых кислот в семядолях фасоли, вигны и гиацинтовых бобов, составляющих подтрибу фасолевых (Phaseolinae Taub).

В настоящей работе изложены данные хроматографического разделения суммарных белковых экстрактов семядолей молочной и полной зрелости фасоли, вигны и гиацинтовых бобов, соотношение белков и нуклеиновых кислот в отдельных хроматографических фракциях, а также электрофоретическое поведение белков хроматографических фракций.

Для исследования были взяты семядоли молочной и полной зрелости фасоли (*Ph. vulgaris* (Savi) L. сорт Триумф-137, вигны (*Vigna sinensis* (Stikm.) Savi) сорт Кишиневская-137 и гиацинтовых бобов (*Dolichos lablab* L.), выращенных в 1969 г. на биологической станции Кишиневского университета в одинаковых почвенно-метеорологических условиях. Стадию созревания определяли по содержанию в семядолях воды (³). Из бобов молочной зрелости как можно быстрее вылуцивали семена и немедленно освобождали их от кожуры и осевой части зародыша, замораживали и подвергали лиофильной сушке. Исследуемые семядоли молочной зрелости содержали 83—84% воды. Приготовление из обезжиренной муки суммарных белковых экстрактов проводили так, как нами описано раньше (⁴). Из муки семядолей молочной и полной зрелости было извлечено 96—98% белков.

Хроматографию на гидроксилпатите проводили по методу, принятому в нашей лаборатории (⁵⁻⁷). Фракции белка, соответствующие отдельным участкам хроматограммы, концентрировали высаливанием $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и исследовали электрофорезом на бумаге (⁸). Спектры поглощения фракций хроматограмм снимали на спектрофотометре СФД-2. Содержание белка в отдельных хроматографических фракциях определяли по его связыванию с красителем бромфенол-синим (⁹), а нуклеиновые кислоты спектрометрически (¹⁰).

Хроматограммы суммарных белковых экстрактов семядолей полной зрелости приведены на рис. 1, а молочной зрелости — на рис. 2; электрофореграммы белков хроматографических фракций семядолей полной и молочной зрелости — на рис. 3; спектрограммы хроматографических фракций семядолей полной и молочной зрелости — на рис. 4.

Белковые экстракты семядолей полной и молочной зрелости фасоли разделялись на четыре фракции, однако исходным буфером (0,03 M) из белкового экстракта полной зрелости элюируется одна, а молочной зрелости — две фракции (рис. 1а, 2а). На хроматограмме белкового экстракта семядолей молочной зрелости после наложения градиента отсутствуют фракции 0,24 и 0,31, но появляется фракция 0,27. Фракции, элюирующиеся

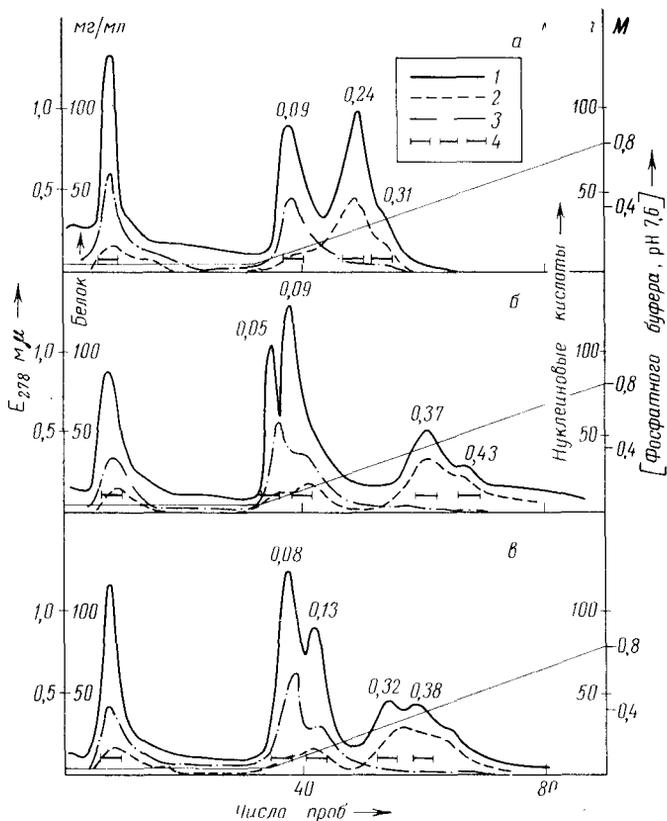


Рис. 1

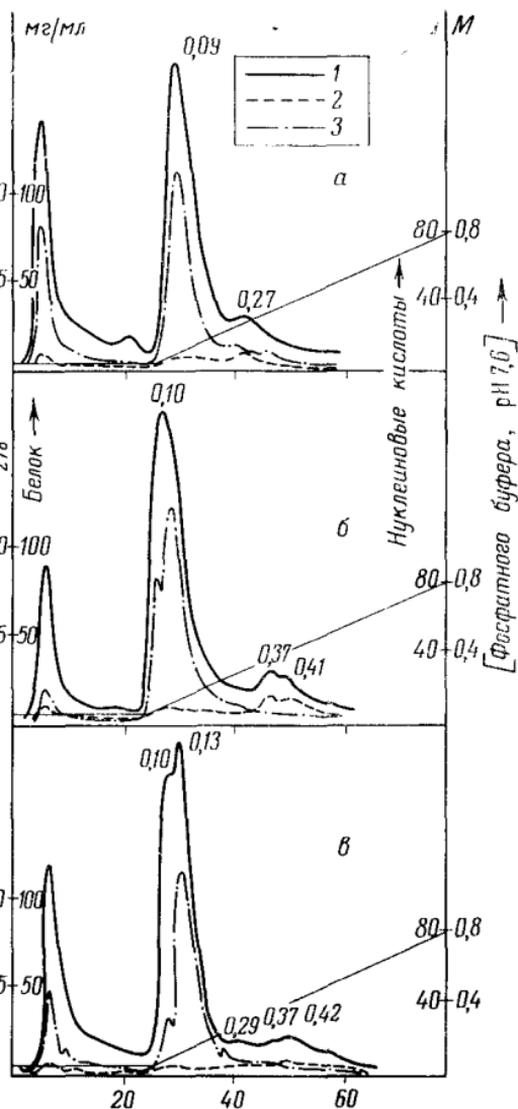


Рис. 1. Хроматограммы суммарных белковых экстрактов семян полной спелости: *a* — фасоль, *b* — вигна, *v* — гиацинтовые бобы. 1 — экстинкция, 2 — содержание белка, 3 — содержание нуклеиновых кислот, (мг/мл), 4 — часть фракций, белки которых подвергнуты электрофорезу. Цифры над фракциями (пиками) — концентрации фосфатного буфера (*M*). В пробе 3 мл элюата

Рис. 2. Хроматограммы белковых экстрактов семян молочной спелости. Обозначения те же, что на рис. 1

ся исходным буфером, и первые фракции после наложения градиента независимо от стадии созревания семян не чисто белковый, а смешанный характер, о чем свидетельствуют их спектры поглощения (рис. 4а, 4а'). Фракции белковых экстрактов семян молочной спелости, по сравнению с фракциями семян полной спелости, обогащены нуклеиновыми

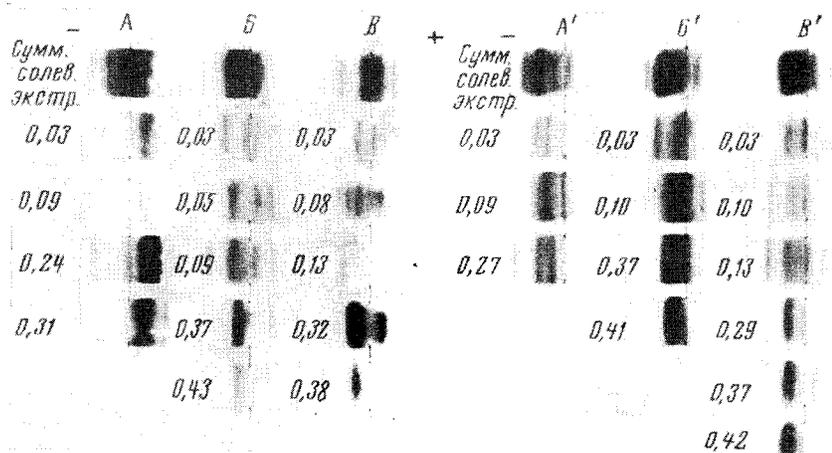


Рис. 3. Электрофореграммы белков хроматографических фракций полной спелости: А — фасоль, В — вика, В' — гуакинтовые бобы, и молочной спелости: А' — фасоль, В' — вика, В' — гуакинтовые бобы. Цифры — концентрации фосфатного буфера, при которых элюируются фракции

ми кислотами. Следовательно, стадия созревания оказывает существенное влияние на соотношение белков и нуклеиновых кислот хроматографических фракций.

Суммарные белки семян полной спелости при электрофорезе разделились на три зоны — основную анодную и две катодных, тогда как белки семян молочной спелости разделились на пять зон, из которых только одна оказалась анодной, но не основной (рис. 3А, 3А'). Следовательно, семена молочной спелости обогащены вицилиноподобными глобулиновыми компонентами по сравнению с семенами полной спелости. Данные электрофореза белков хроматографических фракций, элюирующихся при различных концентрациях буфера, показывают, что семена полной спелости обогащены анодными — легуминоподобными, а молочной спелости — катодными вицилиноподобными электрофоретическими компонентами. Из этого следует, что на ранних стадиях созревания семян происходит биосинтез преимущественно вицилинов, а к концу созревания происходит нарастание содержания легуминов, которые совместно с вицилинами превращаются в запасные белки семян полной спелости.

Белковый экстракт семян полной спелости вика разделился на пять, а молочный — на четыре фракции (рис. 1б, 2б). Независимо от стадии созревания исходным буфером элюируются по одной фракции, в состав которых, кроме белков, входят и нуклеиновые кислоты (рис. 4б, 4б'). Как и следовало ожидать, фракции семян молочной спелости обогащены нуклеиновыми кислотами и обеднены белками по сравнению с фракциями семян полной спелости.

Суммарные белки семян полной спелости вика при электрофорезе разделились на четыре зоны — две анодных и две катодных, тогда как белки молочной спелости дали только одну анодную и три катодных зоны. Это указывает на то, что на ранних стадиях созревания семян происходит биосинтез преимущественно вицилинов. Хроматографические фракции семян молочной спелости обогащены белками, компоненты которых

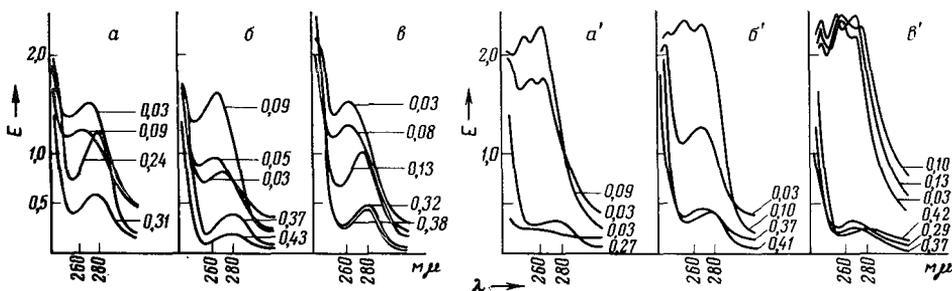


Рис. 4. Спектрограммы хроматографических фракций. Цифры справа — концентрации буфера, при которых элюируется фракция

при электрофорезе движутся к катоду, т. е. вицилинами, тогда как белки семян полной спелости обогащены анодными компонентами, т. е. легуминами (рис. 3Б, 3Б'). Следовательно, стадия созревания семян вигны оказывает существенное влияние на электрофоретическое поведение белков.

Суммарный белковый экстракт семян гвиацинтовых бобов полной спелости разделился на пять, а молочной — на шесть хроматографических фракций (рис. 1в, 2в), из которых исходным буфером элюируются по одной фракции. Фракции, элюирующиеся исходным буфером и низкими его концентрациями, являются смешанными (рис. 4в, 4в').

Белковый экстракт семян полной спелости при электрофорезе разделился на три зоны — анодную, катодную и остающуюся по месту нанесения белка на электрофореграмму, а молочной спелости — на четыре зоны, из которых три катодных, представленных вицилинами. В хроматографических фракциях семян молочной спелости гвиацинтовых бобов, как и в фасоли и вигне, превалируют катодные (вицилиноподобные) глобулиновые компоненты по сравнению с белками фракций семян полной спелости.

Приведенные экспериментальные данные указывают на то, что независимо от родовой принадлежности семян подтрибы фасолевых на ранних стадиях созревания в них происходит биосинтез преимущественно вицилинов, а к концу созревания, в семенах полной спелости, происходит нарастание легуминов. Стадия созревания оказывает существенное влияние на электрофоретическое поведение хроматографических фракций, элюирующихся различными концентрациями буфера. Белки суммарных белковых экстрактов и фракций семян молочной спелости, элюирующихся различными концентрациями буфера, обогащены катодными, вицилиноподобными, и нуклеиновыми кислотами по сравнению с белковыми экстрактами и фракциями семян полной спелости. Создается впечатление, что повышенное содержание нуклеиновых кислот в хроматографических фракциях семян молочной спелости каким-то образом связано с вицилиноподобными, а не легуминоподобными глобулинами. Природа рода подтрибы фасолевых оказывает влияние не только на хроматографическое, но и электрофоретическое поведение белков семян молочной и полной спелости.

Кишиневский государственный университет
им. В. И. Ленина

Поступило
5 VII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. Е. Danielsson, Acta chem. scand., 6, 139 (1952). ² В. Г. Клименко, Р. И. Пинегина, Биохимия, 29, 377 (1964). ³ А. А. Прокофьев, В. П. Холодова, Физиол. раст., 6, 190 (1959). ⁴ В. Г. Клименко, Р. И. Ткаченко, ДАН, 196, 719 (1971). ⁵ И. А. Вайнтрауб, Биохимия, 30, 628 (1965). ⁶ А. Д. Шутков, И. А. Вайнтрауб, Биохимия, 31, 726 (1966). ⁷ В. В. Саянова, Физиол. и биохим. культ. раст., 2, 57 (1970). ⁸ В. В. Саянова, Тр. по химии природы соединений Кишиневск. унив., 8, 13 (1969). ⁹ Ю. Я. Гофман, Авт. свид. СССР № 159059, 1963. Бюлл. изобр., № 23, 61 (1963). ¹⁰ А. С. Спирин, Биохимия, 23, 656 (1958).