

В. П. ИВАНОВ, С. И. МИШАРИН,  
член-корреспондент АН СССР Ф. Э. РЕЙМЕРС, Э. Е. ХАВКИН

## ДИНАМИКА МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ В РАСТУЩИХ И ЗРЕЛЫХ КЛЕТКАХ КОРНЯ КУКУРУЗЫ

Модель дифференциальной активности генов предполагает, что рост и дифференцировка клеток сопровождается существенными изменениями в составе белков. Помимо чисто количественных сдвигов в соотношении белков должны происходить и качественные фазоспецифичные изменения: одни белки исчезают, и их сменяют новые, ранее отсутствующие компоненты белкового комплемента клетки. Именно этим качественным изменениям отводится решающая роль в процессе дифференцировки клеток корня (1).

Хотя рост и дифференцировка корня высших растений изучены довольно подробно, в этих процессах исследовали главным образом динамику ферментов основного метаболизма с помощью энзимологических методов (2, 3). Принципиально иным подходом является применение количественных иммунохимических методов, которые к тому же включают в сферу исследования и многие другие белки, не обладающие энзиматической активностью.

С помощью количественного (двумерного) иммуноэлектрофореза и иммуноэлектродиффузии (4-6) мы исследовали антигенные спектры белков растворимых фракций зон роста корня. Кроме того, для выявления органоспецифичных антигенов корня проводили сопоставление антигенов корня, колосоотвита и щитка двудневных проростков кукурузы.

Условия выращивания растений, методы выделения белков, митохондрий и методы получения антисывороток описаны ранее (7). Были использованы четыре антисыворотки, на белки меристемы — анти-1, на белки зоны растяжения — анти-2, на белки зрелых клеток — анти-3 и на белки митохондрий — анти-М. Для истощения антисывороток гетерологичными антигенами и выявления фазоспецифичных и органоспецифичных белков использовали иммуносорбент, полученный сополимеризацией альбумина сыворотки человека с соответствующими гетерологичными антигенами с помощью 0,4% глутарового альдегида (8). Двумерный иммуноэлектрофорез и иммуноэлектродиффузию проводили по методу Лаурелла (4) с некоторыми модификациями (6, 9). Антигены, обладающие ферментной активностью, выявляли зимографически (10), содержание белка определяли по методу Лоури и др. (11).

Обычный одномерный иммуноэлектрофорез в агарозе позволяет обнаружить 13-15 антигенов во всех трех зонах роста с анти-1 и 15-18 антигенов при использовании анти-2 или анти-3 (рис. 1). Зимографическая идентификация выявила глутаматдегидрогеназу (ГлДГ), две дуги малатдегидрогеназы (МДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (Г6ФДГ) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназу (6ФГДГ). Судя по реакции с анти-М, по крайней мере двенадцать компонентов антигенного спектра являются митохондриальными белками. Одна из дуг с МДГ-активностью, с меньшей подвижностью, принадлежит к белкам митохондрий, а дуга с большей подвижностью является цитоплазматическим изоферментом.

В процессе истощения белками гетерологичных зон анти-1<sup>н</sup>, анти-2<sup>н</sup> и анти-3<sup>н</sup> выявляют все меньше антигенов, однако число дуг преципитации остается постоянным в гомо- и в гетерологичной зоне — вплоть до полного исчезновения (рис. 1). Таким образом, с помощью одномерного иммуноэлектрофореза мы не обнаружили белков, специфичных для каждой зоны роста. Более того, существование органоспецифичных белков корня не удавалось показать и при истощении анти-3 белками целого двухдневного растения (кроме корня и эндосперма).

Рис. 1. Одномерный иммуноэлектрофорез белков зон роста корня. 1 — меристема, 2 — зона растяжения, 3 — зрелые клетки. Анти 1<sup>н</sup>, анти 3<sup>н</sup> — соответствующие частично истощенные антисыворотки

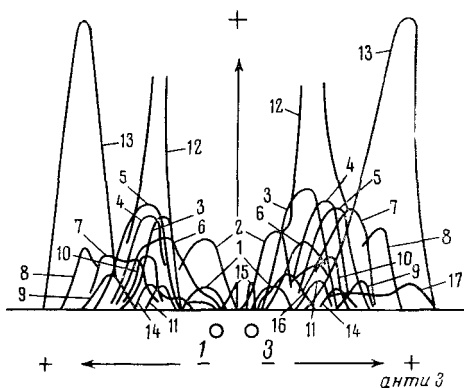


Рис. 2. Двумерный иммуноэлектрофорез белков зон роста корня и coleoptiles. 1 — меристема, 3 — зрелые клетки, 4 — coleoptили. В гель введена сыворотка анти-3. Цифры 1—17 обозначают индивидуальные антигены

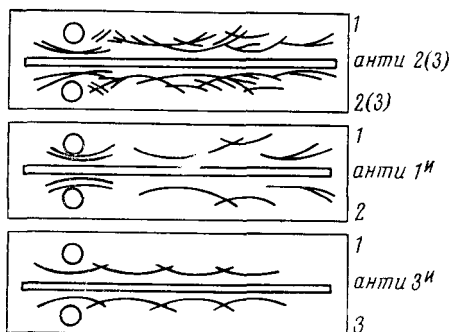


Рис. 1

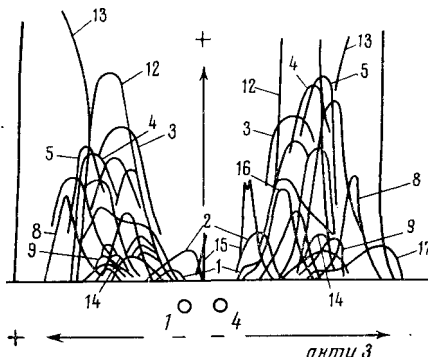


Рис. 2

Применение количественного двумерного иммуноэлектрофореза, обладающего значительно большей разрешающей способностью, подтверждает очень большое сходство трех зон роста корня по составу антигенов: 15 наиболее четко выявляемых антигенов присутствуют во всех трех зонах (рис. 2 сверху). Единственное исключение составляет гетерогенный антиген 17, отсутствующий в меристеме, но обнаруживаемый в зонах растягивающихся и зрелых клеток. Этот антиген не специфичен для корня, так как он найден в coleoptиле и щитке и, вероятно, представляет совокупность нескольких иммунологически родственных белков. Однако зоны роста заметно различаются по концентрации определенных белков. В зоне растяжения сильно увеличивается содержание количества митохондриального антигена 16 — в меристеме имеются лишь следовые количества этого белка. Интересные изменения происходят с гетерогенным антигеном 6 с двумя максимумами; в меристеме они симметричны, а в зрелой части корня увеличение содержания медленно мигрирующей формы опережает увеличение быстро мигрирующей. В зрелой части корня происходит некоторое увеличение содержания антигенов 3, 4 и 8.

Одномерный иммуноэлектрофорез не выявляет различий по составу антигенов между корнем и coleoptилем. Результаты двумерного иммуноэлектрофореза при реакции с анти-3 указывают на присутствие в корне

нескольких слабовыраженных антигенов, которых, по-видимому, нет в колеоптиле. При максимальном достигнутом нами разрешении их число было равно 5 (рис. 2 внизу). По содержанию многих антигенов между меристойемой корня и двудневыми колеоптилями существуют весьма выраженные количественные различия: концентрация одних антигенов в белке колеоптилей падает, а других возрастает.

Значительно сильнее различается состав антигенов корня и щитка. Уже при одномерном иммуноэлектрофорезе анти-3 выявляет в щитке на три антигена меньше, чем в корне. Использование двумерного иммуноэлектрофореза показало, что концентрация большей части антигенов щитка, выявляемых анти-3, меньше, чем в корне. Это может служить косвенным свидетельством существования белков, специфичных для щитка, однако такое предположение нуждается в проверке с применением антисыворотки на белки щитка.

Таким образом, при большом сходстве по составу белков каждый орган растения и даже каждая зона роста может быть охарактеризована свойственным именно ей определенным соотношением белков-антигенов.

Для изучения динамики некоторых антигенов, сохраняющих ферментную активность в преципитатах, мы воспользовались иммуноэлектродиффузией в гель, содержащий антигена (<sup>3</sup>), с последующей зимографической идентификацией (рис. 3). Разделению подвергали возрастающие количества белка каждой зоны корня, колеоптиля и щитка и устанавливали область линейной зависимости между количеством определенного ферментного белка и высотой соответствующего ему пика преципитации, идентифицированного зимографически. В этих условиях сравнивали изменения в содержании данного белка на 1 мг всего растворимого белка экстрактов в зонах роста корня и органах проростка. Мы сопоставили изменения в содержании ферментных белков при иммунохимическом определении с изменением их удельной активности в зонах корня, колеоп-

Таблица 1

Эвзиматическое и иммунохимическое определение содержания ферментных белков в проростках кукурузы

Объект исследования	Г6ФДГ	6ФДГ	ГэдГ
Меристема корня	$\frac{48}{55}$	$\frac{45}{55}$	$\frac{23}{33}$
Растяжение корня (2—10 мм)	$\frac{74}{75}$	$\frac{66}{80}$	$\frac{63}{52}$
Колеоптиль	$\frac{25}{67}$	$\frac{45}{80}$	$\frac{52}{28}$
Щиток	$\frac{11}{83}$	$\frac{7}{86}$	$\frac{17}{14}$

Примечание. Над чертой — удельная активность фермента (нмоль субстрата в 1 мин. на 1 мг белка данной зоны) в процентах к удельной активности в зрелой части корня (10—20 мм от кончика), под чертой — содержание фермента, определенное иммунохимически, в 1 мг белка данной зоны в процентах к содержанию в зрелой части корня.

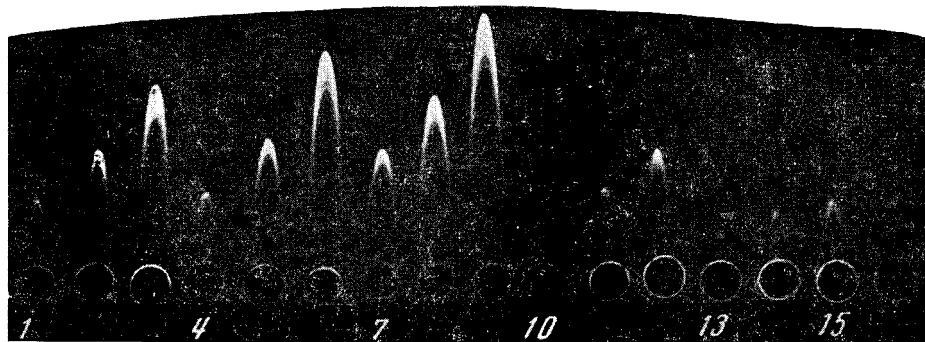


Рис. 3. Иммуноэлектродиффузия в гель, содержащий сыворотку анти-3, с последующей зимографической идентификацией ГэдГ. Слева направо — возрастающие количества белка; 1—3 — меристемы; 4—6 — зоны растяжения; 7—9 — зрелых клеток корня; 10—12 — колеоптиля, 13—15 — щитка, 16 — контроль (без белка)

тия и щитке (табл. 1). Для Г6ФДГ, 6ФГДГ, ГлДГ показано очень хорошее соответствие в случае зон роста корня, однако оно нарушается в колеептите для всех трех ферментов, а в щитке — для Г6ФДГ и 6ФГДГ. Причины такого расхождения нуждаются в дополнительном исследовании; возможно, что в щитке они обусловлены присутствием ингибиторов ферментов. С помощью двумерного иммуноэлектрофореза и иммуноэлектродиффузии можно разделить цитоплазматическую и митохондриальную МДГ. Все три зоны корня, колеептит и щиток характеризуются одинаковой концентрацией МДГ при постоянном соотношении между цитоплазматическим и митохондриальным изоферментами.

Вся совокупность результатов, полученных нами с помощью иммунохимических методов, свидетельствует о значительной количественной перестройке белкового комплекса в растущей клетке корня кукурузы при минимальных качественных изменениях. Не исключено, тем не менее, что при дальнейшем увеличении разрешающей способности методов удастся выявить и фазоспецифичные антигены. Полученные результаты не позволяют принять классическую модель дифференциальной активности генов для случая растущей клетки корня и указывают на важную роль посттранскрипционных механизмов регуляции синтеза белков на первых этапах дифференцировки (<sup>12</sup>).

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

Поступило  
7 VI 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> R. Brown, In: Brookhaven Symp. Biol., v. 16, 157 (1963). <sup>2</sup> И. В. Зеленева и др., Физиол. раст., т. 19, 1274 (1972). <sup>3</sup> Э. Е. Хавкин, В кн. Физиология растений (сер. Итоги науки и техники), т. 4, М., 1973, стр. 58. <sup>4</sup> C. B. Laurell, Anal. Biochem., v. 10, 358 (1965). <sup>5</sup> C. B. Laurell, Anal. Biochem., v. 15, 45 (1966). <sup>6</sup> H. G. M. Clarke, T. Freeman, Clin. Sci., v. 35, 403 (1968). <sup>7</sup> Э. Е. Хавкин и др., Физиол. раст., т. 19, 160 (1972). <sup>8</sup> S. Avrameas, T. Ternynck, Immunochem., v. 6, 53 (1969). <sup>9</sup> J. Kröll, Scand. J. Clin. Lab. Invest., v. 24, 55 (1969). <sup>10</sup> М. Берстон, Гистохимия ферментов, М., 1965. <sup>11</sup> O. H. Lowry et al., J. Biol. Chem., v. 193, 265 (1951). <sup>12</sup> A. Marcus, Ann. Rev. Plant. Physiol., v. 22, 313 (1971).