

Л. В. ГОФШТЕЙН, В. И. РОМАШКИН

**ГИСТОНЫ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ. ЧИСЛО БЕЛКОВ
ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ МЕТОДОМ ДВУМЕРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА
В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 8 X 1974)

При исследовании гистонов чрезвычайно важно знать, сколько в действительности белков содержится в составе этой гетерогенной смеси. Такие данные могут оказать существенное влияние на наши представления о генетической и метаболической роли гистонов, значения их в создании структуры хромосом. Методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) было достигнуто разделение гистонов разного происхождения, в том числе и из зародышей пшеницы (⁷). Более высокое, чем при диск-электрофорезе, разрешение получено в настоящее время с помощью метода двумерного электрофореза в ПААГ при разделении рибосомальных белков *Escherichia coli* (^{1, 2}), животных (^{3, 4}) и растений (⁵). Показано, что зоны белков, проявляемые при диск-электрофорезе, представляют собой часто смесь нескольких белков.

В данной работе сообщается о разделении гистонов зародышей пшеницы методом двумерного электрофореза в ПААГ. Исследовали суммарные гистоны и выделенные из зародышей фракции гистонов. Суммарные гистоны получали из структурного дезоксирибонуклеопротеида (ДНП) (^{6, 7}), фракции гистонов получали по методу Джонса (⁸). Материалом служили коммерческие зародыши пшеницы производства ПНР и зародыши пшеницы сорта Краснозерная, выделенные лабораторным способом (⁹). Электрофорез в первом и втором направлениях проводили в гелях и буферах, приготовленных по методу Кальтшмидта и др. (^{1, 2}). Электрофорез в первом направлении вели 14 час. при силе тока 4 ма на колонку геля длиной 90 мм и диаметром 5 мм. Образец белка в геле помещали в середине между слоями разделительного геля. Гель с образцом белка полимеризовали в лучах лампы ПРК-2. Электрофорез во втором направлении проводили в приборе, подобном описанному Велфлом и др. (³), но в пластинах меньшего размера (100 мм×90 мм×5 мм). Пластины геля полимеризовали между двумя стенками (100 мм×100 мм) камер прибора. Колонку геля после электрофореза в первом направлении, предварительно уравновешенную буфером (¹), погружали в слой раствора мономеров с рибофлавином, который наносили на разделительный гель, и полимеризовали, как указано выше. При двумерном электрофорезе электрофорез во втором направлении вели на пяти пластинах в течение 19 час. 20 мин. при начальном напряжении 52 в. рН разделительного геля в первом направлении 9,6, во втором 4,6. Препараты фракции F1 и суммарного гистона при диск-электрофорезе наносили соответственно по 20 мкг и 70 мкг, при двумерном электрофорезе — по 200 мкг и 800 мкг. Белки при электрофорезе в вертикальном приборе двигались вниз. Электрофорез в первом и во втором направлении вели при комнатной температуре. Если сравнивали разные белки, то электрофорез их проводили в одном и том же приборе и одновременно. После электрофореза белки окрашивали по методу Кальтшмидта и др. (¹).

Результаты двумерного электрофореза гистонов представлены на рисунках. В суммарном гистоне структурного ДНП зародышей пшеницы

(рис 1а) * обнаруживаются 24 белка, из них 22 движутся к катоду и 2 — к аноду (рН 9,6). Число белков в препаратах гистонов из зародышей пшеницы другого сорта, Краснозерная, то же самое. Таким образом, эффективность метода двумерного электрофореза в ПААГ в применении к гистонам из зародышей пшеницы по крайней мере в два раза выше, чем одномерного электрофореза (7). Двумерный электрофорез фракций гистонов показал, что разрешающая способность метода возрастает за счет дополнительного разделения части белков, входящих в состав гистонов, в то время как некоторые белки проявляют себя как однородные и при двумерном электрофорезе. Так, например, во фракцию F1, согласно результатам двумерного электрофореза, входят белки 4, 5 и 7 (рис. 1б и 2а). Три зоны белков обнаружены в составе фракций F1 зародышей пшеницы и при диск-электрофорезе ((10) и рис. 1б). Однако, если белки 4 и 5 не имеют партнеров, обладающих при электрофорезе во втором направлении той же или очень близкой к ним электрофоретической подвижностью, то белок 7, по всей вероятности, проявляется при диск-электрофорезе вместе с белками 8 и 9 в одной и той же зоне, так как по электрофоретической подвижности белки 7, 8 и 9 при рН 4,6 очень близки. В действительности же белки 8 и 9 во фракцию F1, по-видимому, не входят. Поскольку уровни распределения белков при электрофорезе во втором направлении (расположение пятен по горизонталям) (рис. 1а, 2а), можно сопоставить с расположением зон белка, получаемым при диск-электрофорезе, так как условия разделения в обоих случаях очень близки между собой, то можно думать, что белкам 4 и 5 соответствуют зоны F1b и F1c соответственно, а зона F1a состоит из белков 7, 8 и 9. Распределение белков при диск-электрофорезе препаратов фракции F1, полученных с помощью хроматографии на карбоксиметилцеллюлозе (КМЦ) по (10) и по методу Джонса (8), одинаково. Остальные фракции гистонов, выявленные из зародышей пшеницы при экстракции материала (8), отличаются при диск-электрофорезе от фракций гистонов, полученных на КМЦ. При совместном электрофорезе четырех фракций гистонов, выявленных методом экстракции, не проявлялись белки 1, 6, 8—10 и 22—24, обнаруженные в составе суммар-

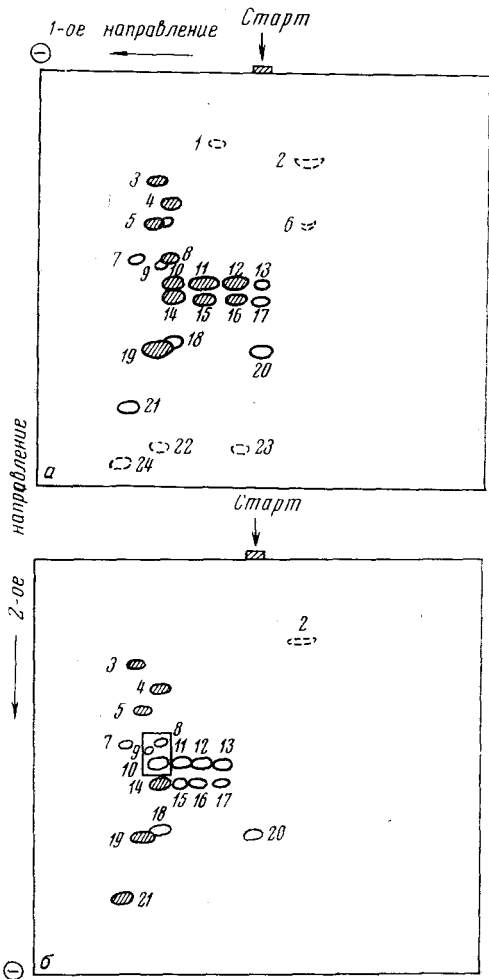


Рис. 2. Схема распределения белков при двумерном электрофорезе в ПААГ гистонов зародышей пшеницы. а — суммарный гистон ДНП; б — реконструированный суммарный гистон. Заштрихованы интенсивно окрашенные пятна белков, обведены сплошной линией — пятна белков окраски средней интенсивности, прерывистой линией — слабо окрашенные. В рамке — белки, не обнаруженные в составе реконструированного гистона

диск-электрофорезе препаратов фракции F1, полученных с помощью хроматографии на карбоксиметилцеллюлозе (КМЦ) по (10) и по методу Джонса (8), одинаково. Остальные фракции гистонов, выявленные из зародышей пшеницы при экстракции материала (8), отличаются при диск-электрофорезе от фракций гистонов, полученных на КМЦ. При совместном электрофорезе четырех фракций гистонов, выявленных методом экстракции, не проявлялись белки 1, 6, 8—10 и 22—24, обнаруженные в составе суммар-

* Рис. 1 см. на вкл. к стр. 467.

ных гистонов ДНП. Белки 1, 6 и 22—24, возможно, не характерны для ядерных гистонов зародышей пшеницы, так как наиболее подвижные компоненты гистонов ДНП цельных клеток в составе гистонов структурного ДНП ядер при диск-электрофорезе не обнаруживаются (¹¹). Отсутствие белков 8, 9 и 10 в составе реконструированного гистона можно объяснить тем, что при селективной экстракции они не извлекаются. Исходя из этого, число белков в составе гистонов зародышей пшеницы при определении методом двумерного электрофореза в ПААГ можно оценить равным 19—21.

Таким образом, были внесены некоторые изменения в метод двумерного электрофореза в ПААГ (¹, ²) и достигнуто разделение этим методом гистонов структурного ДНП зародышей пшеницы и выделенных из зародышей фракций гистонов. Показано, что гистоны структурного ДНП состоят из большего числа белков, чем было известно ранее из результатов диск-электрофореза в ПААГ. Некоторые белки, движущиеся вместе при одномерном электрофорезе, делятся при двумерном электрофорезе на 2—4 компонента. Двумерный электрофорез в ПААГ суммарного и реконструированного из фракций гистона позволяет оценить число белков в составе гистонов зародышей пшеницы равным 19—21.

Полученные данные показывают, что метод двумерного электрофореза в ПААГ может быть с пользой применен для анализа белков, входящих в состав гистонов, и дать новую информацию при исследовании вопросов специфичности, сравнительных исследованиях и решении ряда методических вопросов.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
7 X 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. Kaltschmidt, H. G. Wittman, *Anal. Biochem.*, v. 36, 401 (1970). ² E. Kaltschmidt, H. G. Wittman, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 67, 1276 (1970). ³ H. Welfle, J. Stahl, H. Bielka, *Biochim. et biophys. acta*, v. 243, 416 (1971). ⁴ Huyh-van-tan, J. Delanunay, G. Schapira, *FEBS Letters*, v. 17, 163 (1971). ⁵ B. L. Jones, N. Nagabhushan et al., *FEBS Letters*, v. 23, 167 (1972). ⁶ E. W. Johns, I. A. V. Butler, *Biochem. J.*, v. 84, 436 (1962). ⁷ Л. В. Гофштейн, В. И. Сафонов, Н. М. Сисакян, *ДАН*, т. 167, 1168 (1966). ⁸ E. W. Johns, *Biochem. J.*, v. 92, 55 (1964). ⁹ Л. В. Гофштейн, Н. А. Васильева, *Прикл. биохимия и микробиол.*, т. 4, 451 (1968). ¹⁰ J. C. Aufran, *Les desoxyribonucleoproteins et les histones du grain de blé. Aspects physico-chimique et physiologique*, Thèse de Doctorat. Paris, 1973, p. 57. ¹¹ Л. В. Гофштейн, *Биохимия*, т. 32, 959 (1967).