

ДНЕПРОПЕТРОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

БЕЛЫЧУК Валентина Сидоровна

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕГКОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ  
И НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ КУКУРУЗЫ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ

03.00.04 - биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Днепропетровск  
1992



00819709 (Y)

Робота виконана в лабораторії  
 отдела молекулярної біології Н  
 університету.

Научний керівник: доктор біологічних наук, професор  
 ВИННИЧЕНКО Олександр Михайлович.

Офіційальні опоненти: доктор біологічних наук, професор  
 ВИННИКОВ Альберт Іванович  
 доктор біологічних наук, ст. наук.  
 сотр. БОВЧУК Сергій Володимирович.

Ведуща організація: Чернівецький державний університет.

Захист дисертації скотався "18" листопада 1992 г. в  
 14.00 часів на засіданні Спеціалізованого ученого совету  
 № 053.24.06 по присудженню ученої степені кандидата біологічних  
 наук при Дніпропетровському державному університеті по адресу: 320625, ГСП,  
 г. Дніпропетровск, 10, проспект Гагарина, 72, корп. 17, біолого-  
 екологічний факультет.

С дисертацією можна ознайомитися в научній бібліотеці  
 Дніпропетровського державного університету.

Автореферат розослан "16" листопада 1992 г.

Учений секретарь  
 спеціалізованого ученого совета

Черная  
 Валентина Івановна



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Одним из реальных путей улучшения качества белка в зерне кукурузы является использование в практической селекции мутаций, влияющих на весь белковый комплекс семян. Особенно широкое распространение в этой отношении принадлежат спонтанным мутациям типа *opaque - 2 (o2)*, *sugar - 2 (su 2)*, *waxy (wx)*. Мутантные формы кукурузы характеризуются повышенным содержанием легкорастворимых белков, которые в значительной мере определяют качество зерна. Достижения в изучении биохимического действия гена *o2* показали, что улучшение питательной ценности белка обусловлено не только количественным перераспределением белковых фракций, но и глубокими изменениями в метаболизме белков и аминокислот. Это выражается в изменении физико-химических свойств и структуры отдельных белков, вязимых спектров и активности ряда ферментов (Школенко, 1978; Хаджинов, 1978; Плотников, 1985; Вилинченко, 1990). Большинство исследований посвящено изучению запасных белков в мутантных растениях. Сведения о легкорастворимых протеинах высоколизиновой мутантной кукурузы малоизвестны. До настоящего времени отсутствуют четкие представления о степени качественной изменчивости легкорастворимых белков и отдельных ее компонентов, связанных с азотным обменом, которые играют значительную роль в регуляции веществ в зерне при созревании и реализации наследственной информации (Кретович, 1972). В связи с этим изучение физико-химических свойств и структурных особенностей легкорастворимых белков и входящих в их состав ключевых ферментов азотного метаболизма у мутантных форм в процессе созревания зерновки является актуальным, приобретает важное теоретическое и практическое значение.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы было сравнительное исследование состава, физико-химических свойств и структурных особенностей легкорастворимых белков и ферментов переаминирования зерна различных генотипов кукурузы. Исходя из целей работы были поставлены следующие экспериментальные задачи:

1. Исследовать физико-химические свойства, аминокислотный состав и структурные особенности легкорастворимых белков исходных и мутантных форм кукурузы;
2. Изучить активность амидотрансфераз в процессе онтогенеза и выявить корреляционные связи между биохимическими показателями.
3. Исследовать полиморфизм аспартатаминотрансферазы у различных генотипов кукурузы.

4. Выделить аспаратаминотрансферазу из зерна исходной и мутантной кукурузы и изучить ее физико-химические свойства.

5. Разработать тест на выявление мутантных форм кукурузы по уровню активности ферментов переаминирования.

Научная новизна и практическая ценность работы. Исследованы в сравнительном аспекте особенности состава и физико-химических свойств легкорастворимых белков кукурузы различных генотипов. Впервые установлено, что у мутантов опейк-2 синтезируются водорастворимые белки, отличающиеся от таковых в обычной кукурузе по физико-химическим свойствам, компонентному и пептидному составу. Выявлена повышенная активность ферментов переаминирования в альбуминах мутантных форм кукурузы. Показана возможность использования активности аминотрансфераз в качестве экспресс-метода обнаружения эндоспермовых мутаций. Предложен метод оценки качества зерна по ферментативной активности вегетативных органов. Выявлены ранее неизвестные изменения полиморфизма аспаратаминотрансферазы в высоколизиновом мутанте. Получены новые данные об активности и изоферментном составе энзимов переаминирования гетерогизотных по гену опейк-2 мутантов кукурузы.

Впервые проведено выделение и сравнительное изучение физико-химических свойств изоформ аспаратаминотрансферазы зерна обычных и мутантных генотипов и выявлены причины изменения активности фермента в высоколизиновом аналоге.

Найдено, что повышенная активность ферментов переаминирования сопряжена с изменениями синтеза зерна в мутантном эндосперме. Полученные данные вносят определенный вклад в изучение механизма действия мутаций типа опейк-2, расширяют теоретические основы селекции кукурузы на качество зерна.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на 3-й, 4-й и 5-й конференциях молодых ученых и специалистов по проблемам кукурузы (Днепропетровск, 1981, 1985, 1987 гг.), II Всесоюзном совещании по проблемам кукурузы (Днепропетровск, 1984 г.), У Всесоюзном съезде генетиков и селекционеров (Москва, 1987 г.), У Всесоюзном съезде ботанического общества (Киев, 1987 г.), Всесоюзной конференции "Применение низкоэнергетических факторов в биологии и сельском хозяйстве" (Киров, 1989 г.), Всесоюзной конференции "Диагностика-89" (Куйбышев, 1989 г.), Всесоюзном совещании "Методы интенсификации селекционного процесса" (Одесса, 1990 г.), Научно-технической конференции "Проблемы азотистого метаболизма" (Волгоград, 1990 г.), VIII Всесоюзном симпозиуме "Молекулярные механизмы генети-

ческих процессов" (Москва, 1990 г.), П съезде Всесоюзного общества физиологов растений (Минск, 1990 г.), выездной сессии ВАСХНИЛ (Днепропетровск, 1989 г.), а также итоговых научных конференциях Днепропетровского госуниверситета (1985-1992 г.).

Публикация работы. По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, получено 1 авторское свидетельство.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитированной литературы и приложения. Основной текст изложен на *102* страницах машинописного текста и иллюстрирован *26* рисунками и *20* таблицами. Список использованной литературы состоит из *268* источников, в том числе *152* зарубежных авторов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были семена различной степени зрелости и вегетативные органы инбредных линий А204, W 64A, W 155, Wf 9 и их мутантных спейк-2 аналогов. Генотипическую зависимость активности и полиморфизма ферментов переаминирования изучали на семенах мутантов Su 2 и Wx. Растения выращивали в условиях полевых опытов на Днепропетровской опытной станции ВНИИ кукурузы. Зерно и вегетативные органы, отобранные в различные этапы созревания, фиксировали жидким азотом, лиофильно высушивали и измельчали на мельнице "Laboratory Mill 3100" (LKB, Швеция).

Альбумины и глобулины выделяли из обезжиренной муки по методу Осборна в модификации Даядри, Муро (1970) и Клименко (1971). Экстракцию протеолитических ферментов проводили водными и соевыми растворами в течение 30 мин при +4°C при постоянном перемешивании (Вовчук, 1978).

Концентрацию белка определяли по методу Доури и спектрофотометрически по поглощению при 280 и 280 нм. Активность аспартаминотрансферазы (А<sub>ААТ</sub>) и аланинаминотрансферазы (А<sub>АЛТ</sub>) оценивали колориметрическим с 2,4, динитрофенилгидразином (Langer, 1975) и спектрофотометрическим (Jenkins, 1959) методом. Удельную активность выражали в мкмоль пирувата на 1 мг белка.

Активность протеолитических ферментов с использованием субстратов (казеин, азоказеин, гемоглобин) определяли по (Kunitz, 1946) в модификации Вовчука (1976). Удельную активность рассчитывали в мкатах на 1 мг белка.

Препараты аспартатаминотрансферазы выделяли путем экстракции измельченных семян 0,1 М трио-НС1 буфером рН 8,0, содержащим 0,002 М ЭДТА, в соотношении 1:5 (по весу) при +4°C в течение 2 час. Экстракт подвергали фракционированию сульфатом аммония. Осажденные при 40-80% насыщения ( $M_n \cdot Y_{2SO_4}$  белки dialизовали и разделяли геле-фильтрацией на колонке с сефадексом G 200 (2,6x60 см), уравновешенной 0,05 М трио-НС1 рН 8,0. Фракция с высокой ферментативной активностью подвергали ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-глас-акриле (4,0x26 см) в линейном градиенте концентрации от 0,05 до 0,3 М  $NaCl$  в 0,05 М трио-НС1 буфере (рН 8,0).

Для разделения множественных форм аспартатаминотрансферазы использовали препаративное изоэлектрофокусирование на колонке 8101 (LKB, Швеция) объемом 110 мл в диапазоне рН 3,5-10 в градиенте плотности сахарозы (5-40%) по методу Регетти (1986). Для разделения легко растворимых белков использовали хроматографическое оборудование низкого и высокого давления фирмы LKB (Швеция).

Содержание пиридоксаль-5 фосфата определяли по Peterson (1954). Для определения SH-групп проводили реакцию с 5,5 дитиобис-2-нитробензойной кислотой по методу Элмана (1959).

Аминокислотный анализ проводили на автоматических анализаторах аминокислот ААА-801 (ЧССР) и Biotronic L-C-5001 (ФРГ) после гидролиза белков в 6 М  $NaCl$  при 105°C в течение 24 часов.

Электрофоретический анализ белков проводили в 8,2%-ном полиакриламидном геле, в трио-глицериновом буфере рН 8,3 по методу Davis (1964). Оценку гомогенности белков и их молекулярной массы осуществляли с помощью электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия в 15 и 12,5% полиакриламидном геле по методике Laemmli (1970) в присутствии и отсутствии 2-меркаптоэтанола на приборе ВЭС 2001 (LKB, Швеция). Компонентный состав альбуминов и аспартатаминотрансферазы исследовали методом изоэлектрофокусирования на готовых пластинах (12x16 см) на приборе Мультифор (LKB, Швеция) в соответствии с рекомендациями фирмы в диапазоне рН 3,5-9,5. Изоферментный анализ аспартатаминотрансферазы проводили в 7,5% полиакриламидном геле на приборе Трувеллера (1975) с гистохимическим окрашиванием прочным с/ним "ЕБ" при 37°C (Корочкин, 1977). Окрашенные и отмые гели денситометрировали с помощью сканера для анализа гелей, установленного на спектрофотометре Спекорд-М40 (ГДР). ИК-спектры получали на приборах Спекорд 75 UR и Спекорд М-80 в области 1100-4000  $cm^{-1}$ .

УФ-спектры легко растворимых белков исследовали на спектрофото-

метре Спекорд М-40 (ГДР) и ДУ -7 (США), спектры флуоресценции - на спектрофлуориметре МРФ-4 (Япония). Спектры кругового дихроизма (КД) измеряли на приборе ДХР-2 (СССР). Оптическую плотность КД рассчитывали на поглощение 1%-ного раствора в 1 см. кювете. Пептидные карты триптических гидролизатов альбуминов получали двухмерной тонкослойной хроматографией на пластинках "Lucasol" (ЧССР). Окрашивание пластинок осуществляли раствором нингидрина (Девени, 1976).

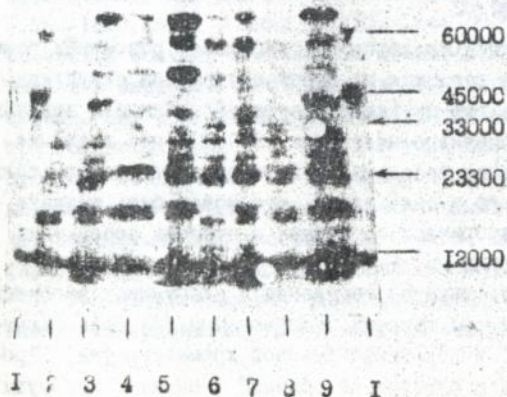
Статистическую обработку экспериментальных данных проводили на ЭВМ СМ-4.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика суммарных легко растворимых белков обычных и мутантных форм кукурузы. Введение гена опейк-2 в генотип кукурузы вызывает повышенное содержание легко растворимых белков, сбалансированных по аминокислотному составу. Наряду с количественными изменениями в составе водорастворимой фракции высоколизиновой кукурузы наблюдается ряд качественных отличий. Прежде всего это касается компонентного состава. Методом градиентного электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия установлено, что количество компонентов у мутантов по сравнению с исходной кукурузой снижается по линии А 204 с 31 до 28; wг 9 с 29 до 25; W 155 с 30 до 28, а у линии W 64A - повышается с 30 до 32. У легко растворимых белков зрелого зерна высоколизиновой кукурузы всех изучаемых линий наблюдается повышение содержания полипептидов с 10000-13000, 23300, 33000, 56000 и 76500 Да (рис. 1).

Рис. 1. Градиентный SDS электрофорез альбумино-глобулиновой фракции зрелого зерна обычной и мутантной форм кукурузы:

- 1 - стандартные белки - цитохром С, альбумин яичный, каталаза;
- 2 - А 204 +/+;
- 3 - А 204  $\alpha 2/\alpha 2$ ;
- 4 - wг 9 +/+;
- 5 - wг 9  $\alpha 2/\alpha 2$ ;
- 6 - W 155 +/+;
- 7 - W 155  $\alpha 2/\alpha 2$ ;
- 8 - W 64A +/+;
- 9 - W 64A  $\alpha 2/\alpha 2$



Изучение гетерогенности водорастворимых белков по дням созревания позволило установить, что качественные изменения присутствуют уже на ранних стадиях развития зерновки мутантных растений. Максимальное содержание белка в зонах и высокая гетерогенность приходится на 22-29-й день после опыления и совпадают с периодом интенсивного синтеза запасных белков.

Некоторые различия в структуре альбуминов выявлены методом пептидного картирования. При анализе пептидных карт триптических гидролизатов обнаружено, что альбумины высоколизиновой кукурузы отличаются количеством, положением и интенсивностью ряда пептидных фрагментов, что особенно выражено для пептидов средней подвижности (рис. 2).

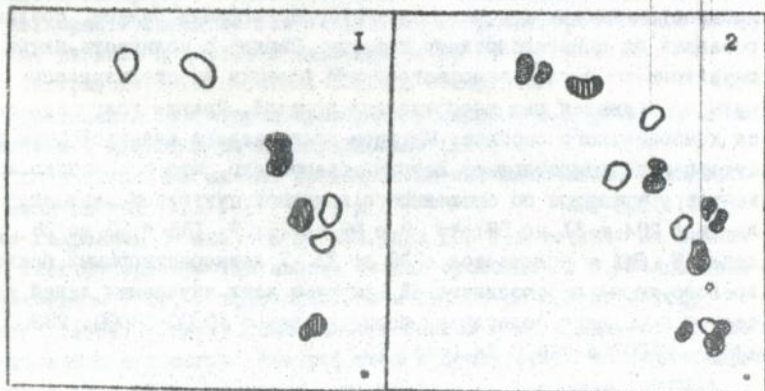


Рис. 2. Пептидные карты альбуминов исходной и мутантной кукурузы: 1 - A204 +/+; 2 - A204 α2/α2

Результаты исследований спектров КД-альбуминов различных генотипов кукурузы указали на различия их пространственной структуры. Так, у водорастворимых белков мутантных растений наблюдали незначительный сдвиг (1-3 нм) основного максимума (208-220 нм) в длинноволновую область и изменения положения и интенсивности дополнительного максимума, выраженного в виде плеча, что может быть вызвано модификацией параметров вторичной структуры и степени ассоциации с веществами небелковой природы.

Качественные и количественные изменения в альбуминах высоколизиновой кукурузы подтверждены данными, полученными при гель-фильтрации на сефадексе G-100 и обращенно-фазовой хроматографии. Профили элюции гель-фильтрации альбуминов обычной и опейк-2 кукурузы

в основном сходным, но наблюдаются различия в содержании и молекулярных массах белков в области  $M_r$  10000-13000 и 76000-77000, что согласуется с данными их компонентного состава. В альбуминах кукурузы опейк-2 обнаружено увеличение содержания супердизиновых фракций, что, по-видимому, имеет важное значение в улучшении качества зерна.

Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии, обладающей высокой разрешающей способностью, позволило идентифицировать в составе обычной кукурузы I2, а у высокодизиновой I7 белковых компонентов (рис. 3).

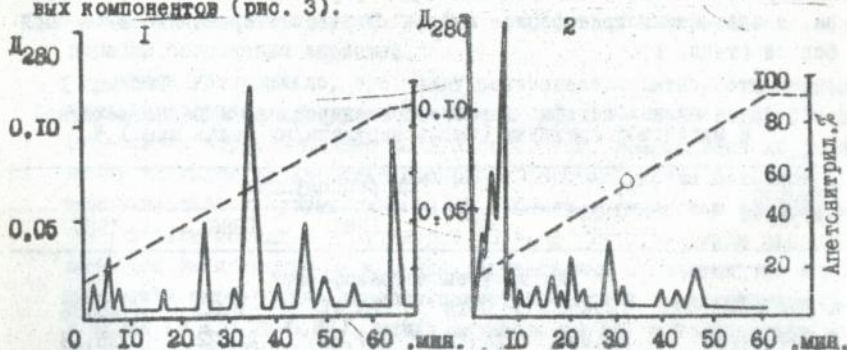


Рис. 3. Разделение альбуминов ВЭЖК исходной и мутантной кукурузы линия А 204. Колонка 20 см; неподвижная фаза Лихросорб RP-18 (5 мкм), элюент ацетонитрил в 0,1% трифторуксусной кислоте, градиент от 15 до 90% ацетонитрила в течение 60 мин. I - +/4, 2 - α/α

Спектрально-флуоресцентные исследования белков альбумино-глобулинового комплекса также свидетельствовали о некоторых изменениях физико-химических свойств белков мутантных генотипов. В ИК-спектрах исследуемых альбуминов наблюдаемые полосы поглощения амид I ( $1652-1660 \text{ см}^{-1}$ ) и амид II ( $1535-1544 \text{ см}^{-1}$ ) хорошо разрешены для протеинов обычных и мутантных аналогов. Положение максимумов изменяется в зависимости от природы белкового препарата, что может быть связано как с различным количественным соотношением тирозиновых и триптофановых остатков, так и с уширением максимума поглощения в результате воздействия на хромофорные системы процессов взаимодействия белковой макромолекулы с небелковыми веществами. Флуоресцентные характеристики водорастворимых белков, определяемые триптофановым флуорофором, подтвердили указанные выше закономерности.

Ранее установлено, что в альбуминах кукурузы опейк-2 вдвое повышено содержание аспарагиновой кислоты и понижено содержание фенил-

аланина, глутамина, валина. Повышенное содержание аспарагиновой кислоты определило интерес к изучению ферментов, участвующих в ее синтезе — аминотрансферазам.

Активность ферментов переаминирования протеина в зерне кукурузы различных генотипов. Исследование для активности аминотрансфераз в аллельных исходной и высоколизиновой формы кукурузы позволило выявить некоторые закономерности, характерные для эндоспермных мутаций типа  $\alpha 2$ . Нами установлено, что в зрелом зерне высоколизиновой кукурузы активность аспаратаминотрансферазы повышена в 1,4–2 раза, а аланинаминотрансферазы в 2,0–2,5 раза по сравнению с исходной формой (табл. I).

Таблица I

Удельная активность ферментов переаминирования в зерне исходной и мутантной кукурузы (ммоль пирувата/мг белка мин) \*

Генотип кукурузы	Год репродукции				
	1983	1984	1985	1986	1987
<b>Аспаратаминотрансфераза</b>					
A 204 +/+	12,45	9,13	10,41	9,33	15,86
A 204 $\alpha 2/\alpha 2$	24,95	16,28	7,80	22,22	25,18
W 155 +/+	9,20	10,32	8,13	6,06	7,18
W 155 $\alpha 2/\alpha 2$	19,33	19,90	14,23	10,44	11,87
WF 9 +/+	10,12	10,42	12,11	17,33	11,70
WF 9 $\alpha 2/\alpha 2$	16,12	17,40	19,73	26,44	21,51
W 64 +/+	14,86	16,30	12,35	5,33	14,30
W 64 $\alpha 2/\alpha 2$	27,44	28,29	20,26	9,77	23,65
<b>Аланинаминотрансфераза</b>					
A 204 +/+	20,43	18,34	19,31	21,09	26,28
A 204 $\alpha 2/\alpha 2$	55,36	42,54	52,52	81,48	68,18
W 155 +/+	9,36	11,43	10,32	6,06	12,20
W 155 $\alpha 2/\alpha 2$	28,17	37,71	36,12	22,48	56,12
WF 9 +/+	9,18	7,41	9,48	8,33	10,90
WF 9 $\alpha 2/\alpha 2$	27,17	23,78	29,39	24,71	42,60
W 64 +/+	12,48	12,77	8,12	4,22	10,82
W 64 $\alpha 2/\alpha 2$	37,04	39,60	28,41	14,22	27,24

\* Значения доверительных интервалов для каждого статистического ряда не превышало 5% от средних.

Введение в генотип кукурузы генов Su2 и Wx также приводило к повышению активности ферментов переаминирования. Величины удельной активности ААТ и АЛТ в опейк-2 генотипе сравнимы с активностями соответствующих ферментов для каждой изучаемой линии, содержащей гены Su и Wx.

Р гетерозиготных по гену опейк-2 форм кукурузы не обнаружено значительного повышения активности аспаргат- $\gamma$  аланинаминотрансферазы, как это отмечалось в гомозиготном мутантном генотипе.

Найденные различия по уровню активности ферментов переаминирования, выявленные в зрелом зерне, сохранялись и протяжении всего периода созревания зерновки.

Нами установлено, что между показателями активности ферментов переаминирования кукурузы, различной биологической ценности зерна существуют корреляционные зависимости. Так, коэффициент корреляции между удельной активностью аспаргатаминотрансферазы исходной и высоколизиновой кукурузы равен 0,91. Между активностью глутаминотрансферазы исходной и мутантной опейк-2 кукурузы также наблюдалась линейная зависимость ( $r = 0,89$ ). Установлена положительная корреляция между активностью аспаргатаминотрансферазы и содержанием лизина в зерне ( $r = 0,78-0,87$ ), между активностью ААТ и количеством аспарагиновой кислоты в альбуминах ( $r = 0,67-0,91$ ).

Полиморфизм аспаргатаминотрансферазы в зерне кукурузы различных генотипов. Изучение общей активности ферментов переаминирования не раскрывает всех причин, вызывающих изменения энзима в мутантных растениях. Поэтому нами было проведено изучение их ферментного спектра аспаргатаминотрансферазы.

У изучаемых нами линий кукурузы спектр ААТ зерна состоит из трех характерных изоферментов: митохондриального, цитоплазматического и гликоксисомального, которые имеют различную подвижность при электрофорезе и связаны с определенной субклеточной фракцией.

Сравнительное изучение изоферментного спектра аспаргатаминотрансферазы показало, что в мутантных растениях происходит количественно перераспределение молекулярных форм энзима, с увеличением содержания гликоксисомальной фракции.

Содержание активного белка митохондриальной изоформы составляет у мутантного образца 8% против 12% у обычного; цитоплазматической — 9% против 16%; гликоксисомальной — 83% против 72%.

Изоферментный спектр ААТ в процессе онтогенеза претерпевает изменение и полностью формируется к 29-му дню созревания зерновки, достигая максимального содержания активного белка в изоформах.

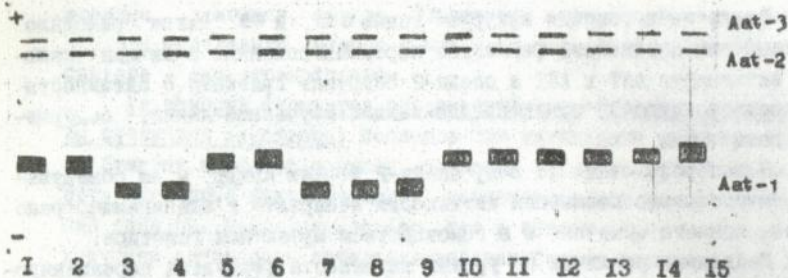


Рис. 4. Изоферментный спектр ААТ различных линий кукурузы (локус Аат-3 - митохондриальная; локус Аат-2 - растворимая; локус Аат-1 - гликоисомальная)

I - W I55 +/+; 2 - W I55  $\alpha 2/\alpha 2$ ; 3 - Wf 9 +/+; 4 - Wf 9  $\alpha 2/\alpha 2$ ;  
 5 - A 204 +/+; 6 - A 204  $\alpha 2/\alpha 2$ ; 7 - W 64A +/+; 8 - W 64A  $\alpha 2/\alpha 2$ ;  
 9 - W 64A  $\alpha 2/\alpha 2$  Su 2/Su 2; 10 - Г 23  $\alpha 2/\alpha 2$  Wx /Wx ;  
 11 - oh 43  $\alpha 2/\alpha 2$  Su 2/Su 2; 12 - A 293  $\alpha 2/\alpha 2$  Su 2/Su 2;  
 13 - MR  $\alpha 2/\alpha 2$  Su 2/Su 2; 14 - A 632  $\alpha 2/\alpha 2$  Su 2/Su 2;  
 15 - A 619  $\alpha 2/\alpha 2$  Su 2/Su 2

В тканях созревающего зерна наблюдается закономерность, установленная для зрелого зерна, т.е. изменяется соотношение белка в изоформах и увеличивается содержание гликоисомальной фракции, что согласуется с данными по определению общей активности фермента в процессе ситогенеза. Увеличение активного белка в гликоисомах способствует ацификации среды, что облегчает функционирование гидролитических ферментов (Калугина, 1980) и коррелирует с повышенной активностью протеиназ в мутантном генотипе.

Методом изоэлектрофокусирования на пластине было установлено (рис. 5), что каждая из изоформ содержит 2-3 субъединицы. Изоэлектрические точки компонентов гликоисомальной и цитоплазматической изоформ находятся в узком интервале pH 5,35-6,35, тогда как митохондриальный изофермент представлен тремя субъединицами с pI 8,0-8,2. Было обнаружено, что субъединицы имеют различную ферментативную активность. В мутантных генотипах происходит перераспределение активного белка в субъединицах, что сказывается на общей активности. Данная закономерность отмечена не только у гомозиготных, но и у гетерозиготных  $\alpha 2$  мутантах (рис. 6).

Таким образом, повышенная активность фермента в мутантных растениях обусловлена как количественным перераспределением изоформ ААТ с увеличением содержания гликоисомальной фракции, так и изменениями в соотношении активного белка в субъединицах изозимов.

Выделение и физико-химические свойства аспартаминотрансферазы из обычной и мутантной кукурузы. Для дальнейшего выяснения при-

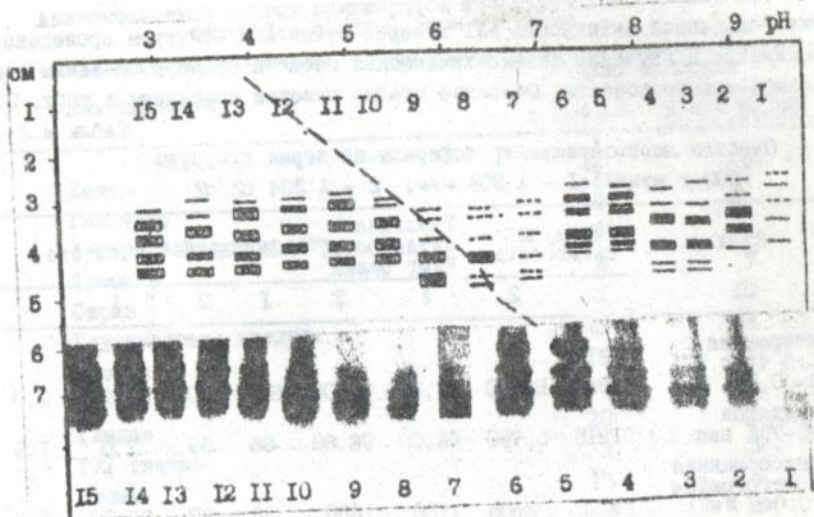


Рис. 5. ИЭФ альбуминов различных линий кукурузы (с гистохимическим окрашиванием на ААТ):

1 - w I55 +/+; 2 - w I55  $\alpha 2/\alpha 2$ ; 3 - w I9 +/+; 4 - w I9  $\alpha 2/\alpha 2$ ;  
 5 - A 204 +/+; 6 - A 204  $\alpha 2/\alpha 2$ ; 7 - w 64 +/+; 8 - w 64  $\alpha 2/\alpha 2$ ;  
 9 - w 64  $\alpha 2/\alpha 2$  su 2/su 2; 10 - Г 23  $\alpha 2/\alpha 2$  wx/wx;  
 11 - oh 43  $\alpha 2/\alpha 2$  su 2/su 2; 12 - A 295  $\alpha 2/\alpha 2$  su 2/su 2;  
 13 - Mx  $\alpha 2/\alpha 2$  su 2/su 2; 14 - A 623  $\alpha 2/\alpha 2$  su 2/su 2;  
 15 - A 619  $\alpha 2/\alpha 2$  su 2/su 2

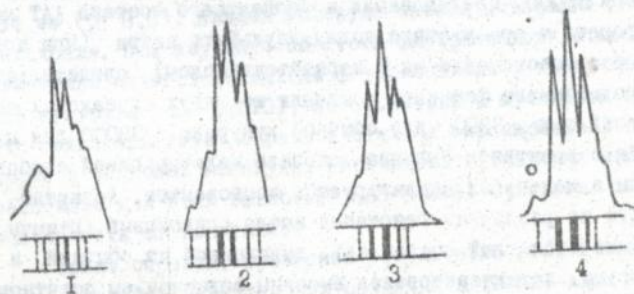


Рис. 6. Денситограммы компонентов аспаратаминотрансферазы различных генотипов линии w I55 после изоэлектрофокусирования:  
 1 - +/+; 2 - ++ $\alpha 2$ ; 3 - ++ $\alpha 2\alpha 2$ ; 4 -  $\alpha 2\alpha 2\alpha 2$

чин повышенной активности ААТ в зерне мутантной кукурузы проведено выделение и изучение физико-химических свойств препаратов энзимов в сравнительном аспекте. Основные стадии очистки приведены в табл. 2.

Табл. 2

Очистка аспартаминотрансферазы из зерна кукурузы  
(200 г муки): 1 - А 204 +/-; 2 - А 204 с2/с2

Стадия	Суммарная активность		Удельная активность, %/мг белка		Выход, %		Очистка	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Экстракция (1:5 трис HCl рН 0,8)	36940	61300	32,40	40,00	100	100	1,0	1,0
Осаждение (40-75% нас. л.)	31815	57200	65,00	96,60	86	86	2,0	1,8
Ионнообменная хроматография Г O OAM NaCl	14125	22605	1130	1650	38	37	35,00	36,0
П O, I M NaCl	4780	9240	126	230	13	15	3,0	5,0

Количество выделенного фермента из мутантной кукурузы и его удельная активность были несколько выше, чем у обычной. Изоэлектрофорное усурование препарата показало присутствие изоформ ААТ с рI 5,1, 6,0 и 6,3. Компоненты с рI 6,3 были выделены в гомогенном состоянии методом препаративного изоэлектрофокусирования из различных генотипов кукурузы. Молекулярная масса полученных компонентов, по данным ге-л-фильтрации на G-100, составила 78000 для обычной кукурузы и мутантной 76000. Исследования компонентного состава ААТ методом электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (при восстановлении и без восстановления 2-меркаптоэтанолом) свидетельствуют о том, что молекула фермента состояла из двух одинаковых полипептидных цепей с M<sub>r</sub> 39000 для обычной кукурузы и 38000 для мутантной. Проба с реактивом Эллмана показала наличие одной свободной SH-группы в молекулах анализируемых компонентов. Аспартаминотрансфераза из различных генотипов имела одинаковый оптимальный рН 8,0-8,5. Аминокислотный состав ААТ, выделенной из обычной и мутантной кукурузы, характеризовался высоким содержанием остатков лизина и других незаменимых аминокислот, низким - пролина и глицина (табл. 3).

Изучение спектральных свойств в препарате аспартаминотрансферазы показало, что оба фермента имели сходные спектры в видимой и

Таблица 3

Аминокислотный состав компонентов аспартаминотрансферазы  
обычной и опейк-2 форм кукурузы

Аминокислота	Число остатков	
	A 204 +/+	A 204 $\alpha/\alpha$
Лизин	17	22
Гистидин	16	20
Аспарагиновая кислота	33	34
Треонин	6	7
Серин	17	10
Глутаминовая кислота	45	44
Пролин	15	9
Аланин	17	15
Глицин	20	13
I/2 цистин	3	3
Валин	16	16
Метионин	3	2
Изолейцин	11	12
Лейцин	19	25
Тирозин	13	15
Фенилаланин	22	19
Общее количество остатков	291	283
Молекулярная масса	39000	37900

ближней ультрафиолетовой областях с характерными максимумами, обусловленными связанным с белком пирдоксаль-Р; при 430 нм (рН 5,3) и 354 нм (рН 8,0). Каждая молекула энзима содержала две молекулы пирдоксаля. При изучении спектров флуоресценции отмечено некоторое изменение квантового выхода флуоресценции у компонентов ААТ исходной кукурузы ( $q = 0,070$ ), по сравнению с мутантной ( $q = 0,060$ ), что свидетельствует о разной степени экранирования остатков флуорофоров в белковой молекуле. Рассчитанные значения анизотропии флуоресценции для этих белков (0,060-0,066) невелики и варьирует в зависимости от генотипа.

Таким образом, сравнение результатов исследований свидетельствует о наличии значительных различий в физико-химических свойствах индивидуальных белков аспартаминотрансферазы высоколизинной кукурузы по сравнению с обычной формой.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для селекционной практики предложено два новых экспресс-метода обнаружения мутантных опейк-2 форм кукурузы при массовой оценке селекционного материала:

- по повышенной активности аланинаминотрансферазы в зерне;
- по пониженной активности аспартатаминотрансферазы в вегетативных органах кукурузы в процессе созревания зерновки (Авт. свид. СССР № 1472000, опубл. Бюл. 15.04.1989 г.).

Показана перспективность проведения селекционных исследований на основе отбора форм кукурузы с высоким содержанием лизина в индивидуальных компонентах легкорастворимых белков.

## ВЫВОДЫ

1. Суммарные легкорастворимые белки мутантной кукурузы по сравнению с обычной характеризуются измененным компонентным, пептидным, аминокислотным составом, спектрально-флуоресцентными характеристиками, интенсивным накоплением белков с M 10000-13000, 23000, 56000, 76500.

2. Альбумины зерна высоколизиновой кукурузы обладают повышенной в 1,5-2 раза активностью аспартатаминотрансферазы и в 2-3 раза аланинаминотрансферазы.

3. Показано, что активность ферментов переаминирования в альбуминах обычной и мутантной кукурузы связаны между собой линейной зависимостью. Изменение активности аминотрансфераз в созревающем зерне мутантов сопряжено с повышением активности протеиназ.

4. В мутантном генотипе изменяется полиморфизм аспартатаминотрансферазы, происходит как количественное перераспределение молекулярных форм энзима и увеличение содержания более активной гликозисомальной фракции, так и изменение соотношения активного белка в субъединицах изоферментов.

5. Выделены индивидуальные компоненты ААТ обычной и мутантной кукурузы. Установлено их различие по аминокислотному составу, молекулярной массе, спектрально-флуоресцентным характеристикам, пространственной структуре.

6. Повышенная активность ААТ в зерне опейк-2 кукурузы обусловлена рядом факторов:

- увеличением на 20% содержания фермента в высоколизиновой кукурузе по сравнению с обычной;

- количественным перераспределением изоформ энзима и увеличением содержания более активной гликоксисомальной фракция;
- изменением соотношения активного белка в субъединицах изоферментов.

7. Разработано два теста на выявление мутантных форм кукурузы по уровню активности ферментов переаминирования.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Коцюбинская Н.П., Бильчук В.С., Мирш О.Г. и др. Изучение активности ферментов и ингибитора трипона в процессе созревания зерна кукурузы // Тез. докл. Второго Всесоюз. совещ. по физиологии кукурузы. - Днепропетровск, 1984. - С. 91.
2. Использование белков как маркеров генома при создании высоколизиновых мутантов /А.Н.Винниченко, Н.П.Коцюбинская, Л.В.Шупранова, В.С.Бильчук, Н.И.Штеменко: Тез. докл. У съезда Всесоюз. общества генетиков и селекционеров. - М., 1987. - Т. 4, ч. I. - С. 80-81.
3. Бильчук В.С., Васильев В.М., Коцюбинская Н.П. и др. Сравнительная характеристика альбуминов исходных и мутантных форм кукурузы // Материалы У Всесоюз. конференции молодых ученых по проблемам кукурузы. - Днепропетровск, 1987. - С. 241.
4. Бильчук В.С. Влияние мутантных генов на активность и изоферментный спектр аминотрансфераз кукурузы // Биохимические аспекты действия мутантных генов на белки кукурузы: Сб. науч. тр. - Днепропетровск, ДГУ, 1989. - С. 68-79.
5. Биохимические методы диагностики качества зерна /А.Н.Винниченко, Д.В.Донченко, И.А.Филоник, В.С.Бильчук, Н.П.Коцюбинская: Материалы Всесоюз. конф. "Диагностика-89". - Куйбышев, 1989. - С. 35-36.
6. Феденко В.С., Филоник И.А., Бильчук В.С. и др. Биохимические методы идентификации эндоспермных мутантов кукурузы // Методы интенсификации селекционного процесса. - Одесса, 1990. - С. 66-67.
7. Коцюбинская Н.П., Бильчук В.С., Винниченко А.Н. и др. Характеристика ферментов переаминирования у мутантов кукурузы с измененным аминокислотным обменом // Тез. докл. науч.-техн. конф. "Проблемы азотистого метаболизма". - Волгоград, 1990. - С. 52.
8. Коцюбинская Н.П., Бильчук В.С., Шупранова Л.В. Генетический контроль множественных форм аспаратаминотрансферазы у высоколизиновых мутантов // Тез. докл. УП Всесоюз. симп. "Молекулярные механизмы генетических процессов". - Москва, 1990. - С. 156.

9. Феденко В.С., Бильчук В.С., Струшко В.С. и др. Спектроскопия белков кукурузы. II. Альбумины // Химия природных соединений. - 1991. - № 4. - С. 546-553.
10. Винниченко А.Н., Бильчук В.С., Феденко В.С. и др. Спектральные характеристики функционально активных белков кукурузы // Тез. докл. УП конф. по спектроскопии биополамеров. - Харьков, 1991. - С. 44-45.
11. Бильчук В.С. Активність та фізико-хімічні властивості ферментів азотного обміну при ендо- і екзогенному впливі // Тез. ІУ Укр. біохім. з'їзду. - Київ, 1992. - Т. 3. - С. 5.
12. Бильчук В.С., Копробинская Н.П., Щупранова Л.В. Изменение функционально активных белков зерна как результат экспрессии мутантного генома кукурузы // Тез. докл. Второго Всесоюз. общества физиологов растений. - М., 1992. Ч. II. - С. 26.
13. Yinnichenko A.N., Kotsybinskaya N.P., Bilchuk V.S., Filonik I.A. Nitrogen metabolism enzymes and serine protease inhibitors of high lysine maize // Abs 19th FEBS meeting, Rome, 1989, P. 196.
14. Bilchuk V.S., Kotsybinskaya N.P. Identification of the high lysine maize forms according to aspartate aminotransferase features // J. Cell. Biochem. Sup. - 1990. - 14B. P. 347.
15. Kotsybinskaya N.P., Bilchuk V.S. Mechanism of the protein quantity and quality regulation in maize grain of the high lysine mutants // J. Cell. Biochem. Sup. - 1990.-R. 518, P. 351.
16. Bilchuk V.S., Kotsybinskaya N.P. Qualitative and quantitative changes of the water-salt soluble protein in high lysine mutant of maize // Abs. 20 FEBS Meeting, Budapest, 1990.- P. 175.

А.о. № 1472000. Способ оценки селекционного материала кукурузы на выявление гена опейк-2 // Винниченко А.Н., Копробинская Н.П., Донченко Ю.В., Зимченко Н.Г., Бильчук В.С. // Открытия. Изобретения. 15.04.89. Бюлл. № 14.

*В. Бильчук*

БИЛЬЧУК Валентина Сидоровна

Сравнительное исследование легкорастворимых белков  
и некоторых ферментов кукурузы различных генотипов

03.00.04 - биохимия

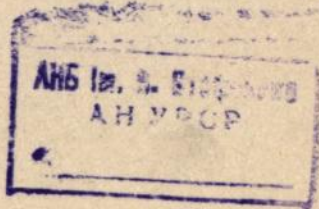
Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

---

Подписано в печать 6.07.92. Формат 60x84/16 Бумага типографская.  
Печать плоская. Усл. печ. л. I. Уч.-изд. л. I. Тираж 100.  
Заказ № 253 Бесплатно

---

Ротапринт ДУ, 320110, г. Днепропетровск, ул. Казакова, 4а



AB 25.971