

16. Bond D. J., McMillan Z. The effect of *p*-fluorophenylalanine on the frequency of aneuploid meiotic products in *Sordaria brevicollis* // *Mutat. Res.*—1979.— 60, N 2.— P. 221—224.
17. А. с. 1544798 СССР, МКИ С 12 № 5/00. Стимулятор эмбриогенеза в культуре растительной ткани / О. В. Захленюк, И. А. Костенюк, В. А. Кунах и др. // *Бюлл. № 7.*—1990.
18. Malepszy S. Kultury tkankowe w genetice roslin ze szczegolnym uwzlednieniem haploidow // *Zes. nauk SGGWAR Warsz. Rozpr. nauk.*—1979.— 110.— S. 113.
19. Gupta N., Bhaskaran S. *In vitro* isolation of biochemical mutants in haploid cell cultures of *Nicotiana tabacum* // *Plant cell cult. crop improv. Proc. Int. symp. (Calcutta, 1981).*— New York; London, 1983.— P. 387—396.
20. Role of permanent dicentric systems in carrot somatic embryogenesis / F. Toncelli, G. Martini, G. Giovinazzo et al. // *Theor. and Appl. Genet.*—1985.— 70.— P. 345—384.
21. Evans D. A. Somaclonal variation—genetic basis and breeding applications // *Trends Genet.*—1989.— 5, N 2.— P. 35—63.
22. Кунах В. А. О связи между плоидностью штаммов *Crepis capillaris* и *Haploparpus gracilis* и спонтанным органоогенезом // *Цитология и генетика.*—1974.— 8, № 4.— С. 303—308.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев  
Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН УССР, Киев

Получено 11.02.91

УДК 577.113

Н. И. Сьякте, А. В. Будылин

## АССОЦИАЦИЯ ДОМЕНОВ ХРОМАТИНА С ЯДЕРНЫМ СКЕЛЕТОМ В КЛЕТКАХ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА. АНАЛИЗ МЕТОДОМ НУКЛЕОПРОТЕИД-ЦЕЛИТ-ХРОМАТОГРАФИИ

*Методом НПЦ-хроматографии исследовано распределение нуклеопротеидов различной прочности в изолированных ядрах и ядерном матриксе. В препаратах матрикса, полученных обработкой ядер ДНКазой I, обнаружены устойчивая к соли-мочевине (ДНК II) и неустойчивая (ДНК I) связи ДНК — матрикс. Все связи устойчивы к действию меркаптоэтанолола, ЭДТА и низкой ионной силы. ДНК II чувствительна к действию нуклеазы S<sub>1</sub> для ее разрушения необходимо плавление молекулы ДНК. Рестриктазы вызывают деградацию ДНК II с различной эффективностью: AluI, Sau3AI >> EcoRI, PstI, PvuII > HindIII, SalGI, BamHI. По совокупности свойств ДНК I и ДНК II не соответствуют связям ДНК — матрикс, обнаруживаемым другими методами.*

**Введение.** Со скелетными структурами клеточного ядра (ядерный матрикс, каркас, нуклеоид) ассоциированы многие ферментативные активности, включая транскрипцию и репликацию [1—7]. Разнообразие функций ядерного скелета объясняют множественностью и гетерогенностью точек ассоциации ДНК с этой структурой. Различаются типы связи ДНК с ядерным матриксом по признакам устойчивости к хелатирующим агентам [1, 8, 9], постоянства и зависимости от транскрипции [4, 6]. Разработана модель функционирования ядерного матрикса, основанная на разделении функций разных точек связи ДНК с ядерным скелетом [3]. При помощи метода НПЦ-хроматографии были обнаружены различающиеся по прочности два типа связи ДНК с ядерным матриксом. «Слабая» связь (ДНК I) разрушается в концентрированных растворах соли-мочевины, «прочная» (ДНК II) — при высокой температуре. Предполагается, что прочная связь участвует в репликации и имеет топологическую природу. Предварительно охарактеризованы полипептиды и последовательности ДНК, образующие ксмплексы. Идентифицировать ДНК I и ДНК II со связями, обнаруженными другими методами, не удается [2, 10—14].

Значительная часть результатов получена при помощи двухградIENTного варианта НПЦ-хроматографии, в котором ДНК I и несвязан-

© Н. И. СЬЯКТЕ, А. В. БУДЫЛИН, 1991

ная с матриксом ДНК не разделяются, что затрудняет их интерпретацию. В предлагаемой работе ДНК-белковые взаимодействия в препаратах изолированных ядер и ядерного матрикса, подвергнутых различным воздействиям, изучали усовершенствованным трехградиентным вариантом НПЦ-хроматографии. Целью работы было сопоставление некоторых свойств ДНК I и ДНК II с различными типами связи, выявляемыми на основе других критериев.

**Материалы и методы.** Работа выполнена на клетках тетраплоидного штамма перевиваемой асцитной карциномы Эрлиха. ДНК метили внутрибрюшинным введением  $^3\text{H}$ -тимидина (3,7 МБк) за сутки до забоя мышей-опухоленосителей (7—9-й день). Ядра и матрикс выделяли, как описано ранее [11, 13]. Обработку ДНКазой I проводили в 25 мМ трис-НСl, рН 7,6, 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , реакцию останавливали добавлением ЭДТА до 10 мМ. С  $S_1$ -нуклеазой инкубировали в 0,02 М Na-ацетатном буфере, рН 4,5, 0,2 М NaCl, 1 мМ  $\text{ZnSO}_2$ , реакцию останавливали увеличением концентрации NaCl до 2 М. Инкубацию с рестриктазами осуществляли в среднесолевом рестриктазном буфере (100 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 50 мМ NaCl, 0,02 %-ный тритон X-100). Трехградиентный вариант НПЦ-хроматографии подробно описан ранее [13]. Исследуемые нуклеопротеиды фиксировали на целите белковой частью, ДНК высвобождали из комплекса с белками градиентами концентрации NaCl (0—3 М), LiCl-мочевины (0—4 М, 8 М соответственно) и температуры (0—100 °С при постоянном пропускании через колонку 4 М LiCl, 8 М мочевины). Все растворы содержали 25 мМ трис-НСl, рН 7,6, и 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ . В отдельных случаях вместо 5 мМ  $\text{MgCl}_2$  растворы содержали 1 мМ ЭДТА или градиент температуры проводили с 0,12 М LiCl, 8 М мочевиной. Очистку ДНК, электрофорез в агарозе и сканирование гелей осуществляли по общепринятым методикам.

**Результаты и обсуждение.** На первом этапе работы исследовано НПЦ-хроматографическое распределение ДНК из различных субъядерных фракций, полученных после обработки изолированных ядер ДНКазой I. ДНК интактных ядер практически количественно элюируется в градиенте температуры (ДНК II) (рис. 2, а). Обработка ДНКазой I резко изменяет характер хроматограммы, пик ДНК II практически исчезает, его сменяет пик ДНК I, присутствует и несвязанная с матриксом фракция ДНК 0, элюируемая NaCl (рис. 1: НПЦ-хроматограммы ДНК субъядерных фракций, полученных обработкой изолированных ядер асцитной карциномы Эрлиха ДНКазой I (6 ед. Кунитца в 1 мл, 37 °С, концентрация ДНК 100 мкг/мл): а — изолированные ядра; б — изолированный матрикс; в — хроматин, экстрагированный при низкой ионной силе. Здесь и далее по оси абсцисс — номера фракций, по оси ординат — радиоактивность  $^3\text{H}$ -тимидина, (имп/мин) · 10<sup>-3</sup>). В данном случае полностью воспроизводятся ранее полученные результаты [13]. Однако после экстракции хроматина распределение пиков ДНК в ядерном матриксе парадоксально изменилось. Представлены примерно равновеликие фракции ДНК 0, ДНК I и ДНК II. Хроматин, экстрагированный при низкой ионной силе, элюируется градиентом концентрации NaCl (см. рис. 1, в). Выраженность пика ДНК II в препаратах матрикса, подвергнутых трехградиентной НПЦ-хроматографии, и почти полное его отсутствие в наших прежних опытах [13] в принципе объяснимы. В двухградиентном варианте фракция ДНК 0 (остаточный хроматин, содержание которого может быть значительным) и ДНК I налагаются друг на друга и создается впечатление преобладания ДНК I. В трехградиентном варианте эти пики разрешаются, ДНК II становится более заметным. Кроме того, при работе с клетками асцитной карциномы Эрлиха, мечеными *in vivo*, можно получить большое количество материала с высокой удельной активностью, что облегчает идентификацию фракций. Резкое снижение содержания ДНК I в ходе выделения матрикса можно объяснить гидродинамическим отрывом массы ДНК от матрикса при экстракции хроматина. Ранее фрак-

цию ДНК II наблюдали в препаратах матрикса, полученных после обработки ядер ДНКазой II и микрококковой нуклеазой [15].

Однако разработанная ранее модель топологической связи в значительной мере базировалась на данных о гиперчувствительности прочной связи к ДНКазам. Считается, что эта связь образована локально денатурированным участком ДНК, закрепленным на белковом стержне. Внесение разрывов в этот участок приводит к разрушению связи. Кажется, что в литературе накапливаются данные, подтверждающие

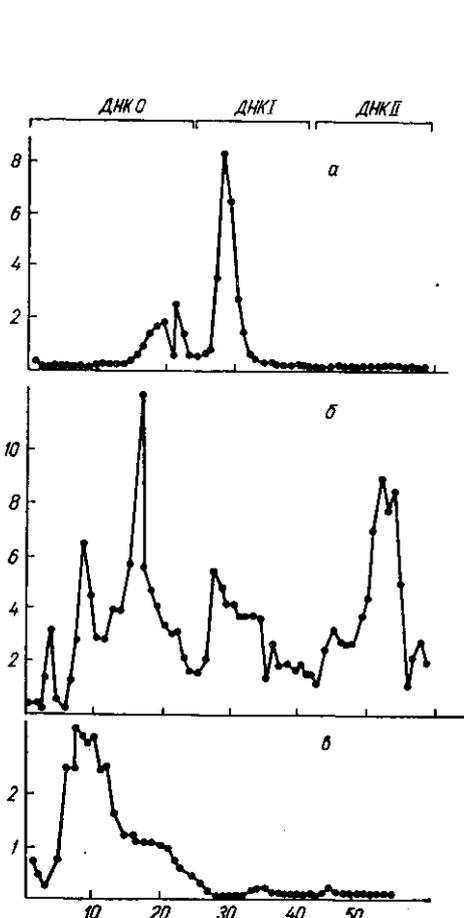


Рис. 1

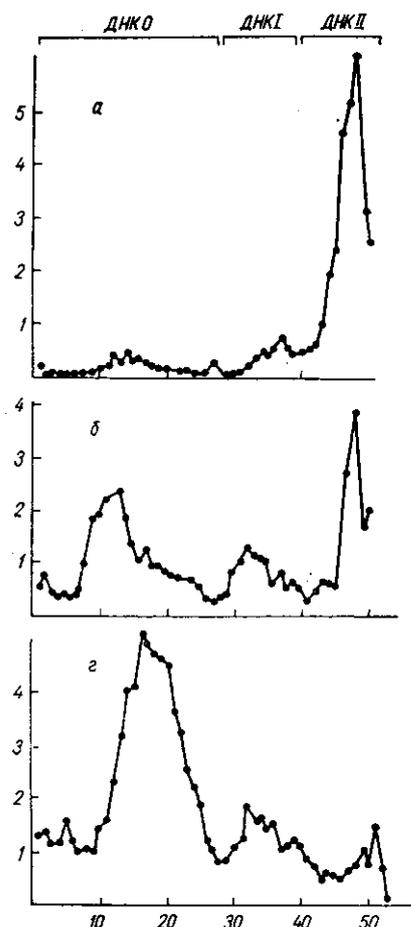


Рис. 2

нашу модель. Наличие гиперчувствительных участков в ДНК II подтверждено при помощи ник-трансляции [14], имеется много данных о существовании гиперчувствительных участков в местах прикрепления ДНК к матриксу [7, 16], в том числе и близ начала репликации [17]. Установлены участие легкоплавких АТ-богатых участков в прикреплении ДНК к матриксу [18—20], необходимость суперспирализации ДНК для ее связывания с матриксом [21], наличие участков с необычной вторичной структурой в основании петли ДНК [4, 20, 22, 23] и факт чувствительности этих участков к нуклеазе  $S_1$  [5]. Присутствие остаточной фракции ДНК II, резистентной к ДНКазе I, не опровергает полностью нашу модель и к тому же взамен гиперчувствительности необходимо представить столь же веские аргументы.

Подобным аргументом могла бы быть чувствительность прочной связи к нуклеазам, специфичным к однонитчатой ДНК. Мы располагаем такими данными, однако в одном случае они были получены с применением двухградиентной НПЦ-хроматографии [24], что затрудняет

интерпретацию, в другом — в экспериментах с изолированными ядрами, в которых низка доступность однонитчатых участков для фермента, поэтому результаты малоубедительны [25]. Данные были проверены на препаратах комплексов ДНК — матрикс, обработанных нуклеазой  $S_1$  (рис. 2: НПЦ-хроматограммы комплексов ДНК — матрикс: *a* — интактный комплекс; *б* — обработка  $S_1$ -нуклеазой (200 ед/мл,

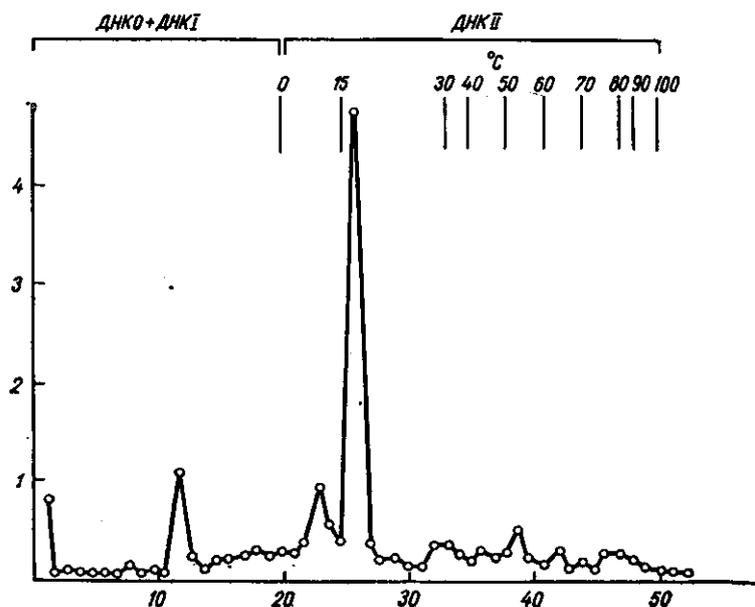


Рис. 3

30 мин, 37°C); *в* — то же (400 ед/мл, 60 мин, 37°C)). Нуклеаза  $S_1$  эффективно переводит ДНК II в формы ДНК I и ДНК 0 в зависимости от концентрации фермента и времени обработки. Наличие фракции ДНК 0 обусловлено, по-видимому, остаточными гистонами на петлях ДНК в препарате и лишний раз подтверждает преимущества трехградIENTного метода. Эффект перехода значительно сильнее выражен на комплексах ДНК — матрикс, чем на изолированных ядрах [25].

Модель предполагает необходимость плавления ДНК для отрыва ДНК II от матрикса. Облегчение условий плавления ДНК резким снижением ионной силы раствора при проведении градиента температуры (с 4 до 0,12 М LiCl) с сохранением высокой концентрации мочевины (8 М) привело к значительному снижению температуры элюции ДНК II от 100 до 15°C (рис. 3: НПЦ-хроматограмма ДНК изолированных ядер. Градиент концентрации NaCl не использовали, при проведении градиента температуры концентрация LiCl была снижена до 0,12 М. Стрелки означают этапы градиента температуры). Таким образом, наша модель, по-видимому, в целом верна. Скорее всего, гиперчувствительный участок не ограничен только локально денатурированным сайтом, но включает и его окружение. При незначительной фрагментации разрывы могут располагаться поблизости от расплетенного участка, сам же он оставаться интактным. В таком случае возможно сохранение остаточной фракции ДНК II.

Неразрешенным до конца вопросом остается и взаимосвязь ДНК I и ДНК II с описанными в литературе типами связи ДНК — матрикс. Особенно нас интересовали «тип I» и «тип II», описанные Леммли с сотр. ([8, 19], обзоры [1, 31]). Тип I чувствителен к действию меркаптоэтанола и ЭДТА [9], содержит специфические последовательности, связывающиеся с матриксом (MAR), консенсус для топоизомеразы II [8], образует розеточные структуры [9]. Тип II устойчив к действию

хелатирующих агентов, образован белками ламины. При помощи слабой обработки изолированных ядер ДНКазой I были получены препараты, в которых хорошо выражены все три фракции ДНК (рис. 4: НПЦ-хроматограммы изолированных ядер, инкубированных в средах различного состава. Ядра обработаны ДНКазой I (*a* — *в* — 6 ед. Кунитца в 1 мл, 15 мин, 0 °С; *г*, *д* — 6 ед. Кунитца в 1 мл, 5 мин, 37 °С);

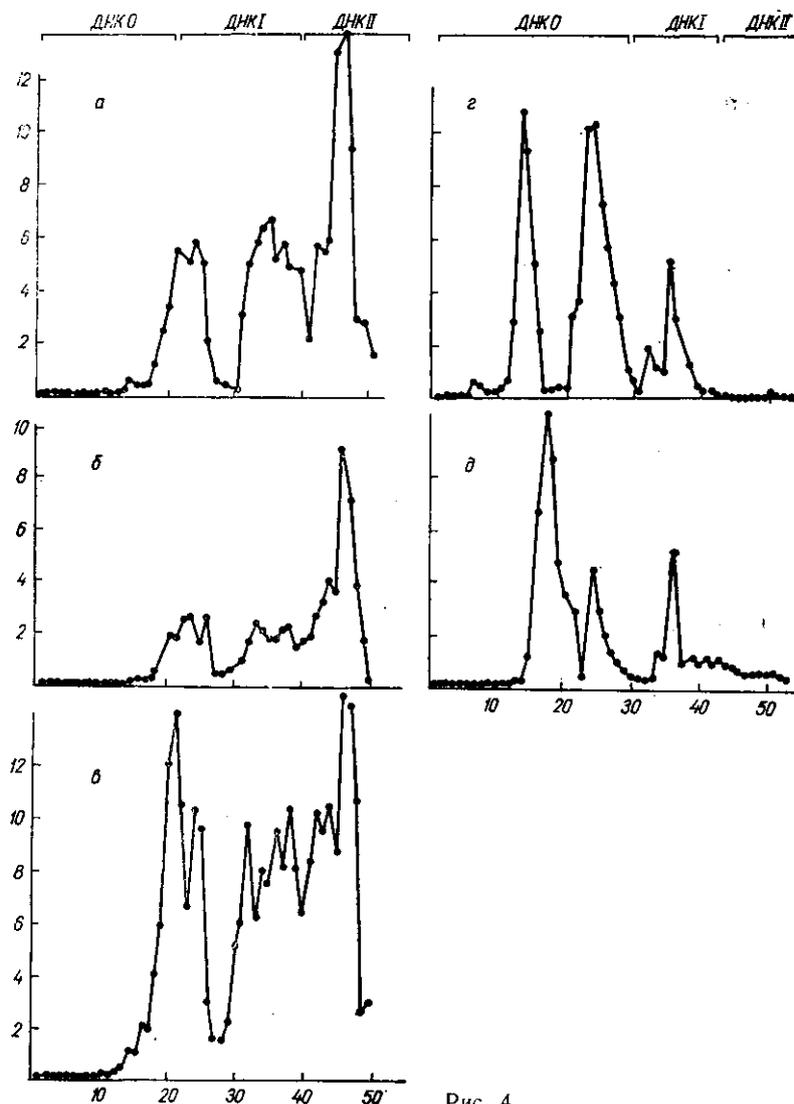


Рис. 4

*a*, *г* — контроль; *б* — 25 мМ трис-НСI, рН 7,6, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ β-меркаптоэтанол, 1 ч, 0 °С; *в* — 1 мМ трис-НСI, рН 7,6, 2 мМ ЭДТА, 1 ч, 0 °С; *д* — 15 мМ β-меркаптоэтанол, 10 мМ ЭДТА, 1 ч, 0 °С). Последующая инкубация в среде (см. рис. 4, *б*) не изменила характера хроматограмм. Поскольку известно, что для образования связи «тип II» наиболее важны двухвалентные ионы [9], опыт был повторен в более жестких условиях. Обработанные ДНКазой I ядра инкубировали в 15 мМ меркаптоэтанол, 10 мМ ЭДТА, после чего провели НПЦ-хроматографию при помощи растворов, в которых 5 мМ MgCl<sub>2</sub> был заменен на 1 мМ ЭДТА. Эта инкубация не элиминировала ни один из типов связи на НПЦ-хроматограммах (см. рис. 4, *д*).

Разным с сотр. [4, 6] обнаружены перманентный и зависящий от транскрипции типы связи ДНК — матрикс. Характерной чертой

связанных с транскрипцией комплексов является их неустойчивость при низкой ионной силе [6]. Инкубация обработанных ДНКазой I ядер в 1 мМ трис-HCl, 2 мМ ЭДТА в течение 1 ч при 0 °С не вызвала, однако, резких изменений на НПЦ-хроматограммах (рис. 4, в). Таким образом, на основании чувствительности к составу среды ДНК I и

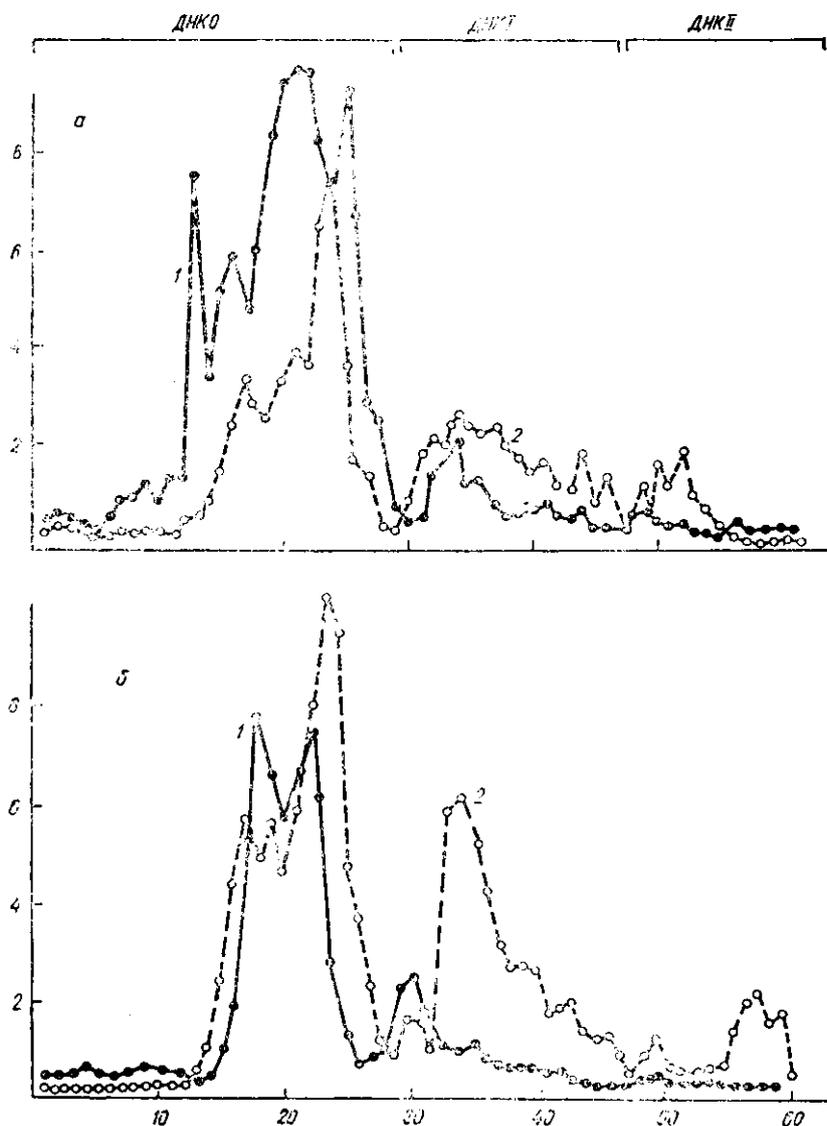


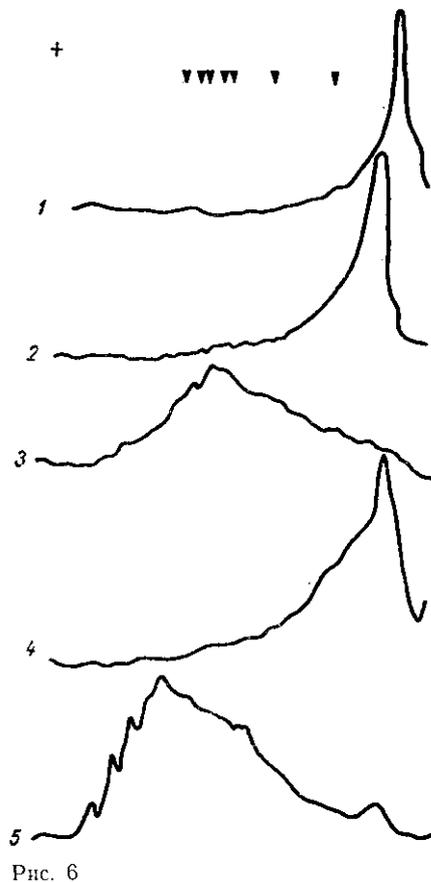
Рис. 5

ДНК II нельзя отождествить с типами связи ДНК — матрикс, описанными другими авторами.

Еще одним возможным путем сравнения разных типов связи ДНК — матрикс является исследование их чувствительности к перевариванию рестриктазами. Нами ранее была описана неодинаковая чувствительность прочной связи к различным рестриктазам в клетках NT1080 [42]. Известна также обогащенность различным повторами ДНК, образующей связи типа I и II по Леммли [9]. Безусловно, на чувствительность к рестриктазам могут влиять различные факторы. Например, в домене рДНК шпорцевой лягушки имеется лишь один сайт для *HindIII* [5], сильно влияет на характер перевара и экранирование белками, особенно в точках прикрепления к матриксу [26]. Од-

нако в целом чувствительность к перевору рестриктазами в известной мере характеризует распределение повторов с различным мотивом вдоль петли хроматина. Инкубацию с рестриктазами проводили в среднесолевоом буфере, чтобы исключить влияние различной степени конденсации хроматина в средах с разной ионной силой. На начальном этапе было исследовано влияние частоты внесения разрывов рестриктазами на характер НПЦ-хроматограмм. Для этой цели сравнивали ферменты, атакующие тетра- и гексануклеотид, с ферментами, атакующими гексануклеотид, содержащий ту же последовательность. Все рестриктазы брали в концентрации 600 ед/мл, инкубировали 1 ч при 37 °С. На рис. 5 представлены НПЦ-хроматограммы ядер, обработанных рестриктазами, узнающими 4 или 6 пар оснований (а: 1 — *AluI* (AGCT), 2 — *PvuII* (GAGCTG); б: 1 — *Sau3AI* (GATC), 2 — *BamHI* (GGATCC)). Как видим, более сильная фрагментация ДНК (денситограммы электрофорезов ДНК, выделенных из ядер, представлены на рис. 6: 1 — контроль, 2 — *BamHI*, 3 — *Sau3AI*, 4 — *PvuII*, 5 — *AluI*; стрелки обозначают положения стандартов (11,6; 11,03; 8,04; 4,89; 4,32; 3,11 тыс. пар оснований, справа налево) сопровождается более выраженным переходом ДНК II—I—0. Если же сравнить эффективность различных рестриктаз, атакующих гексануклеотиды, то здесь заметны различия. *SalGI*, *HindIII*, *BamHI* вызывают менее выраженный переход по сравнению с *EcoRI*, *PstI*, *PvuII* (см. рис. 5 и рис. 7: НПЦ-хроматограммы изолированных ядер, обработанных рестриктазами, атакующими гексануклеотиды: а — *SalGI*, б — *HindIII*, в — *EcoRI*, г — *PstI*). Несмотря на различия объектов, данные очень хорошо совпадают с результатами, полученными на клетках человека [23]. Аналогии с нуклеоидами I и II типа по Леммли обнаружить не удастся. ДНК, образующая ЭДТА-чувствительную связь, содержит повторы *PstI* и *SalGI*, нечувствительную — *EcoRI* и *HindIII*, сайты для *AluI* имеются в ДНК обоих типов [9].

В заключение следует отметить, что, несмотря на признание всеми множественности ассоциации ДНК с матриксом, конкретные характеристики отдельных фракций сильно различаются у разных авторов. Ковалентно связанные нуклеопротеиды сдинакового полипептидного состава, по данным одних авторов, участвуют в транскрипции [6], других — содержат сателлитную ДНК и нетранскрибируемые последовательности [27]. Нами в подобных препаратах обнаружены четыре типа связи ДНК — белок [28, 29]. Розетки находят во фракции, чувствительной к ЭДТА [1] и в депротенизированной ДНК [30]. Очевидно, ассоциация ДНК с ядерным матриксом плохо укладывается в упрощенные схемы, по-видимому, картина очень изменчива, возможно образование сложных субпетель внутри одного домена [16]. При бережном выделении ядерного скелета обнаруживается ассоциация с ним ДНК на большом протяжении (90 тыс. пар оснований) [26], внутри



этого участка характер взаимодействий может быть чрезвычайно сложным, а при различных методах выделения матрикса связь с ДНК могут сохранять разные его фрагменты.

Прочная связь ДНК II доступна для исследования только методом НПЦ-хроматографии и ускользает из поля зрения при применении других подходов, например, недавно опубликовано сообщение о

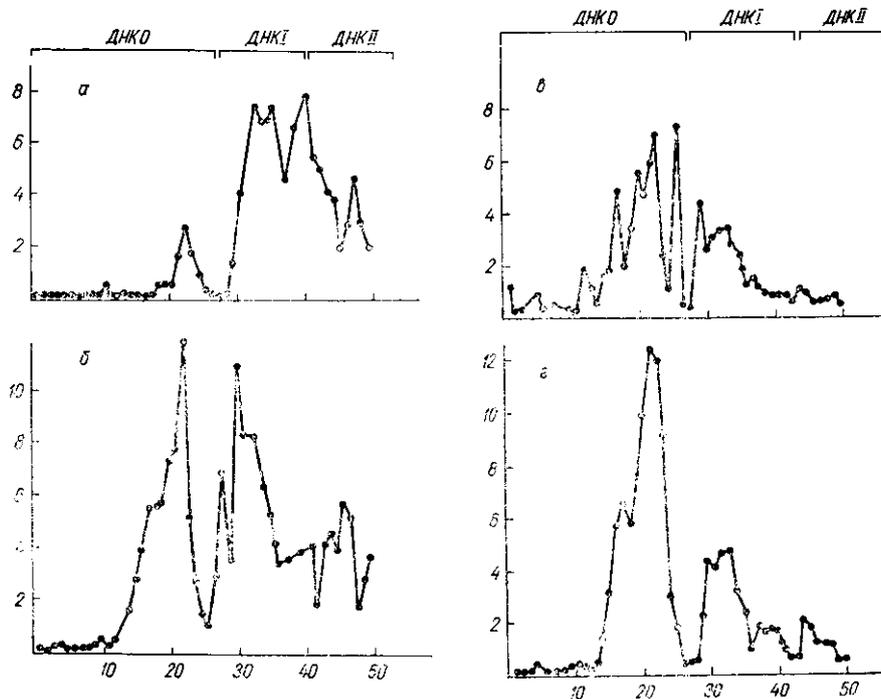


Рис. 7

полной экстракции ДНК из препаратов матрикса солью и мочевиной, т. е. получена фракция, соответствующая ДНК I, а ДНК II осталась незамеченной [31].

Авторы благодарят А. В. Лихтенштейна за инициативу в проведении исследования и ценные советы.

#### Резюме

Методом НПЦ-хроматографии досліджено розподіл нуклеопротейдів різної міцності в ізольованих ядрах та ядерному матриксу. У препаратах матриксу, одержаних обробкою ядер ДНКазою I, виявлено стійкий до солі-сечовини (ДНК II) та нестійкий (ДНК I) зв'язки ДНК — матрикс і фракція залишкового хроматину. Всі зв'язки стійкі до дії меркаптоетанолу, ЕДТА та низької іонної сили. ДНК II чутлива до дії нуклеази  $S_1$ , для її зруйнування необхідне плавлення молекули ДНК. Рестриктази викликають деградацію ДНК II з різною ефективністю: ті, що пізнають тетра nukлеотид, сильніше від атакуючих гексануклеотид, серед останніх *EcoRI*, *PstI*, *PvuII* більш ефективні, ніж *HindIII*, *SalGI*, *BamHI*. По сумі властивостей ДНК I та ДНК II не відповідають зв'язкам ДНК — матрикс, що виявлено другими методами.

#### Summary

Distribution of the nucleoproteins, of different tightness has been studied in isolated nuclei and in the nuclear matrix by means of the NPC chromatography. A salt-urea resistant (DNAII) and sensitive (DNAI) DNA-matrix bonds and a fraction of residual chromatin have been detected in the matrix preparations obtained from DNaseI treated

nuclei. All bonds are resistant to the action of mercaptoethanol, EDTA and low ionic strength. DNAlI is sensitive to nuclease S1, the DNA melting is necessary for its destruction. Restrictases cause the DNAlI degradation with unequal effectivity: the four base cutters are more effective as compared to the six base cutters. Among the latter *EcoRI*, *PstI* and *PvuII* degrade the bond to a greater degree than *HindIII*, *SalGI*, *BamHI*. The totality of the DNAl and DNAlI features indicate that these bonds do not correspond to differing types of the DNA-matrix bindings revealed by other methods.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глазков М. В. Нуклеониды клеток печени крысы: седиментационный и флуоресцентный анализы; ДНК, ассоциированная с остаточными ядерными структурами // Молекуляр. биология.— 1986.— 20, № 6.— С. 1682—1691.
2. Идентификация прочного комплекса ДНК—матрикс (тип II) как места нахождения репликативной вилки / М. М. Забойкин, В. И. Монсеев, В. С. Шапог, А. В. Лихтенштейн // Там же.— 1988.— 22, № 4.— С. 1119—1126.
3. Bodnar J. W. A domain model for eukaryotic DNA organization: a molecular basis for cell differentiation and chromosome evolution // J. Theor. Biol.— 1988.— 132, N 4.— P. 479—507.
4. Characterization of DNA pattern in the site of permanent attachment to the nuclear matrix located in the vicinity of replication origin / A. G. Kalandadze, S. A. Bushara, E. S. Vassetzky, Jr., S. V. Razin // Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1990.— 168, N 1.— P. 9—15.
5. Marilley M., Gassend-Bonnet G. Supercoiled loop organization of genomic DNA: a close relationship between loop domains, expression units, and replicon organization in rDNA from *Xenopus laevis* // Exp. Cell Res.— 1989.— 180, N 4.— P. 475—489.
6. The distribution of tightly bound proteins along the DNA chain reflects the type of cell differentiation / S. V. Razin, V. V. Chernokhvostov, E. S. Vassetzky, Jr. et al. // Nucl. Acids Res.— 1988.— 16, N 9.— P. 3617—3633.
7. A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity / A. Stief, D. Winter, W. H. Strätling, A. Sippel // Nature.— 1989.— 341, N 6240.— P. 343—345.
8. Izaurralde E., Mirkovitch J., Laemmli U. K. Interaction of DNA with nuclear scaffolds *in vitro* // J. Mol. Biol.— 1988.— 200, N 1.— P. 111—125.
9. Глазков М. В. Структурно-функциональная организация ДНК в интерфазном ядре. Структурный аспект // Молекуляр. биология.— 1988.— 22, № 1.— С. 16—30.
10. Сьякте Н. И. Роль разрывов ДНК в регуляции процессов клеточной пролиферации, дифференцировки и старения // Онтогенез.— 1987.— 18, № 3.— С. 229—238.
11. Сьякте Н. И. Взаимодействия различных групп белков ядерного матрикса с ДНК // Биохимия.— 1988.— 53, № 2.— С. 256—262.
12. Сьякте Н. И., Блохин Д. Ю. Белковый состав комплексов ДНК—матрикс с «прочным» и «слабым» типом связи, выделенных из клеток асцитной карциномы Эрлиха // Там же.— 1989.— 54, № 7.— С. 1217—1223.
13. Анализ клеточных нуклеопротеидов методом нуклеопротеид-целит-хроматографии. III. Два типа взаимодействий ДНК с ядерным матриксом / Н. И. Сьякте, М. М. Забойкин, Е. А. Эренпрейса и др. // Молекуляр. биология.— 1985.— 13, № 5.— С. 1231—1241.
14. Забойкин М. М., Алексина Р. П., Лихтенштейн А. В. Сравнительный анализ субдоменных фрагментов хроматина // Там же.— 1989.— 23, № 3.— С. 851—861.
15. Сьякте Н. И., Бубовлин А. Б. Прочность ДНК-белковых взаимодействий в различающихся по чувствительности к нуклеазам фракциях хроматина // Молекуляр. генетика.— 1988.— № 10.— С. 30—34.
16. Jarman A. P., Higgs D. R. Nuclear scaffold attachment sites in the human globin gene complexes // EMBO J.— 1988.— 7, N 11.— P. 3337—3344.
17. Pauli U., Kuenzler P., Braun R. Unusual nucleoprotein structures in the vicinity of the replication origins of the extrachromosomal rDNA of the slime mold *Physarum polycephalum* // Biochem. and Cell. Biol.— 1983.— 66, N 9.— P. 935—941.
18. Hierarchical binding of DNA fragments derived from scaffold-attached regions: correlation of properties *in vitro* and function *in vivo* / Ch. Mielke, Y. Kohwi, T. Kohwi-Shigematsu, J. Bode // Biochemistry.— 1990.— 29, N 32.— P. 7475—7485.
19. Kas. E., Izaurralde E., Laemmli U. Specific inhibition of DNA binding to nuclear scaffolds and histone H1 by distamycin. The role of oligo(dA)·oligo(dT) tracts // J. Mol. Biol.— 1989.— 210, N 3.— P. 587—599.
20. Greenstein R. Constitutive attachment of murine erythroleukemia cell histone-depleted DNA loops to nuclear scaffolding is found in the  $\beta$ -major but not the  $\alpha$ 1-globin gene // DNA.— 1988.— 7, N 9.— P. 601—607.
21. Tsutsui K., Tsutsui K., Muller M. T. The nuclear scaffold exhibits DNA-binding sites selective for supercoiled DNA // J. Biol. Chem.— 1988.— 263, N 15.— P. 7235—7241.
22. Homberger H. P. Bent DNA is a structural feature of scaffold-attached regions in *Drosophila melanogaster* interphase nuclei // Chromosoma.— 1989.— 98, N 2.— P. 99—104.

23. *Yeast ARS function and nuclear matrix association coincide in a short sequence from the human HPRT locus*/R. C. Sykes, D. Lin, S. G. Huang et al.// *Mol. and Gen. Genet.*—1988.—212, N 2.—P. 301—309.
24. *Сьяксте Н. И., Будылин А. В.* Изменение взаимодействий ДНК с белками ядерного матрикса при переваривании ядер рестриктазами и нуклеазой *Bal31*// *Биохимия.*—1988.—53, № 1.—С. 54—60.
25. *Сьяксте Н. И., Будылин А. В.* Распределение ДНК во фракциях, различающихся по прочности ассоциации с ядерным матриксом при активации ДНК-эндонуклеаз клеточных ядер и действию  $S_1$ -нуклеазы// *Молекуляр. генетика.*—1990.—№ 7.—С. 21—24.
26. *Jackson D. A., Dickinson P., Cook P. R.* Attachment of DNA to the nucleoskeleton of *HeLa* cells examined using physiological conditions// *Nucl. Acids Res.*—1990.—18, N 15.—P. 4385—4393.
27. *Werner D., Neuer-Nitsche B.* Site-specific location of covalent DNA-polypeptide complexes in the chicken genome// *Ibid.*—1989.—17, N 15.—P. 6005—6015.
28. *Сьяксте Н. И., Сьяксте Т. Г.* Гетерогенность по прочности связи с ДНК белков, устойчивых к депротенинизации// *Бюл. эксперим. биологии и медицины.*—1990.—110, № 8.—С. 194—196.
29. *Sjakste N. I., Budylin A. V., Sjakste T. G.* Disconnection of DNA domains in quiescent and differentiating cells// *Nuclear structure and function.*—New York, 1990.—P. 365—369.
30. *Identification of a rosette-enriched chromatin fraction from mouse fibroblast nuclei*/C. A. Ascoli, M. R. Link, N. Ventura et al.// *Arch. Biochem. and Biophys.*—1988.—263, N 2.—P. 334—348.
31. *Isolation and characterization of stable nuclear matrix preparations and associated DNA from avian erythroblasts*/J. Rzeszowska-Wolny, S. Razin, E. Puvion et al.// *Biol. Cell.*—1988.—64.—P. 13—222.

Ин-т орг. синтеза Латв. АН, Рига

Получено 04.02.91

УДК 581.134.4:633.362

**А. Ю. Козловский, Ю. В. Пацковский**

## **ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ СЕМЯН ЯЗВЕННИКА МНОГОЛИСТНОГО**

*В работе проведено изучение полиморфизма солерастворимых запасных белков семян нескольких популяций язвенника многолистного. Методом электрофореза денатурированных белков в ПААГ с 0,1% Ds-Na определена молекулярная масса (м. м.) основных фракций солерастворимых белков (от 15 000 до 100 000). Выявлено, что наряду с константными областями белкового спектра (белка с м. м. ( $\cdot 10^3$ ) 15—50 и 70—90) обнаруживаются варибельные области, каждая из которых представлена одним или двумя белками с м. м. ( $\cdot 10^3$ ) 93—96, 63—66, 53—55. Показано, что помимо появления белков с несколько измененной молекулярной массой в варибельных областях изменяется соотношение белка в двух отдельных фракциях, причем взаимозависимо, так что относительное количество белка варибельной зоны остается постоянным у всех изученных вариантов. Обсуждается возможный механизм регуляции биосинтеза запасных белков растений.*

**Введение.** В решении вопросов рационального использования ресурсов растительного мира важное место принадлежит бобовым растениям. Весьма перспективным видом для Полесья УССР является язвенник многолистный, обладающий, как и другие бобовые, высокой продуктивностью, способный произрастать на бедных почвах благодаря симбиотической азотфиксации, неприхотливый к изменениям природных условий, содержащий значительное количество незаменимых аминокислот и имеющий ряд других практически ценных признаков [1, 2].

Несмотря на это, данный вид комплексно не изучался и многие его особенности оставались вне поля зрения исследователей. Учитывая вышеизложенное, мы решили провести более детальное и систематическое исследование язвенника многолистного в генетическом и биохимическом аспектах.

Для повышения эффективности селекции необходимо оценить уровень видового полиморфизма. Одним из подходов для этого является

© А. Ю. КОЗЛОВСКИЙ, Ю. В. ПАЦКОВСКИЙ, 1991