

динамического равновесия белков в составе структуры или изменения их сродства к структуре при энзиматических модификациях белков и их ближайшего молекулярного окружения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киравинов А. А., Афанасьев Б. Н. Мол. биол., 17, 213—283, 1983.
2. Bradford M. E. Anal. Biochem., 72, 248—254, 1976.
3. Carter D. J. Chi—Bom Chae Biochemistry, 15, 1, 180—185, 1976.
4. Igo—Kemines T., Herz W., Zachau H. G. Ann. Rev. Biochem., 51, 89—121, 1982.
5. Laemmli U. K. Nature, 227, 680—685, 1970.
6. Oohara I., Wada A. J. Mol. Biol., 196, 399—411, 1987.
7. Paller K. B., Alberts H. M. J. Biol. Chem., 254, 21, 11160—11169, 1979.
8. Samul B., Berkhor I. Arch. Biochem. Biophys., 179, 527—544, 1977.
9. Tsanev K., Russev G. Eur. J. Biochem., 43, 257—263, 1974.

Поступило 29.VI 1989 г.

Биолог. журн. Армении, № 8 (43), 1990

УДК 547.963.3

ДВУХКООРДИНАТНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ БЕЛКОВ ХРОМАТИНА. ЭКСТРАКЦИЯ В СИСТЕМАХ pH—NaCl, pH—МОЧЕВИНА, ТРЕХКООРДИНАТНЫЕ ДИАГРАММЫ

И. А. САРВАЗЯН, А. Ш. АБРАМЯН, К. А. ШАГИНИЯН,
Т. Н. АКОПЯН, А. А. АРУТЮНЯН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, г. Ереван
*Институт ботаники АН АрмССР, Ереван

Рассматривается новый методический подход к изучению структурных белков. Показано, что одновременное воздействие физико-химически различных экстрагирующих агентов на нативную макромолекулярную структуру позволяет получить количественную и графически описываемую информацию, характеризующую статус отдельных белков в составе хроматина.

Այս հոդվածում շարունակվում է կառուցվածքային սպիտակուցների նեոազոտան նոր մեթոդական մոտեցման բննարկումը: Ցույց է տրվում, որ նախիվ մակրոմոլեկուլար ստրուկտուրայի վրա ֆիզիկոքիմիոսին տարբերությամբ լուծառոտող գործակները միաժամանակյա ուղղեցումներ թույլ է տալիս բրոմատների կազմում առանձին սպիտակուցների ստատուսը բնորոշող բանակության և գրաֆիկերեն նկարագրող ինֆորմացիա ստանալ:

In this report the discussion of a new methodological approach of structural protein investigation is continued. It is shown that the common action of physico-chemically different extractive agents on the native macromolecular structure permits to obtain a quantitative and graphically demonstrative information which is characteristic for the given protein status quantitation in the chromatin structure.

Белки хроматина—двухкоординатная экстракция—линия колувыхода.

В предыдущем сообщении [6] были описаны идея и пример практической реализации нового методического подхода к изучению структурных белков. На примере белков хроматина эритроцитов кур было продемонстрировано, что динамически равновесное состояние белка в составе материнской структуры может быть охарактеризовано с помощью поддающихся количественной оценке параметров.

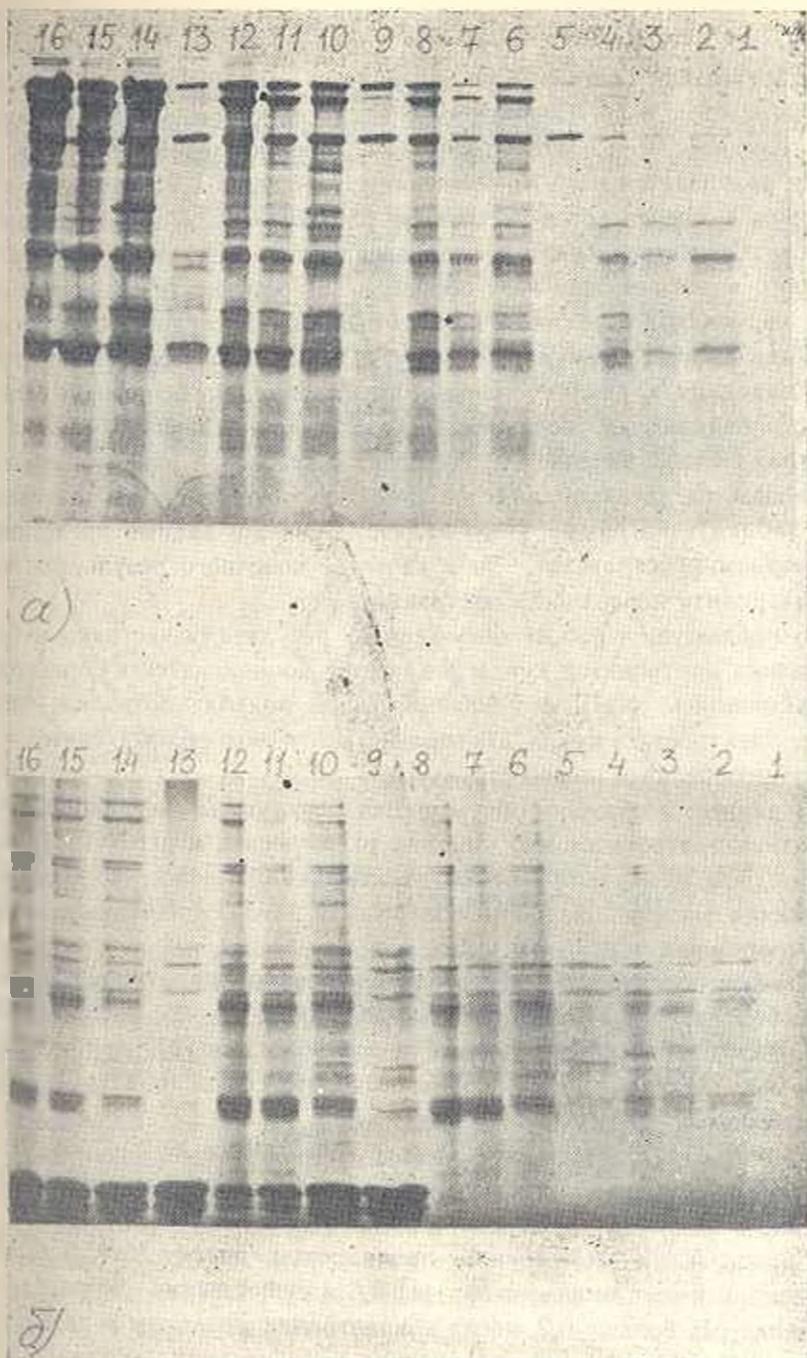


Рис. 2. ДДС-электрофорез белков хроматина эритроцитов кур в 10%-ном ПААГ. Каждый трек представляет собой супернатант после инкубирования хроматина в соответствующем растворе из сетки экстракции. Номер трека соответствует номеру точки экстракции. а) Электрофореграмма для сетки экстракции pH-мочевина. б) Электрофореграмма для сетки экстракции pH NaCl.

i, n —конкретные значения концентраций a и b соответственно. Точка с номером $X=i+N(j-1)$, имеющая координаты a_i и b_j , в эксперименте реализуется как раствор X со значениями концентраций экстрагирующихся агентов a_i и b_j . Совокупность таких растворов удобно объединить под термином «сетки экстракции». Объект исследования после выделения разбивается на $N \times n$ идентичных образцов и каждый образец с номером X подвергается экстракции раствором X , а затем центрифугируется. Существенно, что все эти операции производятся одновременно и строго идентично для всех образцов. В результате мы имеем набор $N \times n$ надосадков и осадков, полученный как бы наложением сетки экстракции на исследуемую структуру. После электрофоретического анализа надосадков, сканирования, идентификации основных белковых полос определяются величины выхода Λ для каждого белка во всех спектрах. Если значение выхода белка и раствор X расположить в месте точки X на двухкоординатной таблице, то мы получаем так называемую таблицу-диаграмму этого белка. Если же данные представить в трехмерном пространстве, то в качестве конечного результата можно рассматривать поверхности экстракции.

В предыдущей работе обсуждались результаты экстракции белков хроматина эритроцитов кур, и в качестве координат сетки экстракции использовались NaCl и мочевины. Такой подход позволял оценить вклад электростатических взаимодействий и водородных связей в стабилизацию белка в общей структуре.

В данном сообщении обсуждаются результаты экстракции белков хроматина эритроцитов кур в сетках pH -мочевина и pH - NaCl (рис. 1 а, б). Вопросы нумерации белков, идентификации полос, построения поверхностей экстракции, линий полувыхода рассматривались в предыдущем сообщении.

Анализ поверхностей экстракции и двухкоординатных таблиц-диаграмм белков №№ 1—21 (белковые полосы № 22—26, представляющие собой гистоны в данных условиях не наблюдаются [9]) при экстракции хроматина в системе pH -мочевина позволяет сгруппировать их следующим образом:

Группа I. Представители этой группы—белки № 7 и № 8. Их экстракция не зависит от pH среды и определяется концентрацией мочевины (рис. 3 а).

Группа II. К этой группе принадлежат белки № 4, 5, 6, 10, 11. Экстракция имеет минимум при pH 5,0 и существенно возрастает при значениях pH больше 6,3, когда концентрация мочевины в растворе достигает 4 М. При меньших значениях концентрации мочевины выход белка незначителен и практически не зависит от pH (рис. 3 б).

Группа III. В эту группу входят белки № 1, 2, 3, 9. При 1 М мочевины существует сильная зависимость выхода белков от pH , но при увеличении концентрации мочевины pH среды перестает влиять на этот процесс (рис. 3 в).

Группа IV. Выход белков этой группы (№ 11 а, 12, 15, 16, 18, 19) плавно возрастает при увеличении концентрации мочевины в растворе и имеет выраженный максимум при pH 6,3 (рис. 3 г).

Группа V. К этой группе принадлежат белки № 13, 13б, 17, 20, 21. Для них характерна сильная рН-зависимость: в точке рН 5,0 экстракция полностью отсутствует, в точках с рН 6,3 и рН 9,0 наблюдается резкое возрастание выхода белка (рис. 3д).

Для полосы № 14 при увеличении значения рН среды выход белка в раствор плавно увеличивается и достигает максимума при рН 9,0 (рис. 3е).

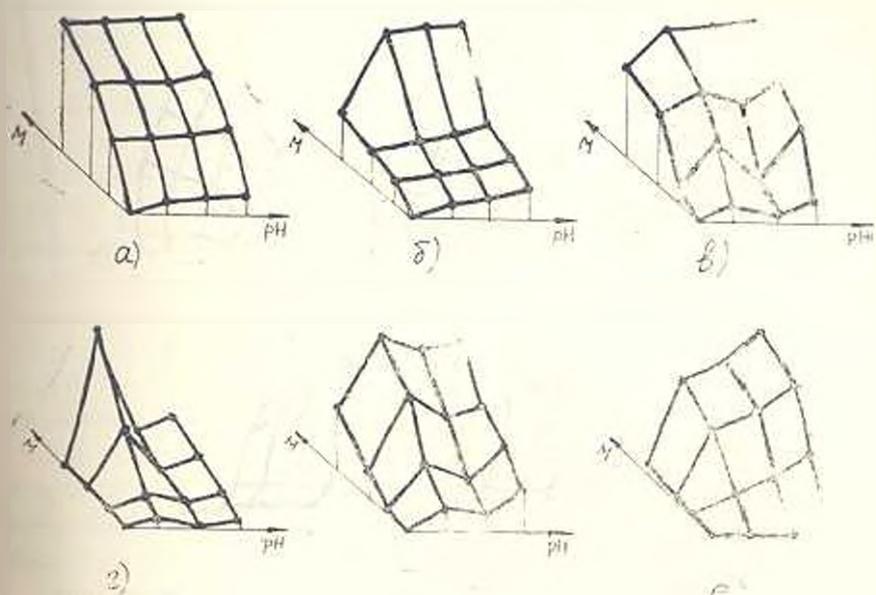


Рис. 3. а—е. Поверхности экстракции, характерные для белков групп I—V в сетке экстракции рН-мочевина (см. текст).

Несколько иная картина получается при рассмотрении поверхностей экстракции и таблиц-диаграмм белков хроматина эритроцитов кур, когда в качестве координат сетки экстракции используются рН и NaCl (рис. 1 в). В этом случае разбиение белков на группы имеет следующий вид:

Группа I. В эту группу входят белки № 12, 13, 14, 18. рН-зависимость экстракции этих белков, имеющая максимум при рН 6,3, сглаживается при увеличении концентрации соли. При значениях ионной силы среды более 0,35 M выход белка не зависит от рН (рис. 4 а).

Группа II. Экстракция белков этой группы (№ 1, 2, 3, 7, 8, 11 а, 15, 17) имеет выраженную рН-зависимость. Форма поверхности экстракции, типичная для белков этой группы, очень похожа на форму поверхности экстракции белков группы V в сетке экстракции рН-мочевина (сравни. рис. 4 б и 3 д).

Группа III. Представители этой группы—белки № 5, 16, 20, 21. Их выход сильно зависит от концентрации NaCl, рН-зависимость плавная: минимум при рН 5,0, максимум при рН 9,0. Форма поверхности экстракции белков этой группы сходна с формой поверхности белка № 14 в сетке экстракции рН-мочевина (сравни. рис. 4 в и 3 е).

Группа IV. К этой группе принадлежат белки № 9, 11. Форма поверхности экстракции этих белков имеет необычный вид: в растворе с значением концентрации соли 0,35 М и рН 6,3 наблюдается максимум выхода белка (рис. 4 г).

Группа V. Сюда входят гистоновые белки; полосы № 22 и 23—гистоны H1 и H5. Их выход максимален при кислых рН, причем рН-зависимость круче при значении NaCl 0,35 М. Когда концентрация соли в растворе достигает 0,5 М, разница между выходом белка при рН 5,0 и рН 9,0 уменьшается в два раза (рис. 4 д).

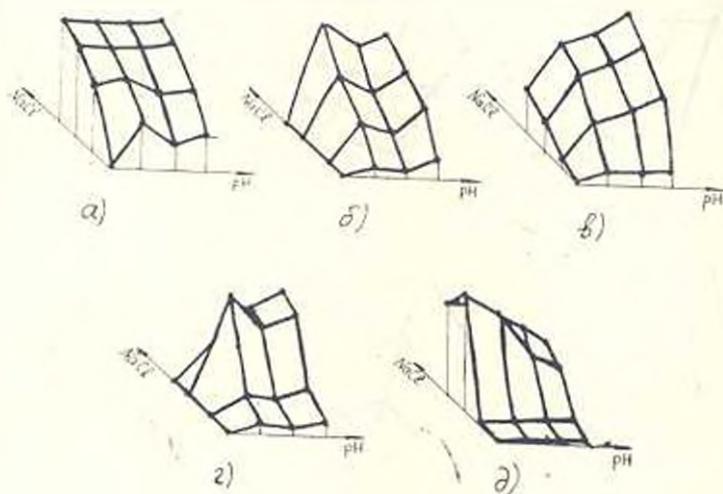


Рис. 4 а—д. Поверхности экстракции, характерные для белков групп I—V и сетке экстракции рН-NaCl.

Следует отметить, что используемые в данной работе в качестве осей экстракции реагенты неоднотипны по своему физико-химическому воздействию на структуру белка. В первом приближении можно считать, что увеличение количества мочевины в растворе однонаправленно действует на структуры белка высшего порядка, и по мере возрастания концентрации мочевины проводимый процесс, а именно разворачивание всех структур белка и ослабление водородных связей, все более и более усугубляется. В случае изменения рН среды процесс не однонаправлен, благодаря перераспределению поверхностного заряда происходят переходы из некоего состояния I в состояние II, с возможными промежуточными стадиями. При воздействии соли процесс как бы двухступенчатый: первоначальная однонаправленность, достигаемая за счет экранирования ионогенных групп, при высоких концентрациях соли может быть приостановлена и даже повернута в обратную сторону благодаря высаливающему эффекту.

Конкретный выбор осей, а именно мочевины, рН, NaCl, не единственный, в качестве осей экстракции могут быть рассмотрены другие агенты (например, ионы Mg^{2+} , избирательно влияющие на целостную структуру хроматина [2, 8]). Замена осей может усилить, сделать более выраженной специфичность таблицы-диаграммы того или иного белка, что будет иметь важное значение при специальных исследованиях, касающихся конкретного белка.

В принципе, предложенный подход открывает возможности для

дальнейшего углубления и схематизации. Так, например, можно рассматривать n -компонентную экстракцию, включающую в качестве координат все агенты, как-либо влияющие на экстракцию белка из данной макромолекулярной структуры. В таком случае рассматриваемыми параметрами будут $n+1$ -мерные поверхности, n -мерные константы диссоциации и т. д. Принципиальные трудности для реализации «многокоординатной экстракции» отсутствуют, однако в связи с методическими, а также графическими ограничениями рассмотрение трех- и более компонентных экстракций затруднено.

В данной работе мы прибегли к несколько иному способу углубленного описания поведения белка при его экстракции, а именно экстракция проводится в трех разных двухкомпонентных системах — $\text{pH}-\text{NaCl}$, $\text{pH}-\text{мочевина}$, $\text{NaCl}-\text{мочевина}$. Чтобы представить совокупность результатов экстракции белка в трех разных сетках экстракции приходится поставлять частью полезной информации, которую можно выявить при анализе поверхностей экстракции и ограничиться рассмотрением линий полувыхода [6]. В этом случае в первом приближении можно считать, что линии полувыхода на плоскостях $\text{pH}-\text{NaCl}$, $\text{pH}-\text{мочевина}$, $\text{NaCl}-\text{мочевина}$ являются как бы сечениями трехмерной константы диссоциации, представляющей собой некую поверхность.

Как видно из приведенных выше данных (рис. 3 и 4), двухкоординатные таблицы-диаграммы позволили сгруппировать белки по типу экстракции. Однако при анализе объединенных «трехкоординатных» диаграмм (рис. 5) типовые разграничения белков уже практически не-

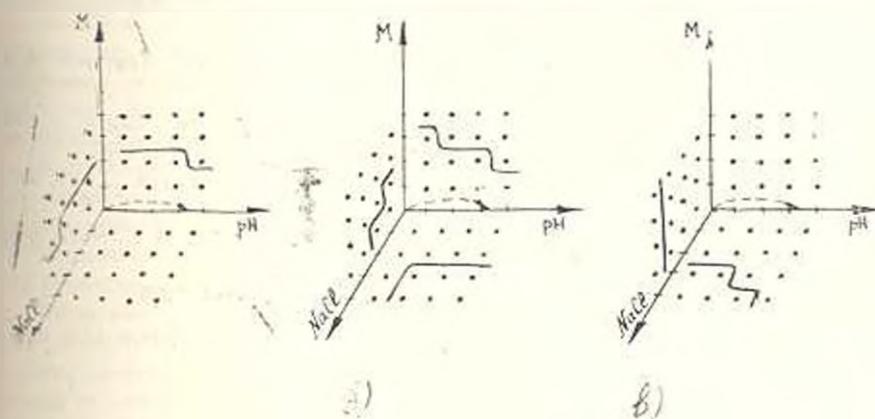


Рис. 5 а, б, в). Объединенные «трехкоординатные» диаграммы на примере белков № 1, № 20, № 22 соответственно. Каждая плоскость—таблица-диаграмма с обозначенной линией полувыхода. Пунктирной стрелкой показано, что плоскость $\text{NaCl}-\text{мочевина}$ должна быть смещена по оси pH , так как экстракция в системе $\text{NaCl}-\text{мочевина}$ осуществлялась при значении pH 8,0.

возможны, и экстракция каждого белка отражается в индивидуальной специфической «трехмерной» диаграмме с характерными линиями полувыхода. Этот результат подтверждает имеющиеся в литературе данные о разнородности и специфичности негистоновых белков [4, 7, 10] и условности принятой в настоящее время классификации [3, 4]. По-

этому в отношении белков хроматина помимо поиска путей классификации может быть информативным подход так называемой паспортизации белков на основе совокупности диаграмм с обозначенными линиями полувыхода. Изменения формы этих кривых могут быть обнаружены с помощью описанного нами подхода при сравнительных исследованиях или в эксперименте с ожиданием молекулярных сдвигов в хроматине. Нам представляется, что описываемая с помощью таблиц-диаграмм, поверхностей экстракции и линий полувыхода некая суммарная физико-химическая характеристика является ценной и поддьющейся математизации информацией и может быть использована наряду с такими важными и широко используемыми параметрами белков, как их аминокислотный состав, первичная структура, рI и другие. И хотя описанный метод уступает другим физико-химическим подходам к изучению хроматина как целостной структуры, он весьма информативен в выявлении локальных сдвигов статуса белка в составе макромолекулярной структуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян А. А., Абрамян А. Ш., Калачян А. С., Мнацаканян Г. А., Сарвазян Н. А., Акопян Т. Н. Тез докл. XXIV Междунар. биохим. конгр., Прага, 1988.
2. Бавыкин С. Г. Мол. биол. (Итоги науки и техники ВИНИТИ АН СССР), 26, 3—121, М., 1988.
3. Кадура С. Н. Сб.: Структура и генет. значение белков хроматина эукариот. 11—51, Киев, 1985.
4. Каранинов А. А., Афанасьев Б. Н. Мол. биол., 17, 213—233, 1983.
5. Мнацаканян Г. А., Калачян А. С., Шагинян К. А., Акопян Т. Н., Арутюнян А. А. Биолог. ж. Армении, 42, 6, 1989.
6. Сарвазян Н. А., Абрамян А. Ш., Шагинян К. А., Акопян Т. Н., Арутюнян А. А. Биолог. ж. Армении, 43, 8, 1990.
7. Cartwright I. J., Abmayr S. M., Fleischmann G., Lowenhaupt K., Elgin S. C. R., Keene M. A., Howard G. C. CRC Crit. Rev. Biochem., 13, 1—86, 1982.
8. Koch M. H. J., Vega M. C., Sayers Z., Michon A. M. Eur. Biophys. J., 14, 307—319, 1987.
9. Olins P. E., Bryan P. N., Karrington R. E., Hill W. E., Olins A. L. Nucl. Acids Res., 4, 1911—1931.
10. Peterson J. L., McConkey E. H. J. Biol. Chem., 251, 548—551, 1976.

Поступило 11.X 1989 г.

Биолог. журн. Армении, № 8 (43) 1990

УДК 663:1.577.112.388.2

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ФЕНОТАКСОНОМИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ПРИМЕРЕ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА I-ВАЛИНА

Л. С. КАЗАРЯН, К. Г. ВАРДАНИЯН, В. Е. АКСЕНОВСКАЯ, Б. П. КАРАБЕКОВ

Научно-исследовательский технологический институт аминокислот, Ереван

Предлагается математическая модель описания параметров культивирования штамма-продуцента I-валина—изолейцинзависимого мутанта культуры *Brevibacterium flavum*. Данная модель может быть базовой для таксономических исследований штаммов-продуцентов I-валина, являющихся мутантами *B. flavum*, так и других культур