

Г. М. АРАКЕЛЯН

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ГИСТОНОВ ИЗ АНАЭРОБНОЙ ИНФУЗОРИИ *OPHRYSOCOLEX CAUDATUS*

Интерес к ядерным гистонам за последнее время возрос в связи с исследованиями, посвященными изучению механизма регуляции на уровне генов [4—8, 11, 12].

Однако роль этих белков как модуляторов действия генов, отмеченная впервые Стедман и Стедманом [27], окончательно не установлена. В настоящее время имеются многочисленные сообщения о составе и свойствах гистонов, выделенных из различных органов высших животных и растений [4, 8, 12, 26]. Несмотря на это, для выяснения биологической роли этих белков необходимы дальнейшие исследования. Особый интерес в этом отношении представляют низшие организмы, у которых наличие гистонов часто ставится под сомнение, в частности у одноклеточных.

В сообщениях о наличии гистонов у одноклеточных часто опираются на гистохимические данные [10, 13, 15]. В тех немногих случаях, когда эти белки выделены, выяснилось, что и по составу, и по соотношениям фракции они отличны от типичных гистонов [23, 28, 30]. Так, выделенные из *Tetrahymena pyriformis* гистоны не содержат аргининбогатого гистона и по своему аминокислотному составу близки к лизинбогатому гистону зубной железы телят. Наличие остальных фракций гистонов у этого организма пока не установлено.

В известной нам литературе данных по изучению белкового состава макронуклеуса анаэробной инфузории *Ophryoscolex caudatus* не обнаружено. В настоящей работе мы задались целью разработать метод выделения макронуклеуса, а также провести изучение его белкового состава.

Материал и методика. Подопытными животными служили овцы № 1 и № 2 3—4-летнего возраста, несущие хронические фистулы на рубце.

В период опытов животные кормились люцерной (80%) и сеном (20%). Отбор проб производился через рубцовую фистулу посредством стеклянной трубочки диаметром 10 мм, путем высасывания содержимого рубца.

Ophryoscolex caudatus выделялся из фракции *Oligotricha* [14]. Для полного освобождения *Isotricha* масса *Oligotricha* инкубировалась в течение 1,5 час. в термостате при 39° в ацетат-фосфатном буфере [22] с добавлением 0,5% глюкозы. В присутствии глюкозы *Isotricha* и другие *Holotricha* накапливают в своем теле в большом количестве полисахариды типа «парагликогена», в результате чего значительно повышается их

удельный вес. Для отделения *Isotricha* масса инфузорий центрифугировалась при 10g—2 мин в градиенте с двумя растворами крахмала (15—20%), приготовленными на том же буфере. Отяжелевшие *Isotricha* осаждались на дне пробирки белым слоем *Ophryoscolex caudatus* с небольшим количеством *Metadinium* и *Polyplastron* и собирались в интерфазе между двумя растворами крахмала, откуда они осторожно высасывались и промывались в ацетат-фосфатном буфере с глюкозой для удаления крахмала. После этого масса *Ophryoscolex* суспендировалась в том же буфере и центрифугировалась при 10g—2 мин. *Metadinium* и *Polyplastron* осаждались на дне пробирки, а надосадочная жидкость содержала *Ophryoscolex caudatus*.

Выделение макронуклеуса. Для разрушения опорного фибрилярного скелета был сконструирован гомогенизатор, состоящий из двух бритвенных ножей со скоростью вращения 1500 об/мин.

Такой способ гомогенизации можно использовать также при выделении макронуклеусов инфузории из самых различных представителей семейства *Ophryoscolecidae* и отряда *Holotricha* (рис. 1).

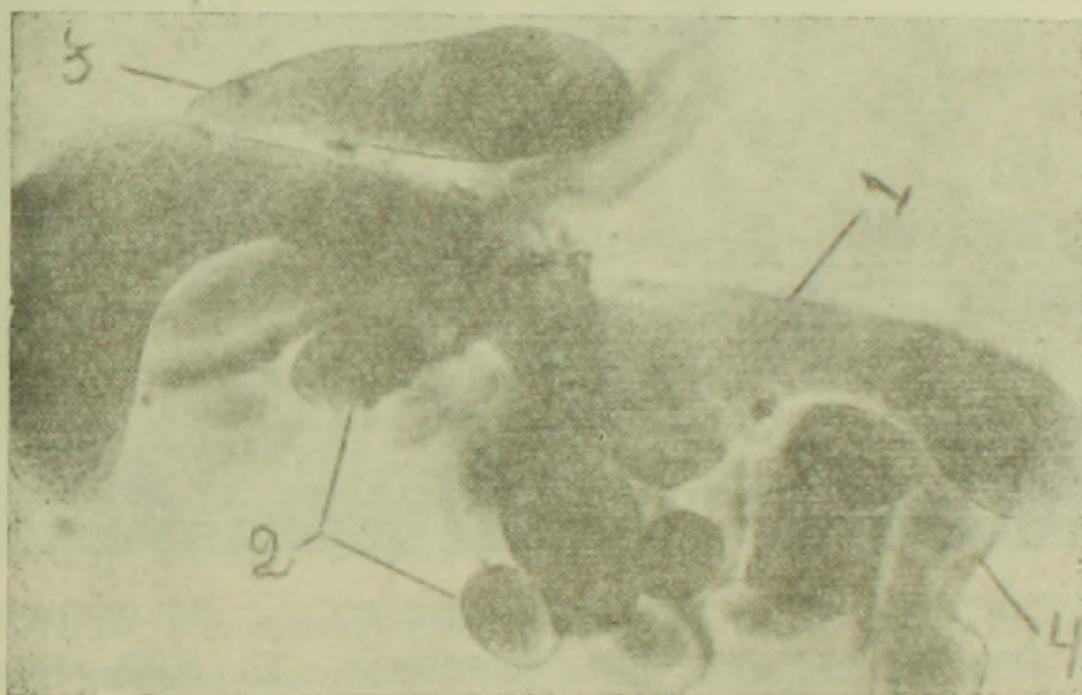


Рис. 1. Изоллированные макронуклеусы из различных представителей инфузорий семейства *Ophryoscolecidae* и отряда *Holotricha*. 1. *Metadinium medium*. 2. *Dasytricha ruminantium*. 3. *Ophryoscolex caudatus*. 4. *Polyplastron multivesiculatum*.

Дальнейшие процедуры проводились ранее сообщенным методом [2] на холоду.

Чистота фракций проверялась под обычным и люминесцентным микроскопом (рис. 2).

Выделение суммарного гистона и его фракций [29]. Фракция макронуклеуса, проверенная на чистоту, гомогенизировалась на холоду в 0,14 м растворе NaCl $\text{pH}=7,2$ для удаления ядерного сока и ядерных рибосом [9, 23]. Осадок экстрагировался 0,5 NH_2SO_4 в течение 18 час. для выделения гистонов. Из сернокислого экстракта суммарный гистон осаждался 60% этанолом в течение 3—4 час. на холоде. Гистон из ДНП выделялся по общепринятой методике [9].

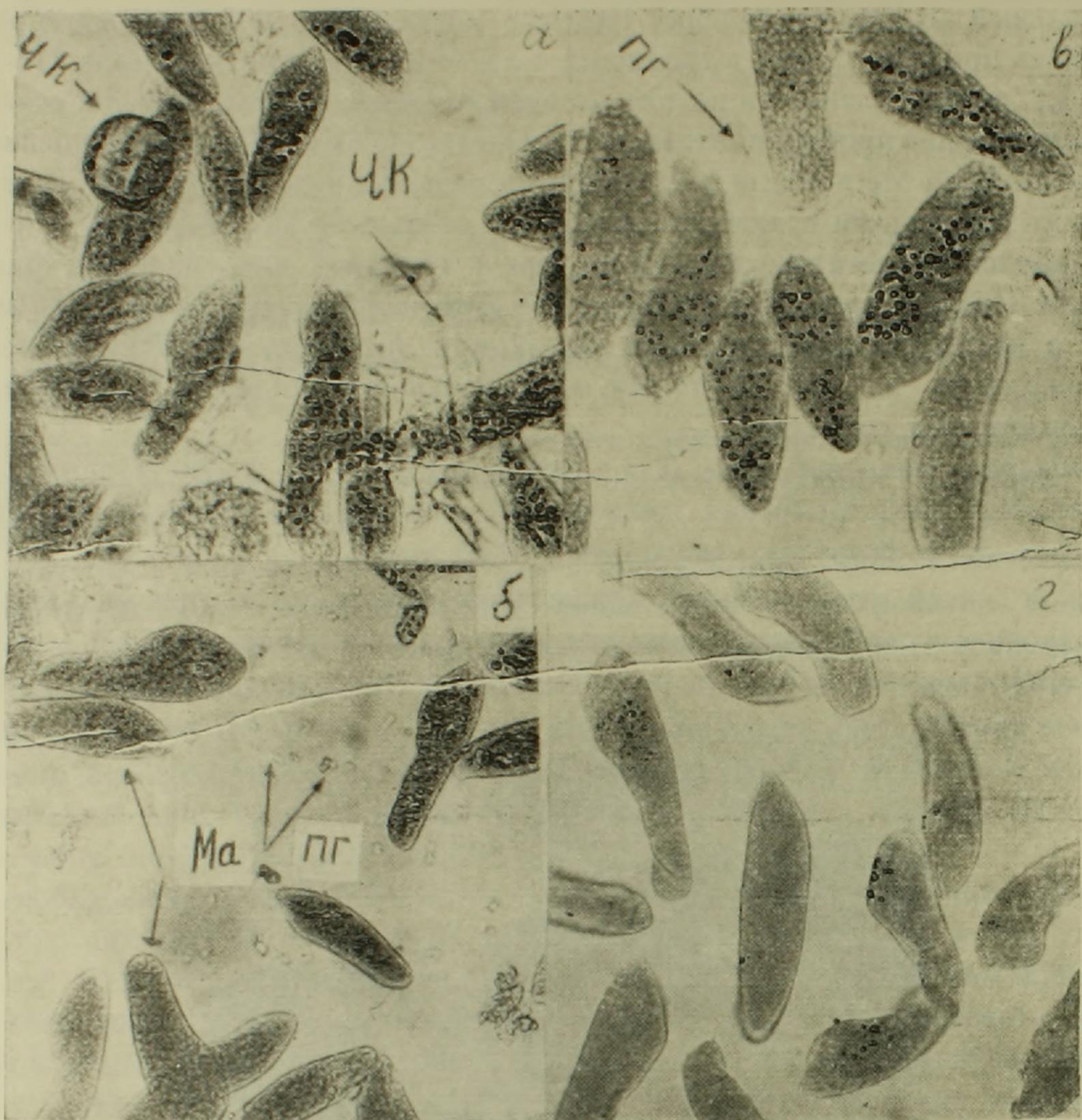


Рис. 2. Последовательные этапы выделения макронуклеусов. а, б) Изолированные макронуклеусы (Ma), загрязненные частицами растительного корма (ЧК) и гранулами парагликогена (ПГ); в) макронуклеусы с единичными гранулами парагликогена (ПГ); г) микроскопические чистые макронуклеусы (микроскоп МБИ-6×400).

Отдельные фракции гистона выделялись избирательным осаждением холодным этанолом. Полученные фракции промывались холодным этанолом и ацетоном и хранились в эксикаторе.

Аминокислотный состав изучался бумажной хроматографией [20]. Триптофан определялся по методу Хорна [1]. Общий азот по микрокельдалю, а азот аминокислот по методу Хардинга и Мак-Лина [3].

Дисковый электрофорез в полиакриламидном геле. Синтез полиакриламидного геля и электрофоретическое разделение суммарного гистона и отдельных его фракций проводили по методу Мак-Аллистера [24, 25] в приборе, предложенном Дэвисом [17], при силе тока 5 ма на трубку в течение 4 час. Концентрация наносимого белка составляла от 100—150 мкг.

Гели окрашивали, выдерживая в течение 18 час. в 0,5% растворе кумасси голубого (Coomassie Blue G1. serva) в системе метанол—ледяная

Таблица 1
Аминокислотный состав суммарного гистона и его фракций
Аминокислоты, мол. %

Аминокислоты	Ophryoscolex caudatus				Calf thymus			Tetrahy- mena
	гистон	гистон из ДНП	фракции		гистон (19)	фракции (16, 29)		
			гистон I	гистон II		гистон I	гистон II	гистон (23)
Цистеин	—	—	—	—	—	—	—	—
лизин	21	20,0	8	24	17,6	7,22	22,4	16,3
гистид	3,4	3,6	7	0,8	1,5	1,18	—	2,6
Арг.	9,5	8,5	9,3	2	7,3	7,02	1,98	7,0
асп	5	5,2	4	3,5	4,4	3,12	1,6	7,5
Сер.	6	5,5	4,5	2	4,9	3,17	4,02	7,8
глиц.	8,9	7,8	3,2	5	8,1	6,13	4,62	7,4
глут.	15	15	5	10	8,6	6,18	2,6	9,1
треон.	6,2	6,0	3,2	5,5	5,4	3,85	2,92	6,3
алан.	13	14	7	14,6	15,5	7,6	12,7	10,0
прол.	4	4,5	3,4	5,2	5,1	2,51	5,09	4,0
тироз.	5	5	2,5	0	1,7	1,6	0,55	1,6
мет.	—	—	0,51	0	0	0,67	0,15	1,2
валин	5	4,8	3	2,5	5,5	2,72	3,0	6,0
Ф. алан	4,5	5	2	4	2,2	1,42	0,55	2,9
лейц + и. лейц.	13,5	13,5	9	9	12,3	7,22	4,27	10,3
инптоф.	—	—	—	—	—	—	—	—

уксусная кислота—вода (5:1:5). Для обесцвечивания гель вымачивался в 7%-ной уксусной кислоте при многократной смене растворителя.

Результаты и их обсуждение. Из макронуклеуса *Ophryoscolex caudatus* были выделены как суммарный гистон, так и его основные фракции, обозначенные как гистон I (аргининбогатый гистон) и гистон II (лизинбогатый гистон). Общий выход гистонов составлял около 25% массы сухих макронуклеусов. Содержание гистона I, определенное по N (NH₂), составляло 54—66% от суммарного гистона, для гистона II—34—46%.

Содержание аминокислот. Как видно из таблицы, суммарные гистоны, выделенные различным способом, имеют близкий аминокислотный состав. Они характеризуются высоким содержанием лизина, гистидина, аргинина и глютаминовой кислоты, но соотношение между количествами щелочных аминокислот и кислых аминокислот практически оказалось значительно близким к тому же соотношению щелочных и кислых аминокислот суммарного гистона зубной железы телянка и гистона *Tetrahy-mena pyriformis*.

Характерным для фракции гистон I явилось повышенное содержание гистидина, а во фракции гистон II—глютаминовой кислоты (рис. 3). При сравнении же с аминокислотным составом суммарного гистона *Tetrahy-mena* отмечено значительно высокое содержание лизина, глютаминовой кислоты и тирозина.

Электрофорез в полиакриламидном геле. Электрофореграммы суммарного гистона и отдельных фракций представлены на рис. 4, по которому видно, что суммарный гистон распределяется на 4 основные зоны, услов-

Аминокислотный состав суммарного гистона
и отдельных фракций

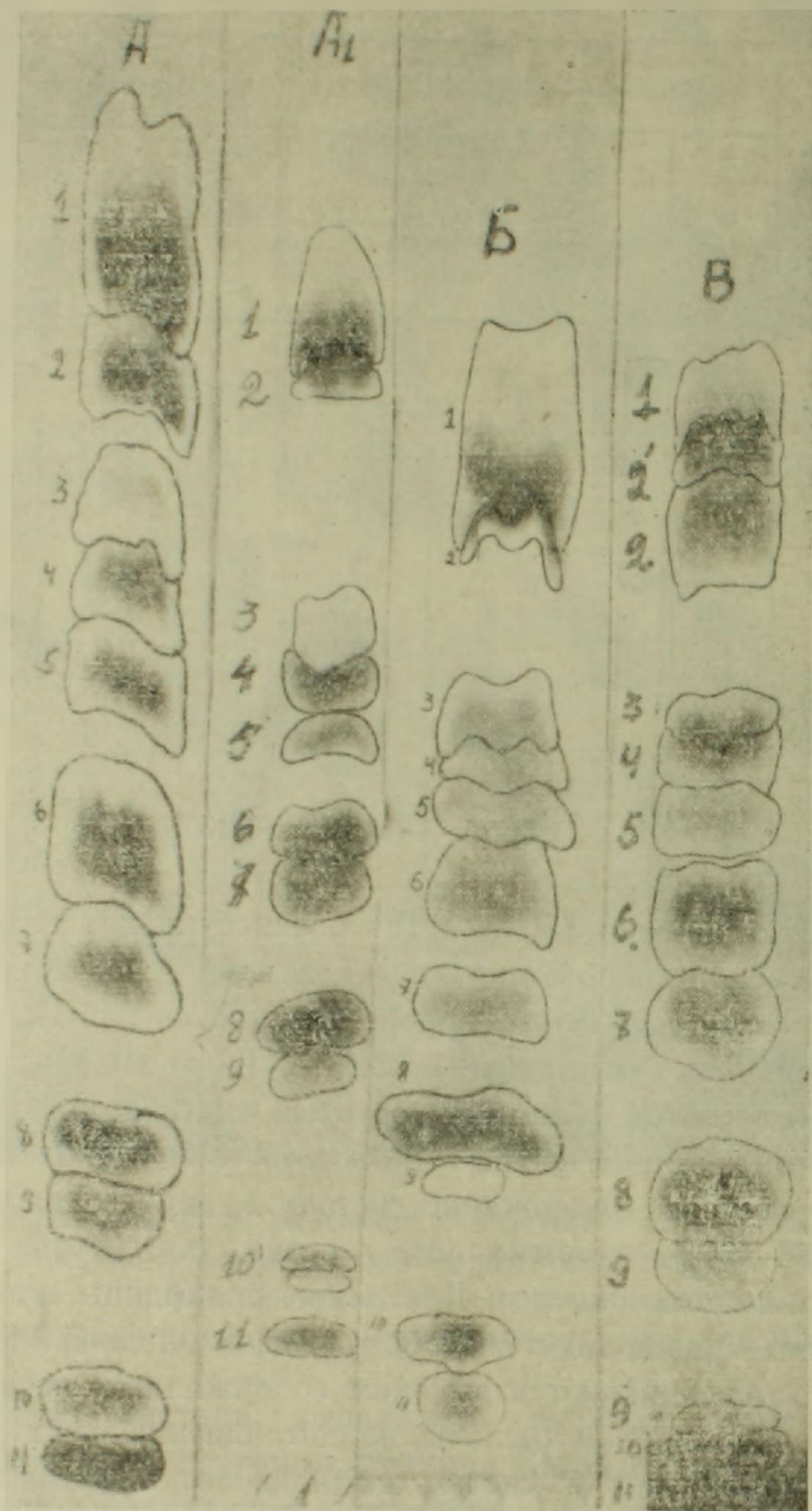


Рис. 3. А—суммарный гистон. А₁—суммарный гистон из ДНП. Б—гистон II (богатый лизином). В—гистон I (богатый аргинином). А, А₁—1. Лиз.—Гист., 2. Аргинин, Б—1. Лиз., 2. Аргинин. В—1. Лизин, 2. Гистидин, 2. Аргинин. А, А₁, Б, В—3. Асп к-та, 4. Серин, 5. Глиц., 6. Глут. к-та, 7. Треонин, 8. Аланин, 9. Тирозин, 9'. Метионин, 10. Вал./Ф. алачин, 11. Лейцин+Изолейцин.

но обозначенные буквами А. Б. В, Г. Зона А отличается минимальной подвижностью и состоит обычно из одной полосы; зона Б из 1—2 широких не очень очерченных полос, зона В, наиболее интенсивно окрашенная, из 2—3 полос, зона Г включает легкоподвижные наиболее слабо-

окрашенные полосы. В наших опытах получено разделение суммарных гистонов на 9—10 фракций.

Гистон I своей гетерогенностью четко отличается от суммарного гистона, его электрофоретические фракции можно условно разделить еще на 4 зоны—А, Б, В, Г. Наибольшая подвижность наблюдается в зоне Г, где содержатся 2 слабоокрашенные полосы; зона В состоит из 2-х интенсивно окрашенных полос, которые особенно четко выявлены в электрофоре-

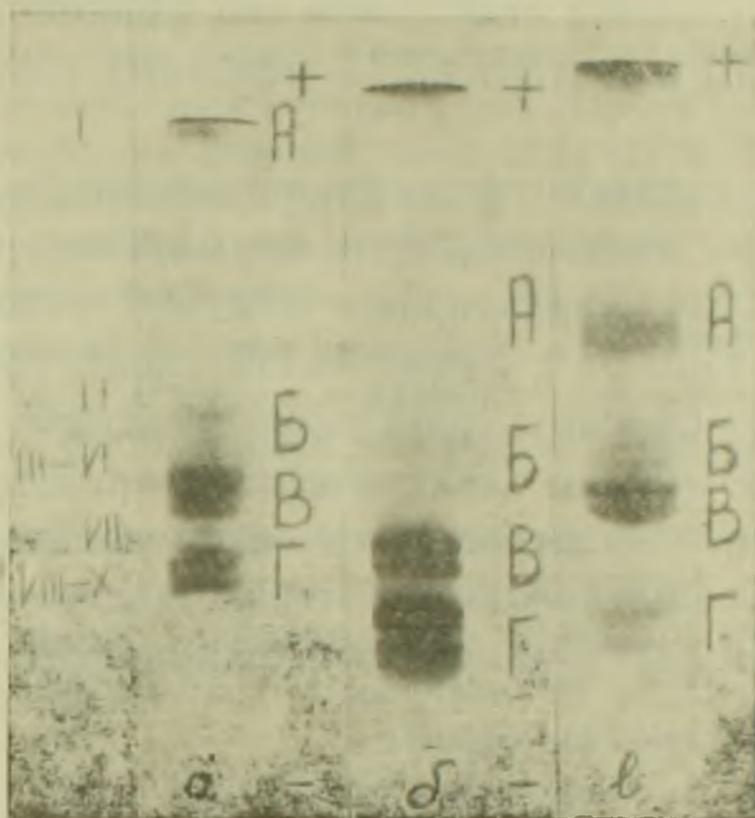


Рис. 4. Электрофореграммы суммарного гистона и отдельных фракций. а) суммарный гистон, б) гистон II (богатый лизином), в) гистон I (богатый аргинином).

граммах суммарного гистона; зона Б состоит из 3-х небольшой подвижности и слабоокрашенных полос. Наконец, в зоне А имеем очень медленнодвигающиеся белковые фракции, которые распределяются в одной широкой, средней интенсивности зоне. Всего имеется 9 полос.

Гистон II отличается от остальных гистонов как по количеству фракций, так и по электрофоретической подвижности и интенсивности окрашивания. Интенсивно окрашенная зона А, характерная для гистона I, здесь очень слабо выражена, остальные же зоны, которые содержат 2—3 полосы, очень интенсивно окрашены и обладают большой подвижностью. Таким образом, из изолированных макронуклеусов *Ophryoscolex caudatus* путем кислотной экстракции были извлечены фракции суммарного гистона, которые по своему аминокислотному составу и электрофоретической подвижности приближаются к гистонам зубной железы телят.

Характерным свойством гистонов *Ophryoscolex* является несколько более высокое содержание щелочных аминокислот и глутаминовой кислоты. Аминокислотный состав отдельных фракций *Ophryoscolex* при сравнении с соответствующей фракцией гистонов зубной железы телят отличается особенно высоким содержанием гистидина во фракции гис-

тон I. Наличие этой фракции у других одноклеточных пока не выявлено. У всех изученных форм описываемый суммарный гистон по своему аминокислотному составу близок к лизинбогатому гистону зобной железы теленка [23, 24, 30]. Ли и Шербаум [24] при электрофоретическом исследовании суммарного гистона *Tetrahymena* в зоне А обнаружили наличие характерных полос гистонов, богатых аргинином. Других сведений о наличии аргининбогатого гистона у одноклеточных в литературе не имеется.

Картина, полученная при электрофоретическом разделении суммарного гистона *Ophryoscolex caudatus* и его фракции, показывает, что эти гистоны гетерогенны и состоят из 4-х основных зон, в которых размещается 9—10 полос.

Таким образом, по степени гетерогенности наши гистоны близки к гистонам зобной железы теленка [25] и суммарному гистону *Tetrahymena rugifomis* [18, 21, 24]. Характерным для *Ophryoscolex caudatus* оказалось присутствие зоны А с очень малой электрофоретической подвижностью, что можно объяснить либо высоким молекулярным весом белков этой фракции, либо малым электрическим зарядом ее. Некоторое наличие выявляется и при электрофоретическом сравнении полос отдельных фракций гистонов. Оно заключается как в относительном содержании этих фракций, так и электрофоретической подвижности.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии и лаборатория
технической биохимии

Поступило 18.VIII 1971

Գ. Մ. ԱՌԱՔԵԼՅԱՆ

ՀԻՍՏՈՆՆԵՐԻ ԱՆՁԱՏՈՒՄԸ ԵՎ ԲՆՈՒԹԱԳՐՈՒՄԸ OPHRYOSCOLEX CAUDATUS ՏԵՍԱԿԻ ԱՆԱԷՐՈՒԹ ԻՆՖՈՒՂՈՐԻԱՅԻՑ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ներկա աշխատանքում ոչխարի կտրիչի սակավաթարթիչ ինֆուզորիաներից, գրադիենտ ցենտրիֆուգացմամբ անջատվել է *Ophryoscolex caudatus* տեսակը, որից հոմոգենիզացման և ցենտրիֆուգացման ճանապարհով մեկուսացվել են նրանց մեծ կորիզները: Ստացված կորիզները եղել են մաքուր ինչպես ամբողջական ինֆուզորիաներից, այնպես էլ ցիտոսոլազմատիկ բեկորներից և պարագլիկոգենի հատիկներից: 0,14 m NaCl pH=7,4-ի լուծույթով կորիզահյուսի սպիտակուցները և կորիզային ռիբոսոմները հեռացնելուց հետո կորիզների մնացորդը մշակվել է 0,5 NH₂SO₄-ով, այս լուծույթը պարունակել է գումարային հիստոնները, որը սառը էթանոլով ֆրակցիոն նստեցմամբ բաժանվել է 2 ֆրակցիաների լիզինով հարուստ հիստոն (հիստոն II) և արգինինով հարուստ հիստոն (հիստոն I):

Թղթային քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով հետազոտվել է ինչպես գումարային հիստոնների, այնպես էլ նրա առանձին ֆրակցիաների ամինոթթվային կազ-

մը: Ստացված սվյալները համեմատվել են հորթի ուրցաղեղձի գումարային հիստոնների և համանուն ֆրակցիաների, ինչպես նաև Tetrahymena-ի գումարային հիստոնների հետ:

Ինչպես առանձին ամինաթթուների քանակական պարունակությամբ, այնպես էլ էլեկտրաֆորետիկ հատկություններով, Ophryoscolex-ի հիստոնները տարբերվում են նշված օրյեկտների գումարային հիստոններից և նրանց առանձին ֆրակցիաներից:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Алексеев А. П. Современные методы в биохимии. Изд. «Медицина», 1964.
2. Аракелян Г. М. Всесоюзный биохимический съезд. Тезисы 2-й секции, 1969.
3. Блок Р. Аналитические методы белковой химии. Изд. ИЛ, 1963.
4. Боннер Дж. Молекулярная биология развития. Изд. «Мир», 1967.
5. Буш Г. Гистоны и другие ядерные белки. Изд. «Мир», 1967.
6. Ганелина А. М. Цитология, 7, 155, 1965.
7. Гистоны и перенос генетической информации. Изд. «Мир», 1968.
8. Дебабов В. Г., Ребентиш Б. Н. Успехи современной биологии, т. 70, вып. 2 (5), 1970.
9. Кедрова В. М., Орлова Л. В. Современные методы в биохимии. Изд. «Медицина», 1968.
10. Райков И. Б. Карниология простейших. Изд. «Наука», 1967.
11. Рапопорт Э. А. Успехи современной биологии, 59, 57, 1965.
13. Суханова К. М. В сб. Вопросы цитологии и протистологии, 185, изд. «Наука», 1960.
14. Тер-Карапетян М. А., Арутюнян Т. Г., Семерджанян Г. А. Биологический журнал Армении, 1, 1970.
15. Alfert M., Goldstein J. Exp. Zool., 130, 403, 1955.
16. Daly M. M., Mirsky A. E. Journal General Physiology, 38, 405, 1955.
17. Davis B. Y. Ann. N. Y. Acad. Sc., 121, 404, 1964.
18. Gorovsky M. A. Cell Biology. 47, 3, 1970.
19. Grompton and other, Journal of Biological Chemistry, 215, 787, 1955.
20. Hais I. M., Macek K. Paper. Chrom. Prague, 1963.
21. Hardin G. A. a. o. J. Cell biol., 52, 3, 1967.
22. Held P. Y., Oxford A. E. Biochemical Journal, 53, 506, 1953.
23. Koichi J. and other. Journal of Biochemistry. 58, 3, 1965.
24. Lee Y. L., Scherbaum O. H. Biochemistry, 5, 6, 1966.
25. McAllister and other. Analytical Biochemistry. 5, 321, 1963.
26. Phillips D. M. Progr. Biophys. Chem., 12, 211, 1961.
27. Stedman E., Stedman E. Nature, 152, 503, 1943.
28. Tonino G. I., Roziju Th. Biochem. et biophys. acta., 124, 427, 1966.
29. Ul N. Biochemic and Biophysik Acta, 25, 493, 1957.
30. Ywai K. In the Nucleohiston (Ed. Bonner Y. Tsó). Hold day San. France, 1964.