

С. И. МИШАРИН, А. И. АНТИПИНА,
член-корреспондент АН СССР Ф. Э. РЕЙМЕРС, Э. Е. ХАВКИН

ФАЗО-, ТКАНЕ- И ОРГАНОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ БЕЛКИ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ

Имуноэлектрофоретические исследования белков на последовательных этапах роста и дифференцировки клеток в корне кукурузы выявили значительные количественные сдвиги в соотношении индивидуальных антигенов (¹, ²). Однако метод электрофореза не позволяет однозначно судить о появлении при этом новых, фазоспецифических белков. Нам не удалось обнаружить фазоспецифичные антигены и при последовательном истощении сывороток в сочетании с методом одномерного иммуноэлектрофореза (²).

Отсутствие определенных результатов при истощении сывороток, по-видимому, обусловлено следующим обстоятельством. Как показали наши исследования, содержание отдельных белковых компонентов в корне по-разному изменяется в ходе клеточной дифференцировки: количество одних значительно уменьшается, а других увеличивается в 10 раз и более. Поэтому при добавлении к поливалентной антисыворотке гетерогенной смеси тканевых белков не достигается эквивалентного соотношения всех компонентов. В результате очищенная от непрореагировавших антигенов γ -глобулиновая фракция очищенной сыворотки все еще содержит антитела на неспецифичные антигены и выявляет их в последующем как специфичные.

Принципиально иные результаты дает при поиске специфических антигенов метод двойной иммунодиффузии, в частности метод квадратов, предложенный Абелевым (³). При постановке реакции этим методом достигается такое расположение полос преципитации, при котором линия антигена, специфичного только для одной системы на всем своем протяжении, отличается по направлению от спектра антигенов, общих для сравниваемых препаратов, и пересекает этот спектр в оптимальной зоне реакции. При сравнении с помощью этого метода белков меристемы и зоны растяжения корня кукурузы нам удалось обнаружить один антиген, характерный для растягивающихся клеток (рис. 1). Сравнивая белки меристемы и зрелых клеток (рис. 1), мы также нашли антиген, специфический для последних. При сопоставлении белков растягивающихся и зрелых клеток можно было ожидать либо появления двух взаимно пересекающихся полос преципитации, если эти фазоспецифичные антигены различны, — либо отсутствия полос, если это один и тот же антиген, появившийся в фазе растяжения и сохранившийся в зрелых клетках. В наших опытах зарегистрированы две параллельные полосы преципитации, одна из которых была значительно более слабой. Это говорит о том, что один из антигенов, возможно, специфичен для зрелых клеток, а вторая полоса появляется вследствие многократного усиления синтеза этого белка в конце фазы растяжения.

Таким образом, резкое увеличение концентрации отдельных белковых компонентов в процессе дифференцировки затрудняет интерпретацию результатов, полученных методом квадратов (³).

Для преодоления этого затруднения мы видоизменили схему раститровки антигенных систем. Суть предложенной модификации состоит в создании иммунохимического барьера для общих антигенов. Для этого

в сравниваемой системе гетерологичной сывороткой наполняют две лунки в агаре на расстоянии 10 мм (рис. 2). По одну сторону от барьера, на расстоянии 5 мм, пробивается лунка для исследуемого белкового экстракта. По другую сторону иммунохимического барьера пробивается лунка для гомологичной антисыворотки. Общие антигены в сравниваемых системах выпадают в преципитат, образуя линии преципитации между лункой с исследуемым белковым экстрактом и лунками с гетерологическими сыворот-

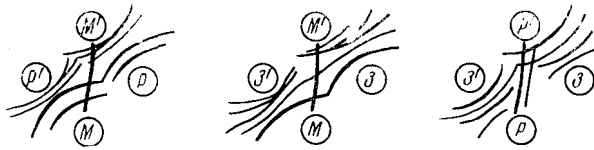


Рис. 1. Сравнение антигенных систем зон роста корня кукурузы по «квадратной схеме» (3). *M*, *P* и *Z* — соответственно белки меристемы, зоны растяжения и зрелых клеток корня; *M'*, *P'* и *Z'* — антисыворотка к соответствующим белкам

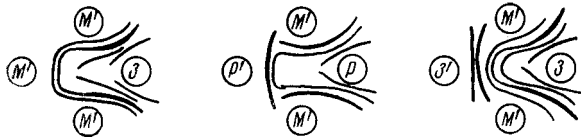


Рис. 2. Выявление фазоспецифических белков зон роста корня. Обозначения те же, что и на рис. 1

ками. Созданный таким образом иммунохимический барьер пересекают только антигены, не имеющие родственных антител в гетерологичной сыворотке. Антигены, прошедшие через барьер, преципитируются гомологичной сывороткой. Полноту осаждения общих антигенов проверяют, ставя контроль, в котором вместо гомологичной используют гетерологичную сыворотку.

Модифицированный таким образом метод двойной иммунодиффузии позволяет вычленить из общего белкового спектра антигены, специфичные только для данного типа клеток или тканей. С помощью этой модификации нам удалось выявить в белковом комплементе клеток корня два фазоспецифичных антигена, содержащихся в весьма малых количествах по сравнению с другими белками (рис. 2). Один из этих антигенов оказался общим для растягивающихся и зрелых клеток, другой был специфичен только для зрелых клеток корня.

Мы задались вопросом о тканевой локализации специфических антигенов в корне. Принадлежат ли эти белки клеткам проводящей системы, заметная дифференцировка которой начинается уже в фазе клеточного растяжения и продолжается в исследованном нами зрелом участке корня, — или же они локализованы в клетках коровой паренхимы? Корень расчленили на кору и центральный цилиндр. Это позволило разделить тканеспецифичные белки, а также повысить концентрацию интересующих нас компонентов в смеси тканевых белков.

Сравнение антигенных систем растягивающихся и зрелых клеток центрального цилиндра против антисывороток на белки меристемы и растягивающихся клеток и выявление фазоспецифических антигенов с помощью гомологичной антисыворотки (рис. 3) позволило установить принадлежность трех из выявленных антигенов к белкам зоны растяже-

ния. Эти антигены локализованы в центральном цилиндре и, по-видимому, накапливаются при дифференциации проводящих элементов.

Среди белков коровой паренхимы удалось выявить четыре антигена, также появляющихся в фазе растяжения (рис. 3). Эти антигены сохраняются и в зрелых клетках. Возможно, хотя бы часть их принадлежит митохондриям: ранее, при использовании метода квадратов, мы обнаружили фазоспецифический антиген в митохондриях из зрелой части корня (⁴).



Рис. 3. Тканеспецифические белки корня кукурузы, Ц — белки центрального цилиндра, П — белки коровой паренхимы. Остальные обозначения как на рис. 1

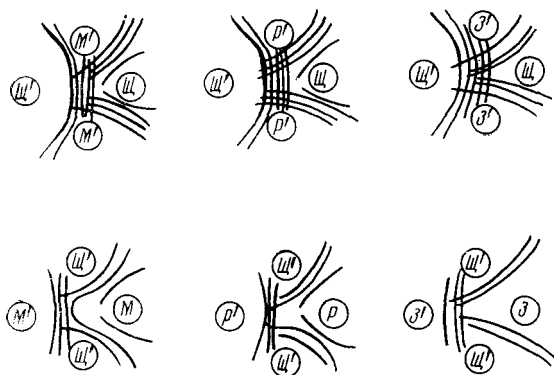


Рис. 4. Органоспецифические белки проростков кукурузы. Щ — белки щитка, Щ' — антисыворотка на белки щитка. Остальные обозначения как на рис. 1

Мы использовали описанную модификацию метода двойной иммунодиффузии и для сравнения антигенного состава двух органов проростка, наиболее резко различающихся по характеру дифференцировки, — семядоли (щитка) и корня. Для выявления антигенов, специфичных для корня, белки корня истощали сывороткой на белки щитка и выявляли гомологичной сывороткой. Белки щитка истощали сыворотками на белки разных зон роста корня и выявляли антищитковой сывороткой (рис. 4). В корне удалось обнаружить три специфичных для корня антигена, которые выявлялись независимо от фазы роста клеток корня. Щиток характеризуется пятью специфичными антигенами, по-видимому отсутствующими в корне.

Таким образом, формирование функционально активных специализированных тканей в растущем корне связано не только с количественными изменениями в белковом комплексе (⁵), но и сопровождается появлением нескольких ткане- и фазоспецифических белков. Дифференцировка семядоли (щитка) приводит к еще более заметным качественным изменениям в спектре белков. Однако, по сравнению с основной массой общих антигенов, содержание специфических белков очень невелико, их природа не известна, и пути дальнейшей идентификации пока неясны. Тем не менее обнаружение этих белков имеет принципиальное значение, и дальней-

шее исследование специфичных антигенов представляется весьма перспективным. Возможно, именно эти белки окажутся удобными маркерами клеточной дифференцировки (6) и однозначным свидетельством дифференциальной активности генов в развитии.

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

Поступило
13 VIII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Э. Е. Хавкин и др. Физиол. раст., т. 19, 160 (1972). ² В. Н. Иванов, С. И. Мишарин и др., ДАН, т. 218, № 5 (1974). ³ Г. И. Абелев, Бюлл. эксп. биол. и мед., т. 49, 1, 118 (1960). ⁴ С. И. Мишарин, А. И. Антипина, Информ. бюлл. Коорд. Совета физиол. биохим. растений (Иркутск), в. 10, 1972, стр. 11. ⁵ Э. Е. Хавкин, В кн.: Физиология корня (Итоги науки), М., 1973, стр. 58. ⁶ Р. Г. Бугенко, А. Д. Володарский, Физиол. раст., т. 14, 965 (1967).