

УДК 581.143.547.963

ВЛИЯНИЕ ГИББЕРЕЛЛИНА И ЗЕЛЕННОГО ПРОЧНОГО НА ГИСТОНЫ ПРОРАСТАЮЩИХ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ

А. О. ВАРДЕВАНИН, Р. Р. ВАРДАНЕТИАН, Г. А. ПАНОСЯН

Результаты исследований свидетельствуют о существенных изменениях относительного содержания гистоновых фракций, полученных хроматографией на биоэле Р-60 и выявляемых электрофорезом в ПААГ при обработке зародышей пшеницы гиббереллином и зеленым прочным. Показано также изменение относительного содержания гистона H1 и коровых гистонов.

Ключевые слова: зародыши пшеницы, гистоны, зеленый прочный, гиббереллин.

Обработка зародышей пшеницы гиббереллином (ГБ) сопровождается увеличением матричной активности хроматина [5], что отражается на структурных перестройках ДНК в хроматине, выявляемых методами плавления и кругового дихроизма (КД) [2—4]. Ранее нами было показано, что изменение темпов роста проростков изолированных зародышей пшеницы под действием стимулятора роста и урожайности сельскохозяйственных культур на фоне действия зеленого прочного (ЗП) отражается на дифференциальных кривых плавления (ДКП) хроматина [2] и положительной эллиптичности спектра КД [3]. Наблюдаемое смещение температуры плавления (T_m) нуклеосомной части хроматина в сторону снижения, а также возрастание амплитуды положительной эллиптичности спектра КД хроматина под действием ГБ может быть вызвано изменениями в конформации ДНК в результате модификации суперструктуры хроматина гистонами или негистоновыми белками.

Выяснение интимных механизмов, лежащих в основе регуляции экспрессии и модификации генной активности, может быть полным при детальном исследовании изменений, происходящих в отдельных компонентах хроматина. В настоящей работе исследовались изменения в гистонах при обработке изолированных зародышей пшеницы ГБ и ЗП.

Материал и методика. Зародыши семян сорта Безостая 1 пренарили по Джонстону и Штерну [7]. Хроматин и гистоны выделяли по методам, описанным в работе [10]. Фракционирование гистонов осуществляли на колонке с биоэле Р-60 (BIO-RAD, США). Для приготовления образцов гистоны растворяли в смеси, состоящей из 6 М мочевины, 0,02 н HCl, 0,5%-ного диэтиленгликоля (pH 1,7), и оставляли на ночь при 4°. Высота столбика геля—90 см, диаметр колонки—1,1 см (объем 135 мл). Элюцию осуществляли раствором, содержащим 0,05 М NaCl и 0,02 н HCl. Фракционирование проводили при комнатной температуре [7]. Количество наносимого на колонку белка составляло 17 оптических единиц при длине волны 230 нм. Регистрацию профилей элюции осуществляли в проточной кювете объемом 0,3 мл спектрофотометра Spccord UV-VIS, присоединенного к самописцу «К-200». Фракции отбирали на коллекторе ОЕ-606 (Венгрия), по 1,25 мл. Скорость элюции—5 мл/час.

Электрофорез гистонов и окрашивание гелей проводили по методам, описанным в работах [2, 12]. Денситометрирование гелей осуществляли на денситометрической приставке спектрофотометра Unicam SP 8-100.

Количественное соотношение отдельных гистоновых фракций рассчитывали по формуле $S_{\text{бел.}} = |gH_i| \cdot \frac{1}{a_i} \cdot H_i$ — высота пика на денситограмме, a_i — его ширина. Общее количество белка принимали за 100% и вычисляли процентное соотношение фракций. Для определения молярного соотношения фракций проводили пересчет, принимая молекулярный вес H_1 равным 23000, H_2 — 13800, H_2a — 11000, H_3 — 15300 и H_4 — 11300.

Проращивание и обработка зародышей описаны в работе [4].

Все результаты статистически обработаны. Ошибка в расчетах содержания гистоновых фракций из хроматограмм и денситограмм не превышала 0,2%.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены профили элюции и содержание отдельных гистоновых фракций из сухих (А), прорастающих (В), обработанных ЗП (С) и ГБ (Д) зародышей. Видно, что при прорастании происходят изменения в количественном составе фракций

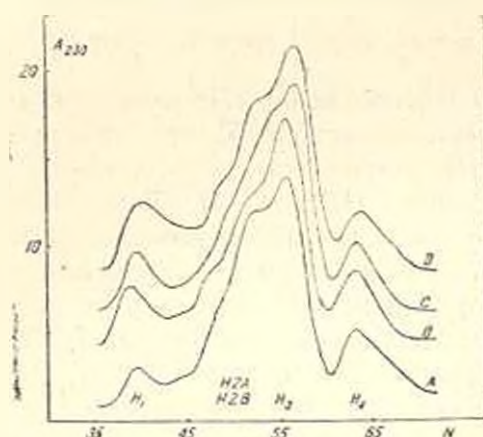


Рис. 1. Профили элюции тотальных гистонов из сухих (А), прорастающих (В), обрабатываемых ЗП (С) и ГБ (Д) в течение 24 ч зародышей пшеницы.

и частичная редукция гистонов H_1 и H_3 . Одновременно несколько увеличивается суммарное содержание фракций H_2a и H_2b , а также H_4 . Под действием ГБ наблюдаемая тенденция усиливается. В присутствии ЗП содержание отдельных фракций практически не отклоняется от контроля.

Сопоставление денситограмм электрофоретического профиля тотальных гистонов из хроматографа тех же объектов показывает, что общая тенденция наблюдаемых изменений сохраняется. Однако численные значения отдельных фракций, рассчитанных на основании денситограмм, несколько отличаются от таковых, вычисленных на основании профилей элюции (табл. 1). На рис. 2 приведены электрофореграммы и денситограммы тотальных гистонов, выделенных из сухих (А), прорастающих в течение 24 ч (В) и обрабатываемых ГБ (С) и ЗП (Д) в течение 24 ч зародышей пшеницы.

В ряде работ показано, что количественные соотношения гистонов, богатых аргинином и лизинном, не эквимоларны, не одинаковы в этом отношении также аргининбогатые коровые гистоны [7], в частности, обогащенные гистонном H_3 .

Наблюдаемая нами редукция гистона H_1 при прорастании и обра-

ботке зародышей может привести к деконденсации хроматина. Возрастание матричной активности хроматина зародышей пшеницы под действием ГБ [2] отражается на ДКП (смещение Тм в сторону сниже-

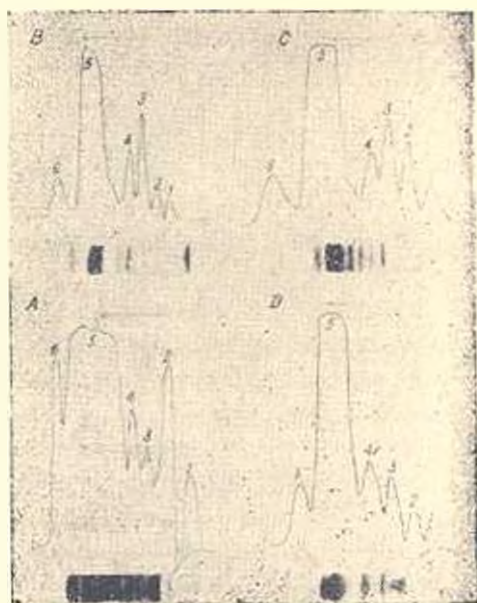


Рис. 2. Электрофореграммы и денситограммы электрофоретического профиля тотальных гистонов, выделенных из сухих (А), прорастающих (В), обрабатываемых ГБ (С) и ЗП (Д) в течение 24 ч зародышей пшеницы.

ния) и спектрах КД [3]. Одной из причин структурных изменений в хроматине может быть изменение в его гистоновых компонентах. Нами была показана различная термолабильность комплексов ДНК с гистонами из сухих и прорастающих зародышей, являющаяся, по-видимому, следствием существенных изменений относительного содержания гистона Н1 и коровых гистонов. Отметим, что при одновременной обработке зародышей ГБ Тм нуклеосомной части хроматина понижается в той же мере, в какой это имеет место у контрольных двухдневных зародышей, и оказывается значительно ниже, чем у контрольных однодневных [4]. Сопоставление этого показателя с уменьшением количества Н1 и Н3 у зародышей, обработанных ГБ, по сравнению с аналогичным показателем контрольных показывает, что одной из причин различий в ДКП хроматина, стимулированного к активной транскрипции ГБ и нестимулированного, является редукция гистона Н1. А существенные изменения в ДКП нуклеосомной части хроматина [2, 4] являются результатом падения относительного содержания коровых гистонов (табл.) и, возможно, модификации гистонов при обработке ГБ [1], когда молярное содержание фракций Н2а, Н2в, Н4 возрастает равномерно, с сохранением эквимоллярности.

Результаты изучения скорости включения меченого предшественника РНК в хроматин зародышей, обработанных ЗП, свидетельствуют о том, что доступность матрицы ДНК для транскрипции увеличивается. Возрастание амплитуды положительной эллиптичности спектра КД хроматина при этом отражает увеличение матричной активности [3, 8]. Активация хроматина под действием ЗП сопровождается смещением

Таблица

Относительное содержание отдельных фракций гистонов из хроматина сухих (0), прорастающих в течение 24 ч (24), обработанных гиббереллином (ГБ) и зеленым прочным (ЗП) зародышей пшеницы*

Фрак- ции ги- стонов	Время прорастания							
	0		24		ГБ		ЗП	
	ЭФ	ХР	ЭФ	ХР	ЭФ	ХР	ЭФ	ХР
Н1	8.1±0.2	9.6±0.2	6.9±0.2	8.4±0.2	5.6±0.1	6.1±0.1	6.7±0.1	8.2±0.2
Н2А	12.1±0.2	25.3±0.15	15.6±0.3	31.5±0.4	17.5±0.3		15.0±0.3	
Н2В	13.8±0.3		14.1±0.3		16.3±0.4	12.7±0.5	15.6±0.3	31.0±0.4
Н3	38.3±0.5	39.0±0.7	34.0±0.6	35.8±0.6	30.9±0.3	33.7±0.8	32.9±0.5	35.2±0.6
Н4	27.4±0.5	23.1±0.4	29.1±0.6	24.3±0.5	30.7±0.5	27.5±0.5	29.9±0.4	24.8±0.4

* Расчеты сделаны из денситограмм электрофоретических профилей (ЭФ) и хроматограмм (ХР). Фракции Н2А и Н2В при хроматографическом разделении элюируются одним пиком.

легкоплавких участков и сторону низких температур и их количественным увеличением. Определенный вклад в возрастание положительной эллиптичности спектра КД и параметров плавления может вносить модификация гистонов или уменьшение количества гистона Н1. Однако анализ относительного содержания фракции гистонов, полученных методами хроматографии и электрофореза, показывает, что обработка зародышей ЗП не вызывает сколько-нибудь заметной разницы в гистонах. Видимо, изменения эллиптичности спектра КД и параметров плавления в данном случае скорее всего связаны или с модификацией гистонов, или с другим компонентом хроматина—негистоновыми белками.

Таким образом, при прорастании зародышей пшеницы, наряду с редукцией гистонов Н1 и Н3, увеличивается мольное содержание гистонов Н2а—Н2в и Н4. При обработке ГБ наблюдаемая тенденция усиливается, и мольные соотношения гистоновых фракций становятся характерными для «нормальных» нуклеосом. Эти данные указывают на то, что возрастание матричной активности хроматина при прорастании может быть вызвано упорядочением мольных соотношений гистонов. Причиной усиления этого процесса под действием ГБ является, по-видимому, дальнейшее упорядочение синтеза гистонов. Под действием ЗП наблюдаемые эффекты выражены меньше, а мольные соотношения гистонов мало чем отличаются от таковых прорастающих зародышей. Следовательно, стимулирующее действие ЗП не отражается на составе гистонов.

Обобщая вышесказанное, можно прийти к выводу, что механизм действия ЗП на уровне генома не связан с количественными изменениями гистоновых компонентов хроматина, и то время как ГБ вызывает существенные сдвиги в гистонах. Следовательно, ГБ и ЗП по-разному действуют на геном. Наблюдаемые особенности в составе гистонов су-

хих зародышей пшеницы свидетельствуют о необходимости проведения дальнейших исследований в этом направлении.

Ереванский государственный университет.

Институт экспериментальной биологии

АН Армянской ССР

Поступило 8.VII 1985 г.

ԳԻԲԵՐԵԼԻՆԻ ԵՎ ԿԱՆԱԶ ԱՄՈՒՐԻ ԱԶԳԵՅՈՒԹՅՈՒՆԷՐ ՑՈՐԵՆԻ ԱՆՈՂ ՍԱՀՄԵՐԻ ՀԻՍՏՈՆՆԵՐԻ ՎՐԱ

Ա. Ն. ՎԱՐԴԵՎԱՅԱՆ, Հ. Ռ. ՎԱՐԴԱՊԵՏՅԱՆ, Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

Կատարվել է ցորենի աճող և գիրերելինով ու կանաչ ամուրով մշակված սաղմերի բրոմատինի հիստոնների հեղ-բրոմատոգրաֆիա: Ստացված հիստոնների ֆրակցիաների կազմի գնահատման համար անց է կացվել այդ ֆրակցիաների և տոտալ հիստոնների էլեկտրաֆորեզ:

Ստացված տվյալները վկայում են հիստոնների ֆրակցիաների համեմատական քանակության էական փոփոխությունների մասին՝ հայտնաբերված բրոմատոգրաֆիայի և էլեկտրաֆորեզի մեթոդներով, սաղմերը գիրերելինով և կանաչ ամուրով մշակելուց հետո: Յույց են տրվել հիստոնի H1 և նուկլեոսոմայի կորի հիստոնների համեմատական քանակությունների փոփոխությունները:

INFLUENCE OF GIBBERELLIN AND FAST GREEN ON HISTONES OF GERMINATING WHEAT GERMS

A. O. VARDEVANYAN, R. R. VARDAPETYAN, G. H. PANOSYAN

Gel-chromatography of histones from the chromatin of germinated and treated with gibberellin and fast green wheat germs has been carried out. For the evaluation of component composition of obtained histone fractions, an electrophoretical analysis of these fractions and total histon has been held.

The obtained results testify about essential changes of relative content of histone fractions received with chromatography on *Bio-Gel* P-50, obtained by electrophoresis in polyacrilamide gel during treatment of wheat germs with gibberellin and fast green. Changes of relative content of histone H1 and of content of core histones have been shown.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ахметов Р. Р., Иванова Э. А. В кн.: Метаболизм и механизм действия фитогормонов. 223, Иркутск, 1979.
2. Паносян Г. А., Тирацунян С. Г., Вардеванян П. О., Вардапетян Р. Р. Докл. АН СССР, 265, 3, 765, 1982.
3. Тирацунян С. Г., Вардеванян А. О., Вардапетян Р. Р. Биолог. науки, 7, 28, М., 1984.
4. Тирацунян С. Г., Вардеванян П. О., Паносян Г. А. С.-х. биология, 2, 61, 1984.
5. Тирацунян С. Г., Паносян Г. А. Биолог. ж. Армении, 36, 4, 295, 1983.

6. Johnston F. B., Stern H. *Nature (Lond)*, 179, 145, 160, 1957.
7. Holt C., Brandt W. *Methods in Cell Biology*, 18, 514, 1978.
8. Lange B., Huang G. H. *Biochim. Biophys. Acta*, 521, 324, 1978.
9. Panyam S., Chalkley R. *Arch. Biochem and Biophys.*, 130, 337, 1969.
10. Simon J. H., Becker W. M. *Biochim et Biophys. Acta*, 474, 1, 154, 1951.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 12, 1985

УДК 547.952:612.8.015

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ КИСЛЫХ ВОДОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ МЕТОДОМ ПЕРЕКРЕСТНОГО ИММУНОЭЛЕКТРОФЕРЕЗА

А. А. КОСТЯНИН, Р. А. КАЗАРЯН, Э. С. ГЕВОРКЯН, К. Б. НАЗАРЯН

Использован метод перекрестного иммуноэлектрофореза для фракционирования кислых водорастворимых белков головного мозга крысы. Обнаружено 10 зон precipitation для нестойкой антисыворотки и 2 зоны после ее истощения. Получена возможность для их идентификации и количественного анализа.

Ключевые слова: перекрестный иммуноэлектрофорез, нейроспецифические белки.

Разделение и количественный анализ нативных белков головного мозга сопряжены со значительными трудностями ввиду их высокой гетерогенности и лабильности [5]. Например, широко распространенный метод электрофореза в ПААГ в неденатурирующих условиях позволяет различить лишь 10—12 белковых фракций со значительным фон и плохой воспроизводимостью, что сильно затрудняет количественные исследования и идентификацию. Более адекватными для решения подобных задач могут быть различные модификации иммуноэлектрического метода, в котором сочетаются мягкие условия проведения эксперимента с высокой воспроизводимостью и широкими возможностями идентификации полученных фракций.

Настоящая работа посвящена разработке высокочувствительного метода количественного анализа кислых белков головного мозга, большинство которых являются нейроспецифическими белками [4, 11], с целью дальнейшего изучения количественных сдвигов их пула при различных физиологических состояниях и патологических проявлениях нервной системы. Кроме того, существует большая вероятность обнаружения новых нейроспецифических белков, поскольку величина транскрибируемых участков генома нервной системы более чем в 2 раза превосходит таковую других тканей [1].

Материал и методика. Ткани головного мозга беспородных белых крыс гомогенизировали в 0,01 М трис-фосфатном буфере, pH 7,5 (буфер А), и центрифугировали 30 мин при 105 000 g. Надосадочную жидкость стужали до концентрации белка 50 мг/мл и подавали на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (ДФ-32, «Whatman», Англия), которую промывали буфером А до снижения оптической плотности элюата ниже 0,01 О. Е. при 280 нм. Затем элюировали связавшиеся кислые белки тремя объемами 1 М NaCl, приготовленного на буфере А. К полученному белковому пулу добавляли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 80%-ного насыщения, центрифугировали 30 мин при 15 000 g и белко-