

Биол. журн. Армении, 3-4 (57), 2005

УДК 577.1:575.24

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛОБУЛИНОВ В СЕМЕНАХ ФАСОЛИ ПРИ ХИМИЧЕСКОМ МУТАГЕНЕЗЕ

Дж.А. ВАРДАНЯН, К.А. ВАРДАНЯН, М.А. ДАВТЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, 375049

The sum total of saltsoluble proteins of initial and mutant seeds of Armenian red haricot has been studied. With the help of heliltration and ionic exchange chromatography methods have been found aut essential qualitative and guantitative changes in the globulins of mutant seeds: the content of vicilin-like proteins has increased.

Семена фасоли - глобулин - химический мутагенез

По количественному содержанию глобулины являются основными запасными азотсодержащими веществами семян бобовых.

Глобулины, выделенные из семян трибы виковых, получили название вицилин и леугмин. В семенах других триб семейства бобовых обнаружены близкие, но не идентичные им белки, которые принято называть вицилино- и леугминоподобными глобулинами [1, 7, 10].

Запасные белки семян бобовых легулин и вицилин представляют собой иммунологически различные белки глобулиновой природы с высокой молекулярной массой. Кроме двух основных глобулинов, в семенах бобовых присутствуют и второстепенные глобулиновые компоненты [6].

Предыдущие наши исследования показали, что у хозяйственно ценных мутантов семян фасоли наблюдаются значительные отклонения в азотном обмене, что сопровождается изменением содержания белка и аминокислот [2, 3].

Целью наших исследований явилось изучение влияния химических мутагенов на возможные качественные и количественные сдвиги в составе суммарных глобулинов. Выделение однородных белков важно для изучения не только их физико-химических свойств и аминокислотного состава, но и их биологической роли в растении.

Материал и методика. Объектом исследования служили семена исходной формы и мутанта 26 фасоли сорта Армянская красная, полученного в результате обработки семян этиленимином (ЭИ).

Семена фасоли измельчали в тонкую муку, которую обезжиривали петролейным эфиром при комнатной температуре. Для получения суммарного содерастворимого экстракта

навеску муки заливали десятикратным объемом 1 М NaCl, pH 7.0 и оставляли при постоянном помешивании при 4-5° на сутки.

Остаток отделяли от экстрактов центрифугированием при 8000 об/мин в центрифуге с охлаждением, снова заливали растворителем и после трехчетырехчасового настаивания экстракт отделяли центрифугированием. Экстракты белков объединяли и доводили до соответствующего объема. При такой обработке было извлечено 95-97% белков семян фасоли.

Результаты и обсуждение. Исследования белков семян фасоли различными методами подтвердили, что глобулины представлены двумя основными - вицилино- и легуминоподобными белками.

Для исследования этих белков исходных семян фасоли и мутанта сначала получили суммарный солевой экстракт, после чего высаливанием постепенно возрастающими концентрациями сернокислго аммония выделили соответственно 0-30, 30-60 и 60-100 фракции.

Полученные белковые фракции исследовали методами гельфильтрации на сефадексе G-100 и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ целлюлозе.

Сначала выделенные три солерастворимые белковые фракции семян фасоли (мутанта и исходной формы) пропускали через колонку с сефадексом G-100, который предварительно был уравновешен 0.02М трис-ацетатным буфером, pH 8.0. Элюцию проводили тем же буфером. Количество белка определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 280 нм.

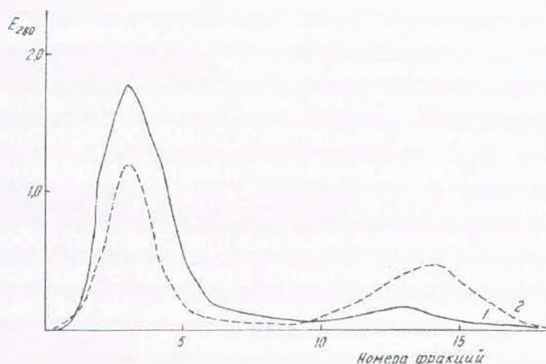


Рис. 1. Гельфильтрация фракции 0-30 солерастворимых белков семян фасоли на сефадексе G-100.
1- исходная форма, 2 - мутант 26.

Фракция 0-30 (рис. 1) в обоих случаях (мутантная и исходная формы) дает 2 белковых пика. Уровень высокомолекулярных белков (I пик) исходной формы заметно выше такового мутантной, а уровень низкомолекулярных белков мутантной формы в 2.5 раза превышает таковой исходной (по данным СФ).

Согласно литературным данным, при низкой концентрации сульфата аммония (0-30) осаждаются минорные компоненты солерастворимых

белков фасоли [8, 9].

Легуминоподобные белки семян фасоли (фракции 30-60) также разделились на два пика (рис. 2). Сравнительная картина количественного содержания белковых пиков мутантной и исходной форм почти сходна с таковой первой фракции (0-30), а именно уровень высокомолекулярных белков заметно выше у исходной, а низкомолекулярных - в 2 раза выше у мутантной формы.

Третья фракция солерастворимых белков фасоли (60-100), которая содержит в основном вицилиноподобные белки, при гельфильтрации разделилась также на 2 белковых пика (рис. 3).

Однако в отличие от предыдущих фракций, в данном случае оба белковых пика мутантной формы количественно превышают таковые исходной, причем II пик - в 17 раз.

Поскольку особенно заметные изменения были обнаружены в третьей (60-100) фракции в дальнейшем изучали ее. Полученные при гельфильтрации 2 белковых пика были объединены и подвергнуты ионообменной хроматографии на ДЭАЭ целлюлозе, предварительно уравновешенной 0,02М трис-ацетатным буфером, pH 8.0. Элюцию осуществляли ступенчато растворами NaCl в буфере 0.1, 0.2, 0.25, 0.35, 0.45, 0.5, 0.6 и 0.7М.

Как видно из представленной кривой (рис. 4), смесь белковых пиков семян исходной формы фасоли разделилась на 4 фракции, элюируемые при различных концентрациях NaCl.

В случае мутанта (рис. 5) также были получены четыре белковые фракции, две из которых, однако, элюировались исходным буфером.

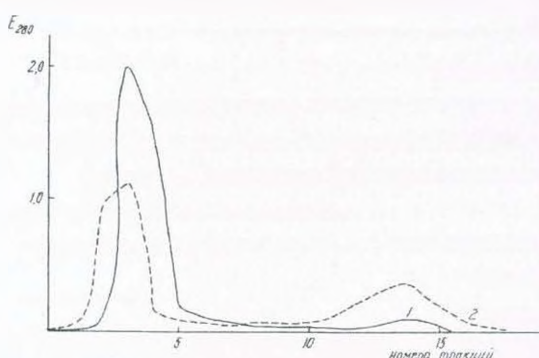


Рис. 2. Гельфильтрация фракции 30-60 солерастворимых белков семян фасоли на сефадексе G-100.
1 - исходная форма, 2 - мутант 26.

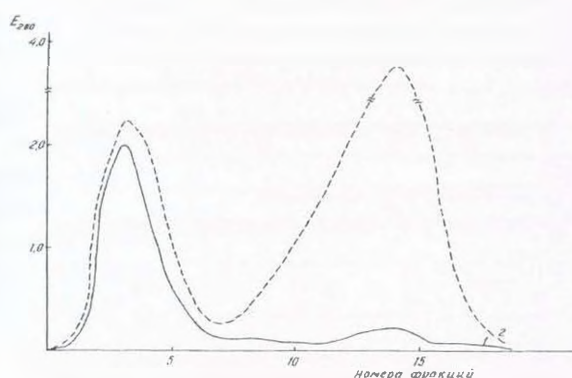


Рис. 3. Гельфильтрация фракции 60-100 солерастворимых белков семян фасоли на сефадексе G-100.
1 - исходная форма, 2 - мутант 26

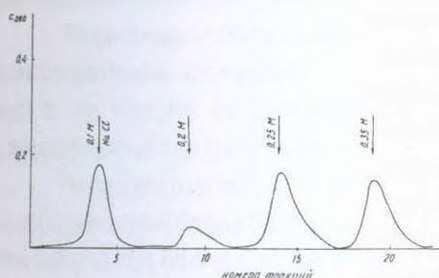


Рис. 4. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ целлюлозе суммы белковых пиков фракции 60-100 исходной формы семян фасоли.

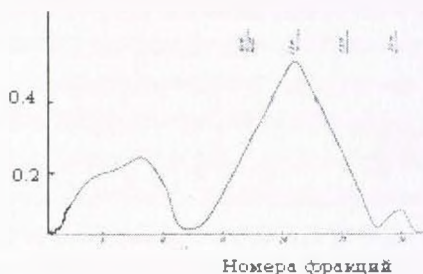


Рис. 5. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ целлюлозе суммы белковых пиков фракции 60-100 мутанта 26 семян фасоли.

Согласно данным спектрофотометрии, количество элюируемой 0.2 М NaCl белковой фракции мутанта в 17 раз превосходит уровень соответствующей фракции исходной формы.

Обобщение результатов данного и предыдущих опытов [4, 5], проведенных с семенами фасоли сорта Армянская красная, позволяет заключить, что, по сравнению с исходной формой фасоли, в белках семян мутанта, индуцированного этиленимином, произошли глубокие качественные, количественные изменения, что связано, по всей вероятности, с увеличением вицилиноподобных глобулинов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вайнтрауб И.А. Докт. дисс. Кишинев, 1970.
2. Вардадян К.А., Вардадян Дж.А. Биолог. ж. Армении, 35, 11, 930-932, 1982.
3. Вардадян Дж.А., Вардадян К.А. Ученые записки, 1, 121-123, 1987.
4. Вардадян Дж.А., Вардадян К.А., Давтян М.А. Биолог. ж. Армении, 55, 1-2, 179-180, 2003.
5. Вардадян Дж.А., Вардадян К.А., Давтян М.А. Ученые записки, 1, 88-91, 2005.
6. Гоник С.А., Гуринович О.И., Агаркова С.Н., Варлахов М.Д., Володин В.И. Химический мутагенез и иммунитет, М., Наука 174-181, 1980.
7. Клименко В.Г. Растительные белки и их биосинтез. М., Наука 97-116, 1975.
8. Саянова В.В. Труды по химии природы соединений, Кишинев 8, 14-25, 1969.
9. Шутлов А.Д., Вайнтрауб И.А. Биохимия 32, 1120, 1967.
10. Bailey C.J., Baulter D. Phytochemistry, 11, 59-62, 1972.

Поступила 05.IX.2005