

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР «БИОРЕСУРСЫ»
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
Отдел биохимии и биотехнологии растений

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ
АСПЕКТЫ БИОХИМИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ
РАСТЕНИЙ**

Сборник научных трудов
III Международной научной конференции
14–16 мая 2008 г., Минск

*К 50-летию Отдела биохимии
и биотехнологии растений*

Минск
«Издательский центр БГУ»
2008

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55
Т33

Научные рецензенты:

д-р биол. наук, проф., акад. НАН Беларуси *В. Н. Решетников*;
д-р биол. наук, проф. *В. М. Юрин*;
д-р биол. наук, проф. *В. Л. Калер*

Редакционная коллегия:

*В. Н. Решетников, О. П. Булко, И. И. Паромчик, Т. И. Фоменко,
Е. В. Спиридович, Т. В. Антипова*

Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений : сб. науч. тр. 3-й Междунар. науч. конф., 14–16 мая 2008 г., Минск : к 50-летию Отд. биохимии и биотехнологии растений / НАН Беларуси, Центр. ботан. сад [и др.] ; редкол. : В. Н. Решетников [и др.] . — Минск : Изд. центр БГУ, 2008. — 562 с.
ISBN 978-985-476-604-1.

В сборнике изложены результаты исследований по составу, свойствам, организации интерфазных клеточных ядер и пластид высших растений, путей регулярного воздействия на ядерный аппарат, включая реконструкцию генома с помощью трансгенеза. Представлены отдельные проблемы регуляции морфогенеза растительных клеток и микрклонального размножения некоторых культур, использования молекулярных маркеров в документировании ботанических коллекций. Рассмотрены биохимические основы практического использования растительных ресурсов.

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55

ISBN 978-985-476-604-1

© Центральный ботанический сад
НАН Беларуси, 2008

УДК 582.542: 581.19:576.315

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГИСТОНОВ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ВИДА У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА ЗЛАКОВЫХ

Чижик О.В.

ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси» Минск 220012, ул. Сурганова 2В, e-mail: alisa67@hotmail.ru

В результате проведенных исследований определена белковая (полипептидная) гетерогенность гистоновых белков семейства Graminae. Определен фракционный состав гистонов ядер проростков озимой ржи в различных системах электрофоретического разделения. Двумерным электрофорезом в ПААГ подтверждена гетерогенность гистонов в пределах семейства злаковых (рожь и секалотритикум) и показана видоспецифичность семейства злаковых по этому показателю, прежде всего, по числу подфракций гистона H1.

Аннотация. На основе электрофоретического анализа гистоновой фракции ядер ржи и секалотритикума показана возможность использования гистонов в качестве маркера вида у представителей семейства злаковых.

Введение. При идентификации видов, сортов, гибридов растений, в частности зерновых культур, особое значение отводится применению принципа белковых маркеров [1,2]. Использование белков как генетических маркеров в решении конкретных задач генетики и селекции обосновано с биохимических и генетических позиций в работах школ академиков В.Г.Конарева [3-5] и А.А.Созинова [6].

В эволюционном отношении коровые гистоны (четыре гистона, создающих нуклеосомное ядро) отличаются поразительным консерватизмом. Тесные контакты гистон-гистон и гистон-ДНК накладывают ограничения на их изменчивость. В то же время гистон H1, не являющийся коровым гистоном, меняет свою структуру сравнительно легко. Особенностью этого гистона является наличие субфракций, указывая на возможное функциональное значение этих субфракций в обеспечении структурной реорганизации отдельных участков хроматина. Высокий консерватизм гистонов и высокая лабильность структуры сочетается с их способностью к модификациям [7]. Гистоны подвергаются сильной и обратимой пост-трансляционной модификации, включающей ацетилирование, фосфорилирование, убиквитинирование и др., причем эти изменения затрагивают хвостовые области гистонов. Ацетилирование этих белков усиливает α -спиральный характер N-хвостовых доменов и может влиять на

на взаимодействие гистонов с другими белками хроматина, что в конечном счете ведет к изменению его структуры [8].

Так как гистон H1 принимает участие в формировании 30-нм фибриллы (т.е. степени компактизации хроматина), то изменения в строении функционально важных частей молекулы должны влиять на уровень экспрессии генома [9]. Изменение субфракционного состава гистона H1 может оказать мягкий эффект на проявление фенотипа организма или на уровень протекания других процессов. В таком случае таксономическое видообразование может быть связано с изменением субфракционного состава и свойств гистона H1. Главную роль во взаимодействии гистона H1 с ДНК, безусловно, играет протяженный C-терминальный домен. Именно с изменением его длины связаны основные преобразования гистона H1 в ходе эволюции. Если изменчивость гистона H1 носит нейтральный характер, то, в соответствии с нейтральной теорией, уровень изменчивости белка у представителей монофилетического таксона должен быть пропорциональным возрасту таксона, а не интенсивности видообразования в нем [10, 11]. С другой стороны, если изменение структуры гистона H1 сопровождается видообразованием, то уровень изменчивости этого гистона будет возрастать не только с увеличением возраста таксона, но и с увеличением его видового многообразия. Следовательно, гистоновые белки (в частности, гистон H1) можно использовать как тесты или маркеры вида.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования служили интерфазные клеточные ядра, выделенные из проростков злаковых (рожь сорта Верасень и секалотритикум S206) – 72 ч. прорастания. Секалотритикум – новый тип ржано-пшеничных амфидиплоидов с цитоплазмой ржи – был любезно предоставлен И.А. Гордеем (Институт генетики и цитологии НАН Беларуси) [12]. Выделение и фракционирование интерфазных клеточных ядер проводили по [13]. Чистоту полученных ядер контролировали в окрашенных препаратах с помощью светового микроскопа и затем использовали для дальнейших анализов.

Гистоны из клеточных ядер экстрагировали 0,2М H₂SO₄, осаждали шестью объемами ацетона при –20° С. Осадок собирали центрифугированием, дважды промывали холодным ацетоном и высушивали в вакууме. Полученные препараты использовали для электрофореза. Для выделения гистона H1 использовали методику [12] с некоторой модификацией. Навеску проростков (1г) гомогенизировали в 20 мл буфера, содержащего 0,15М NaCl, 2М мочевины и 0,01 мМ ингибитор протеаз (фенилметилсульфонилфторид – PMSF). Полученный гомогенат центрифугировали 5 мин при 2000 g и t = –4°С. Осадок ресуспендировали в 2 мл 5%-ной хлорной кислоты (HClO₄) и центрифугировали. К супернатанту добавляли 6

объемов ацетона, содержащего 0,5M H₂SO₄. Смесь выдерживали при t = -5°C в течение нескольких часов. Выпавший белок осаждали центрифугированием и промывали чистым ацетоном. Осадок растворяли в буфере для SDS- и кислого (уксусная кислота/мочевина) электрофореза.

Разделение гистонов проводили в системе уксусная кислота/мочевина (ПААГ 15%) и щелочной электрофоретической системе с додецилсульфатом натрия (SDS) по методу U.K.Laemmli [15]. Для линейного электрофореза использовали 5%-ный концентрирующий и 14%-ный разделяющий полиакриламидный гель (ПААГ); Для градиентного электрофореза применяли 8–24%-ный разделяющий ПААГ.

Двумерное разделение смеси этих белков представляет собой сочетание кислой и щелочной систем электрофоретического фракционирования [16]. Разделение гистонов в первом направлении проводили в кислой системе (16%-ный разделяющий и 5%-ный концентрирующий ПААГ). Гель после первого электрофореза в течение 1 ч выдерживали в буфере для растворения белков (6,25 mM Трис-HCl pH 6,8; 2% SDS; 5% 2-меркаптоэтанола). Во втором направлении белки разделяли в щелочной электрофоретической системе (14%-ный разделяющий и 6%-ный концентрирующий гели). После электрофореза гель фиксировали в 15%-ной ТХУ, окрашивали 0,1%-ным Кумасси R-250, отмывали и фотографировали. Цифровое изображение обрабатывали с использованием компьютерной программы “Sigma Gel”, представленной фирмой Amersham-Biotech.

Результаты и обсуждение. Выделенные гистоны из интерфазных клеточных ядер 72-часовых проростков секалотритикум и ржи «Верасень» подвергали электрофоретическому разделению (SDS- и кислая система) для последующего сравнительного анализа полученных фракций. Было показано, что электрофоретические субфракции гистона H1 из проростков ржи (исходная форма) и образца секалотритикум S206 в SDS-системе, позволяющей разделять полипептиды по молекулярным массам, располагались приблизительно в одном диапазоне молекулярных масс.

Электрофорез гистона H1 в кислой системе, где разделение полипептидов происходит не только в соответствии с молекулярными массами полипептидных цепей, но и по их электрическому заряду, показал у сравниваемых образцов наличие разного количества субфракций: 5 – у ржи и 4 – у секалотритикум S206 (рис 1). С целью более детального изучения субфракционного состава гистона H1 проводили его разделение методом двумерного электрофореза (рис. 2). В результате проведенных экспериментов выявлено, что 5 фракций гистона H1, полученных при разделении гистонов ржи «Верасень» в системе уксусная кислота/мочевина, при последующей разгонке во втором направлении (SDS-ЭФ), разделелись на ряд подзон (рис. 2а). Так, при двумерном разделении гистона H1 ржи

«Верасень» на электрофореграмме наблюдалось 9 подзон (включая гистон-подобные HMG-белки), в то время как гистон H1 секалотритикум S206 показал наличие 12 субфракций (рис. 2б). Эта значительная разница в гетерогенности подтверждает вариабельность гистона H1 и возможное его использование в качестве тест-маркера исследуемого вида.

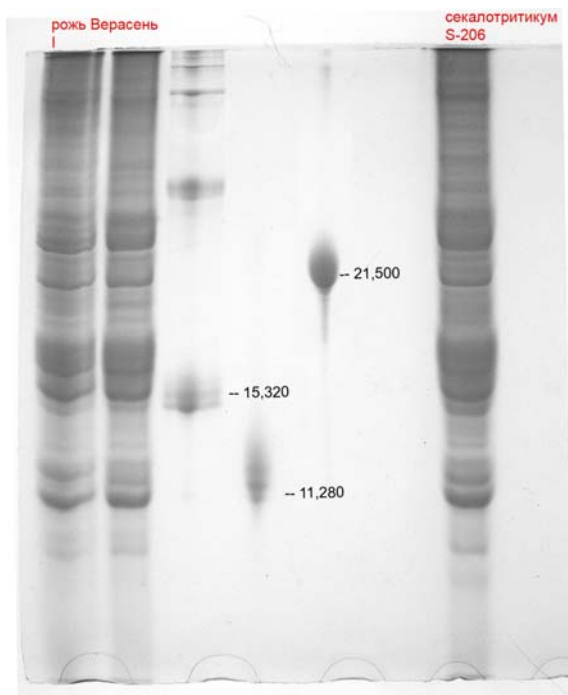


Рис. 1. Электрофоретическое разделение гистонов ржи «Верасень»(а) и секалотритикум S206 (б) в системе уксусная кислота/мочевина (ПААГ 15%)

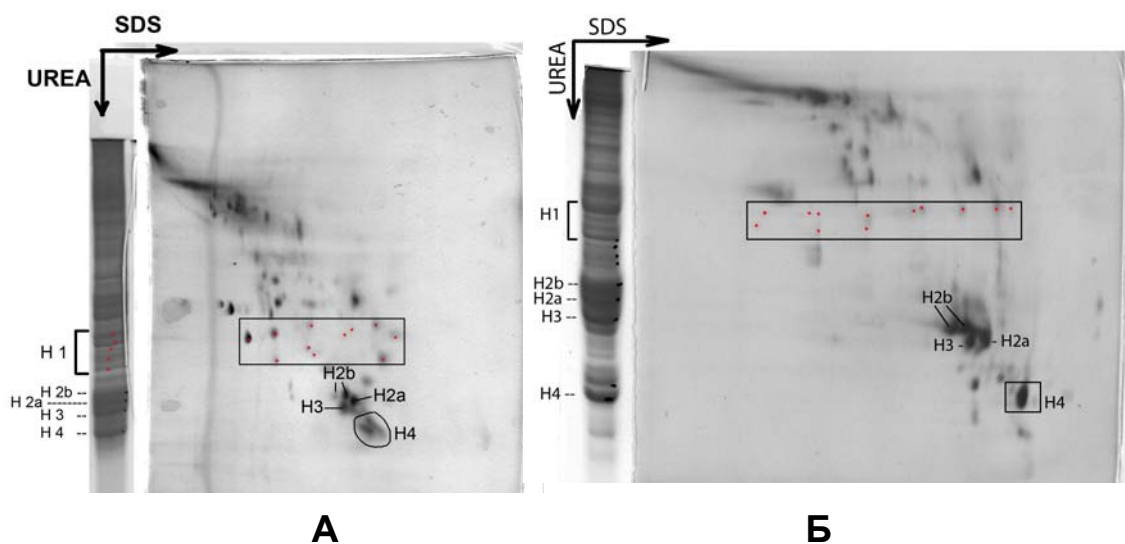


Рис. 2. Двумерное разделение гистонов ржи сорта Верасень (а) и секалотритикум S206 (б) (первое направление: уксусная кислота/мочевина (ПААГ 15%), второе направление: SDS (14% ПААГ)).

Следует отметить, что экстракция гистонов из ядер 0,2М H₂SO₄ позволяет получить наиболее чистую их суммарную фракцию, из которой, при электрофорезе в присутствии мочевины выявляются подфракции гистонов H1, H3 и H4. Это явление (увеличение гетерогенности) обусловлено колебаниями в структуре и зарядах молекул гистонов. В гелях, содержащих SDS, гетерогенность, связанная исключительно с различиями в молекулярных массах, обнаруживается лишь в гистоне H1. Выявляемые в присутствии мочевины подфракции гистонов H3 и H4 обусловлены их биохимической модификацией, приводящей к изменению структуры и заряда молекул. Исследование препаратов гистонов клеточных ядер проростков озимой ржи методом электрофореза и обработка данных с использованием специальной программы “Sigma-Gel” показали, что М.м. гистона H1 составляют 25,9 – 23,4 кДа, H2А – 14,5–24,6, H2В – 15,0-15,2, H3 – 13,8, H4 – 11,5–11,6 кДа. Изучение гистоновой группы белков ядра злаковых подтвердило, что их электрофоретическая подвижность различается у исследованных видов семейства злаковых из-за разницы в аминокислотном составе и связанных с этим величинах М.м. – это касается, в первую очередь, гистонов H1, H2А, H2В.

Проведенными исследованиями подтверждено, что электрофоретический спектр гистонов - генетически детерминированный признак, который хорошо отражает специфические особенности биотипа, сорта, линии. Изменение состава наиболее гетерогенного гистона H1 может проявляться на уровне рода и вида организма. В таком случае таксономическое видообразование может регулярно сопровождаться изменением субфракционного состава гистона H1, а также модификациями других гистонов.

Заключение. В результате проведенных экспериментов выявлено, что 4 фракции гистона H1, выделенные из проростков секалотритикум S206 и 5 фракций гистона H1, полученных при разделении гистонов ржи сорта Верасень в системе уксусная кислота/мочевина, при последующей разгонке во втором направлении (SDS-ЭФ) разделились на дополнительные подзоны. У ржи сорта Верасень на электрофореграмме наблюдалось 9 подзон, а у секалотритикум S206 при двумерном разделении – 12 субфракций, что подтверждает вариабельность гистона H1 и возможное использование его в качестве белкового теста (маркера) на уровне рода или вида у высших растений. Таким образом, высокоразрешающий электрофорез подтверждает специфичность гистонов в пределах семейства злаковых (рожь и секалотритикум) по этому показателю, прежде всего, по числу субфракций гистона H1.

Принцип ядерных белковых маркеров в настоящее время представляется важным направлением в области прикладной биохимии и селекции.

Литература:

1. Спиридович Е.В., Королева Н.Ю., Чижик О.В. Изменчивость запасных белков и гистона H1 у ржано-пшеничного амфидиплоида – секалотритикума - и его родительских форм // Материалы Международной научной конференции «Современные проблемы генетики» Минск, 17-18 ноября 2005 г.).
2. Н.Ю. Королева, И.А.Гордей, Т.И.Пенева Запасные белки семян – генетические маркеры экспрессии генома секалотритикум // Доклады НАН Беларуси. -2005. – Т.49, №3. – С.76-79.
3. Конарев В.Г. Белки пшеницы. – М.: Колос, 1980. - С.188-189.
4. Конарев В. Г. Белки растений как генетические маркеры. М., -1983. С. 320.
5. Конарев В.Г. Принцип белковых маркеров в геномном анализе и сортовой идентификации // Молекулярно-биологические аспекты прикладной ботаники, генетики и селекции. Теоретические основы селекции. Том 1.(под ред. В.Г.Конарева) М., Колос, 1993
6. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука.
7. Решетников В.Н. Клеточные ядра высших растений: Состав, структура, функции.-Мн.Навука и тэхніка,1992.-С.23.
8. Thornsens M., Franken L., Launholt D., Foian P., Grasser K. Interactions of the basic N-terminal and the acidic C-terminal domains of the maize chromosomal HMGB1 protein // Biochemistry. 2004. Vol. 43. P. 8029 – 8037.
9. Чижик О.В., Спиридович Е.В., Решетников В.Н. Белки нуклеопротеидных комплексов интерфазных клеточных ядер озимой ржи при прорастании // Клеточные ядра растений – экспрессия и реконструкция: Сб. науч. тр. I Региональной науч. конф. – Мн., 2001. С. 143 – 151.
10. Thornsens M., Franken L., Launholt D., Foian P., Grasser K. // Biochemistry. 2004. Vol. 43. P. 8029 – 8037.
11. Zlatanova J., Caiafa P., Van Holde K. // FASEB J. 2000. Vol. 14. P. 1687 – 1704.
12. Гордей И.А., Новикова Л.В. Генетические основы создания тритикале, создание ржано-пшеничных амфидиплоидов – секалотритикум. // Генетика, 1996, т. 32, № 6. С. 783 – 787.
13. Иванова Э.А., Вафина Г.Х. // Физиол. растен. 1990. Т.37, вып. 3. С. 609-615.
14. Kosterin O.E., Bogdanova V.S., Gorel F.L. et al. // Plant Science. 1994. Vol. 101. P. 189 – 202.
15. Laemmli U.K. // Nature. 1970. Vol. 227. P.680 – 685.
16. Веевник А.А., Сосновская Т.Ф., Лаптева О.К, Решетников В.Н. Разделение гистонов хроматина методом двумерного электрофореза // Весці АН БССР, сер. біял. навук. 1998. №3. С. 115–117.

Summary

The aim of this work is to study the protein composition of plant nuclei (Gramineae). The heterogeneity of histone proteins of *Graminae* (Rye and Secalotriticum) by means of 2-D electrophoresis method was confirmed. Fractional composition of histones from ray and secalotriticum seedlings was determined. Specificity of histones for the number of H1 subfractions and its species- specificity have been shown.