

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
УРАЛЬСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени первого Президента России Б. Н. Ельцина
ИНСТИТУТ ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

Департамент «БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ»
Кафедра физиологии и биохимии растений

Characterization of crop varieties by seed storage protein electrophoresis

(Характеристика сортов
сельскохозяйственных культур методом
электрофореза запасных белков семян)

Выполнила: Борцова Светлана,
Магистрант 1 года

Запасные белки семян

o - белки, в больших количествах накапливающиеся в белковых тельцах внутри семян. Служат источником аминокислот в процессе прорастания семени.

Для биотехнологии представляют интерес:

1. Как основной источник пищевого белка для человека и животных;
2. Как модель системы экспрессии.

Типы белков семян

Наиболее удобную и распространенную классификацию белков семян, основанную на их различной растворимости, предложил Т.Б. Осборн.

Выделяют 4 типа белков:

- а) **альбумины**, водорастворимые и включающие в себя в основном белки-ферменты;
- б) **глобулины**, растворимые в разнообразных растворах солей и присутствующие в мембран-связанных белковых телах, т.е. это запасные белки в строгом смысле этого слова;
- в) **проламины**, растворимые в водно-спиртовых растворах и также являющиеся истинно-запасными белками;
- г) **глутеины**, растворимые в кислых или щелочных растворах и являющиеся в основном структурными или запасными белками, хотя некоторые из них могут иметь метаболические функции

Биохимические маркеры – белковые маркеры

- Запасные белки;

Проламины – простые запасные белки, содержащиеся лишь в семенах злаков: *глиадин* – в пшенице, ржи, *зеин* – в кукурузе, *гордеин* – в ячмене, *авенин* – в овсе, *оризин* – в рисе. Растворимы в 60 - 80% этиловом спирте; содержат свыше 40% остатков глутаминовой кислоты и около 15% пролина, но очень мало лизина (с чем связана биологическая неполноценность запасных белков зерновых культур). Они гетерогенны: с помощью электрофореза их удаётся разделить на компоненты, близкие по аминокислотному составу, но различающиеся по молекулярной массе и электрическому заряду (например у пшеницы разделяется на 15—30 компонентов с молекулярной массой от 81 000 до 78 000). В зерне пшеницы глиадин и глутенин образуют клейковину, от содержания и физических свойств которой зависят хлебопекарные качества пшеницы.

Хлебопекарные качества зерна



0 Проламины делятся на две группы: серосодержащие (S-богатые) и серо-несодержащие (S-бедные). Все эти белки кодируются семействами родственных генов, имеющих общего предшественника. Часто к П. относят также родственные им белки-глутенины (глутелины, или HMW). Все эти группы белков различаются по аминокислотному составу, содержат много остатков глутамина и пролина, мало остатков основных аминокислот

**СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ
В ПРОЛАМИНАХ (% от мол. м. белка)**

Аминокислотные остатки	Типы проламинов		
	S-богатые	S-бедные	HMW
Глутамин	32-42	38-53	30-39
Пролин	15-24	20-32	12-17
Цистеин и метионин	2,4-3,6	0,0-0,2	0,5-1,9
Глицин	1,5-3,3	0,4-1,2	14-20
Фенилаланин	3,7-5,6	7,4-9,3	0,3-1,8
Лизин	0,2-0,8	0,0-0,5	0,2-1,3

- Методы изучения должны основываться на изучении семян, а результаты анализов не должны зависеть от условий выращивания растений, режимов и сроков хранения.
- Широко применяется метод генетических маркеров. Основой для этого метода стал "метод сигналей", разработанный А. С. Серебровским

В 20-х гг. прошлого века Александром Сергеевичем Серебровским был разработан **МЕТОД СИГНАЛЕЙ**, смысл которого заключается в следующем:

Если имеются четкие удобные для менделистских наблюдений альтернативные гены с известной хромосомной локализацией, то они позволяют следить за наследованием того участка хромосомы, в котором эти сигнальные гены расположены. Так как на данном участке хромосомы могут находиться некоторые из генов, участвующих в определении какого-то другого признака, подвергаемого анализу, при помощи сигнальных генов появляется возможность следить за их наследованием.

Этот метод основан на сцеплении генов и был разработан для генов, контролирующих морфологические признаки.

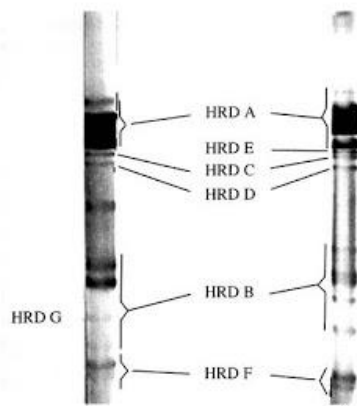
С открытием генетического полиморфизма белков и ДНК появилась возможность на качественно новом уровне использовать метод сигналей. Сейчас «сигналы» называются **ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МАРКЕРАМИ**.

Примеры применения белковых маркеров



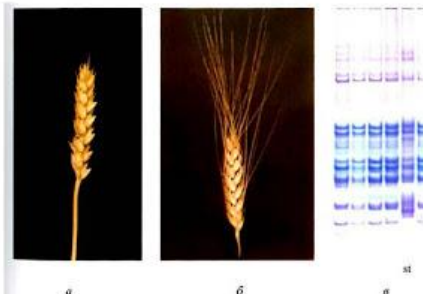
- Идентификация генотипов (пшеница, ячмень, кукуруза, сорго, горох);
- Идентификация сортов в семеноводстве (ячмень, кукуруза);
- Оценка генетического разнообразия;
- Установлена связь между аллельным состоянием локусов глина и количественными признаками пшеницы – зимостойкость, качество зерна, засухоустойчивость, продуктивность;
- У ячменя установлена связь между локусами гордеинов и морозостойкости.

Примеры биохимических маркеров



Генетический контроль электрофоретических компонентов гордеинов осуществляется 7 сцепленными локусами *HrdA*, *HrdB*, *HrdC*, *HrdD*, *HrdE*, *HrdF*, *HrdG*, локализованными в коротком плече хромосомы 5 ячменя.

Примеры биохимических маркеров



Глиадины – достаточно полиморфны, в электрофоретическом спектре насчитывается от 20 до 40 компонентов. Гены, контролирующие их, локализованы в коротких плечах хромосом первой и шестой гомеологичных групп.

0 Законом "О семеноводстве" для определения сортовых качеств семян сельскохозяйственных растений наряду с апробацией и грунтовым контролем предусмотрено введение лабораторного сортового контроля элитных и репродукционных семян, поступающих в оборот. Для этого необходимо иметь достаточно быстрые и дешевые методы, использующие в анализе семена, а не растения, и неопирающиеся на описание морфологии.

0 К ним относятся, прежде всего, **электрофоретические методы анализа белков семян.**

0 С использованием различных методов электрофореза показано наличие генетически обусловленного полиморфизма многих белков семян, во много раз превышающего разнообразие по морфологическим признакам. Это навело на мысль о возможности использования таких белковых систем для дифференциации сортов и определения сортовой чистоты семян.

У ячменя для идентификации сортов все большее распространение получают различные методы электрофореза спирторастворимых белков зерна
- гордеинов

Это обусловлено следующими причинами:

- - гордеины чрезвычайно полиморфны и их электрофоретические спектры высоко сортоспецифичны;
- - электрофореграммы гордеинов стабильны и не зависят от условий выращивания, длительности и условий хранения семян;
- - доля гордеинов в суммарном белке зерна может достигать 50% и они легко выделяются;
- - некоторые существующие методики электрофореза гордеинов пригодны для массовых анализов;
- - генетический контроль гордеинов хорошо изучен.

○ При электрофорезе в кислой среде на крахмальном или полиакриламидном геле **глиадины** делятся по подвижности на а-, b-, g- и w-группы, каждая из которых включает неск. белков. **Гордеины** делятся на С и В группы. Причем малоподвижные белки группы В-это S-бедные проламины. **Глютенины** при обычных условиях электрофореза остаются на старте. При двухмерном электрофорезе глиадинов выделено более 50 компонентов, причем разные сорта пшеницы существенно различаются по составу белков, относящихся к проламинам.

o Важнейшей частью метода анализа гордеинов для целей определения сортовой чистоты и подлинности семян являются способы интерпретации результатов. Здесь существует два подхода. Первый - "биохимический", основанный лишь на учете количества электрофоретических компонентов белков и определении их относительной электрофоретической подвижности в сравнении с каким-либо эталоном. Второй подход основан на знании наследования и генетического контроля белков. С использованием генетического подхода созданы каталоги вариантов гордеинов для сотен сортов мировой коллекции, позволяющий записывать электрофореграммы гордеинов в виде генетических формул. Однако современные сорта ячменя, выращиваемые на территории Российской Федерации оказываются практически не исследованными по гордеинам. Из-за того, что используются разные методики, часто происходит недопонимание и дискредитация метода электрофореза

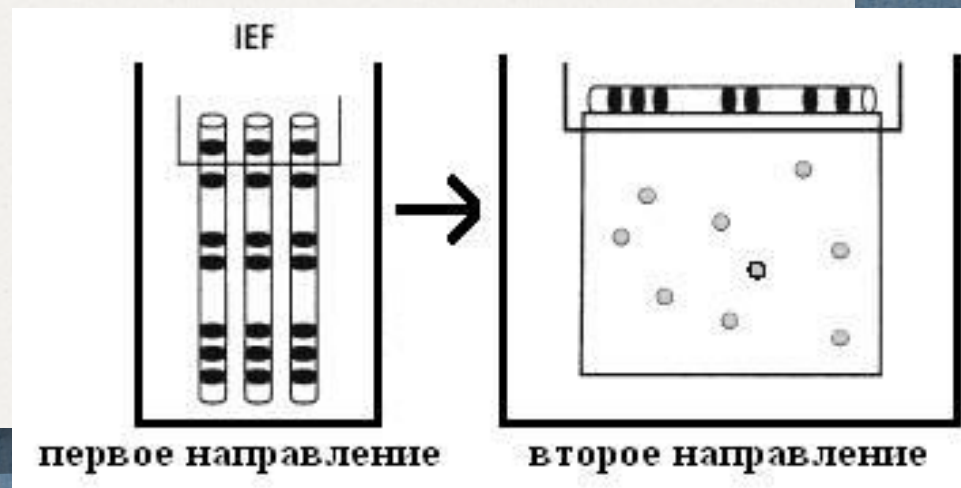
Электрофорез в ПААГ

- В присутствии ионного детергента додецилсульфата натрия – (в денатурирующих условиях) ДДС-Na-ПААГ электрофорез
- Двумерный электрофорез (2D электрофорез)

- **Двумерный электрофорез** (2DE – two dimensional electrophoresis) представляет собой метод разделения смеси белков, основанный на последовательном использовании двух свойств белков: заряда и массы. Использование таких не связанных между собой свойств белков необходимо, чтобы разделение смеси белков было максимальным.
- Во время проведения первого направления (еще называемого изоэлектрофокусированием, IEF) разделение белков основано на таком их свойстве, как изоэлектрическая точка (pI – isoelectric point). Изоэлектрическая точка определяется аминокислотным составом белка, и меняется при посттрансляционных модификациях. Когда белок попадает в гель с градиентом pH , к которому приложено электрическое поле, он начинает двигаться к электроду с противоположным зарядом: положительно заряженные белки перемещаются к катоду (отрицательно заряженный электрод), а отрицательно заряженные к аноду (положительно заряженный электрод). Во время миграции белок присоединяет или теряет протоны, в результате чего его заряд и подвижность снижается, и становится нулевой при достижении точки в градиенте pH , равной его pI . В этой точке он считается «сфокусированным», а на геле он выглядит как четко очерченное пятно. С помощью 2DE возможно разделить белки с очень близкими pI .

0 Далее гель, полученный в ходе изоэлектрофокусирования кладут горизонтально на вершину полимеризованного между двумя стеклами геля, и начинается второе направление, в ходе которого разделение основано на массе белков (рис. 1).

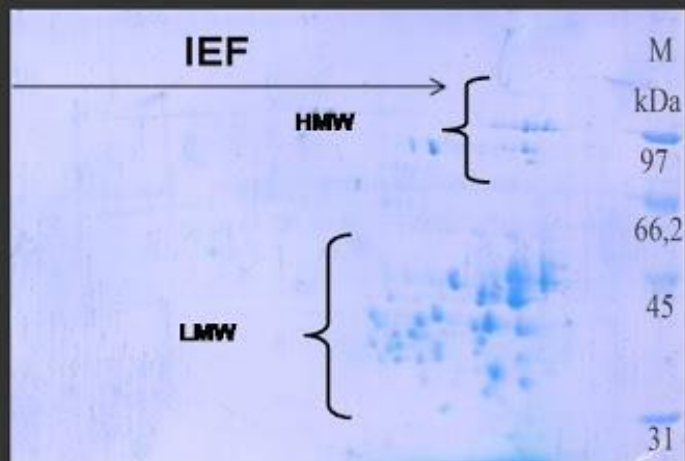
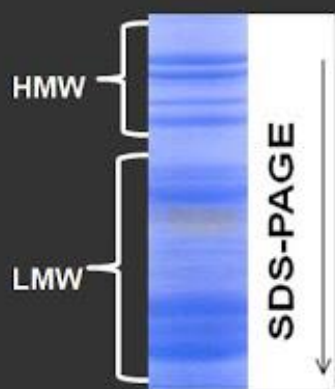
0 В результате белки представлены на электрофореграмме в виде пятен, идентификация конкретных белков проводится с помощью масс-спектрометрии.



0 Анализ гелей, полученных в результате 2DE, более сложный по сравнению с анализом гелей, полученных в ходе 1DE из-за большего количества выделенных белков. Но это же является и значительным преимуществом 2DE по сравнению с одномерным электрофорезом: одновременно можно анализировать несколько белков, которые совместно экспрессируются в ходе изучаемого биологического процесса.

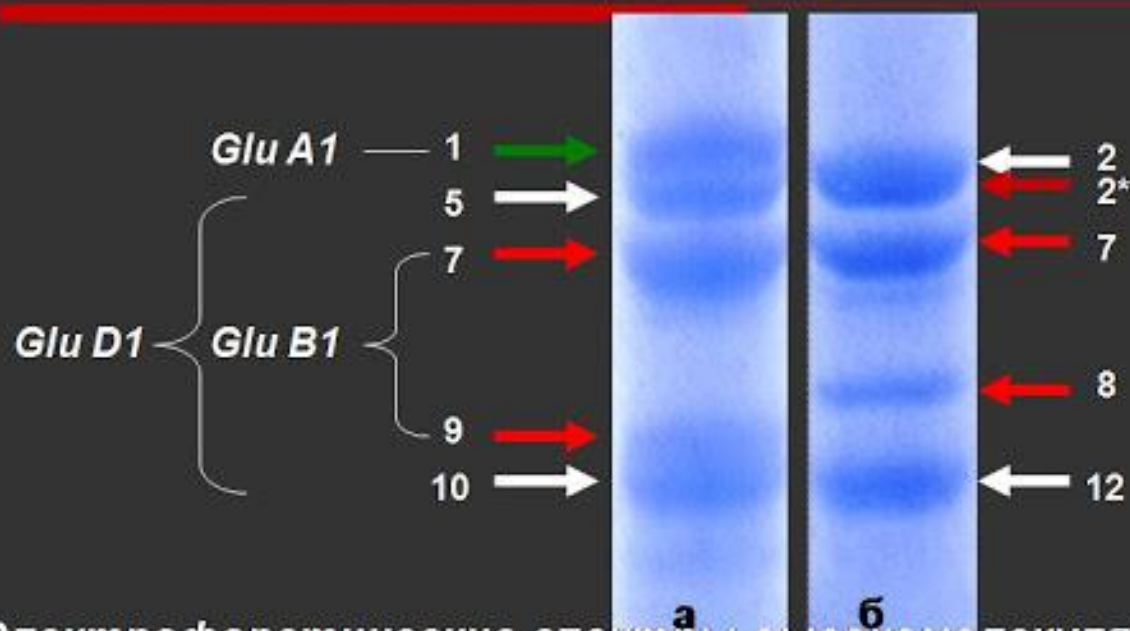
sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Идентификации глютелинов с помощью 2D-PAGE



Сравнение результатов одномерного и двумерного фрезозов запасных белков семени

Определение субъединиц HMW-GS с помощью SDS-PAGE белков



Электрофоретические спектры высокомолекулярных глютенинов: а – Мироновская 808; б – Новосибирская 67.