

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ И ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ГИСТОНОВ ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA GUILLIERMONDII*

Л.А. НАВАСАРДЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, 375049

The isolation of chromatin and histone proteins from cells *Candida guilliermondii* NP-4 is carried out. The investigation of fluorescent parameters of histones has shown that the excitation wavelength for them is 275 nm, and the fluorescence wavelength- 305 nm. The electrophoretic researches have shown that in case of animals, yeast histones have 5 molecular forms, the difference consists only in rather smaller content of histone H1.

Флюоресценция - электрофорез - гистоны - дрожжи

Нами разработан метод выделения ядер из клеток дрожжей *Candida guilliermondii* НП-4 путем химической и ферментативной обработки клеточной стенки.

Материал и методика. Дрожжи *C. guilliermondii* НП-4 выращивали по методике [1], обрабатывали в среде, содержащей трис, EDTA, β -меркаптоэтанол (pH=8,0; 32°). Во время ферментативной обработки использовали цитогеликазу в среде с цистеином, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4 (pH=7,8; 30°). Ядерную фракцию выделяли из дрожжей, находящихся в стационарной фазе роста. Из выделенных ядер градиентным центрифугированием (при 100000 g) получали хроматин и изучали некоторые его физико-химические параметры.

Получив хроматиновую фракцию, затем выделяли гистоновые белки путем кислотной экстракции по методу Боннера [3]. К надосадоку, содержащему гистоновые белки, добавляли ацетон по объемному соотношению 1:5 и оставляли при температуре -10° в течение 24 ч. Затем путем центрифугирования получали гистоновые белки в осадке.

Результаты и обсуждение. После получения и очистки гистоновых белков на флюоресцентном спектрофотометре "Hitachi MPF-2A" были исследованы их флюоресцентные параметры как для дрожжевых гистонов, так и параллельно для гистонов, выделенных из печени крыс. Было выявлено, что гистоны, выделенные из животных объектов, как и дрожжевые гистоны имеют пик спектра возбуждения при длине волны 275 нм. Фракция гистоновых белков имеет пик спектра флюоресценции при длине волны 305 нм (рис.1). Как видно из рисунка, гистоновые белки, выделенные из печени крыс и из дрожжей, имеют одинаковые флюоресцентные параметры, разница в этом случае состоит только в значении относительной интенсивности флюоресценции.

На следующем этапе работы было осуществлено электрофоретическое исследование белков по методу Панима и Чалкли [4]. В этом случае параллельно с дрожжевыми гистонами были исследованы гистоны,

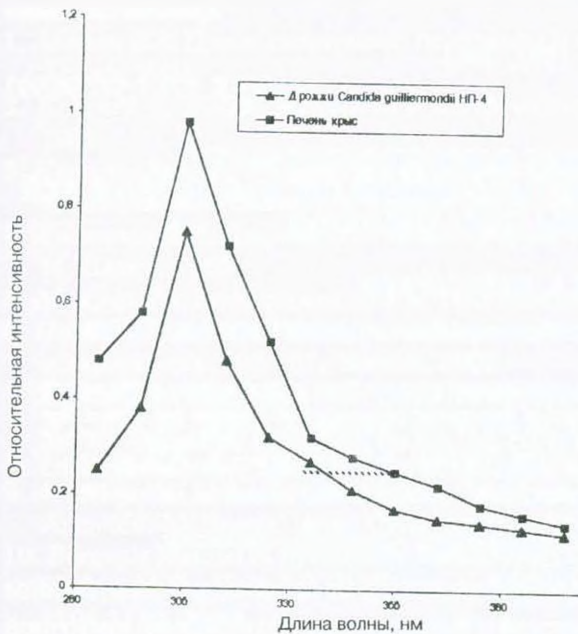


Рис. 1. Флюоресцентный спектр гистонов, выделенных из: 1- дрожжей *Candida guilliermondii* НП-4, 2- печени крыс.



Рис. 2. Электрофореграмма гистонов, выделенных из хроматина: А- дрожжей *Candida guilliermondii* НП-4. В- печени крыс, 1 - Н1, 2 - Н3, 3 - Н2В, 4 - Н2А, 5 - Н4.

выделенные из печени крыс. Полученные гистоновые фракции переносили в среду 0.9н уксусной кислоты, содержащей 15%-ную сахарозу. Затем на каждую трубочку с гелем наслаивали соответствующий объем пробы (0.1-0.2мл), содержащий 40-100мкг белка и создавали напряженность электрического поля (от "+" к "-"). Сила тока в каждой трубочке составляла 2-2.2мА, длительность электрофореза - 2.5-3 ч. Полученные электрофореграммы представлены на рис.2. Известно, что наибольшей подвижностью обладает гистон Н4, затем следуют Н2А, Н2В и Н3, от них заметно отстает относительно более крупный гистон Н1 [4]. Нами показано, что в результате электрофореза гистоновых белков дрожжей *C. guilliermondii* НП-4 получают выраженные 4 белковых кольца, замечается также белковая фракция с относительно меньшей электрофоретической подвижностью, которая достаточно слабо выражена

в виде кольца.

Винтерсбергер и сотрудники [6] при исследовании дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* показали, что в гистоновом комплексе отсутствует гистон Н1. В дальнейшем исследованиями Саммера [5] было показано, что наряду с

гистоновыми кольцами H2A, H2B, H3 и H4 присутствует также дополнительное белковое кольцо, которое может являться предшественником гистона H1.

Таким образом, результаты наших исследований показали, что гистоновые белки дрожжевого хроматина по электрофоретической подвижности разделяются на 5 подфракций, т.е., так же, как и у животных организмов, существуют 5 молекулярных форм гистоновых белков (полный набор гистонов).

ЛИТЕРАТУРА

1. Навасардян Л.А., Авакян А.С., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении, 33, 6, 633с., 1980.
2. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот, М., с. 55, 1981.
3. Bonner J., Chalkley G., Dhamus M., "Methods in Enzymology", 126.
4. Panyim S., Chalkley R. Arch. Biochem. and Biophys., 130, 337-346, 1969.
5. Sommer A. "Mol. and Gen. Genet.", 161, 3, 323-331, 1978.
6. Wintersberger U., Smith Ph., Letnansky K. Eur j. Biochem. 33, 123-130, 1973.

Поступила 04.XII.2002