

<https://doi.org/10.3176/biol.1984.1.08>

Владимир ТАЛИ

УДК 633.3 : 547.963 : 577.1

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ВЫДЕЛЕННЫХ ЭЛЕКТРОФОРЕЗОМ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ СЕМЯН БОБОВЫХ

Аминокислотный анализ может быть с успехом использован для характеристики отдельных участков белкового спектра при селекции зернобобовых на качество белка, так как селекция должна идти не на суммарные аналитические показатели, как это обычно делалось до сих пор, а на конкретный вид белка или определенную группу белковых компонентов (Конарев, 1973, 1975). Этот принцип селекции на белок требует четкого представления о его компонентах как о генетических белковых признаках растения.

Анализ солерастворимых белков семян бобовых показал, что электрофоретический спектр одного и того же вида является суммой характерных для данного вида участков спектра, представленных, как правило, несколькими компонентами с близкой электрофоретической подвижностью, количественное содержание которых у разных сортов данного вида может варьировать. Иногда наблюдаются и качественные изменения, но, как правило, среди минорных компонентов, что может быть следствием трудностей, связанных с их детектированием. Высказано предположение (Оссинов, Попереля, Стаканова, 1974), что такие участки наследуются независимо друг от друга, сохраняя свою специфичность, что свидетельствует о сцепленном наследовании нескольких компонентов и о локализации ответственных за их синтез факторов в близко расположенных локусах хромосом.

Ввиду того, что выделение индивидуальных белков связано с большими трудностями и пока еще в практическом анализе является непосильной задачей, нам кажется уместным при оценке биологической ценности белковых компонентов семян принять за оперативную единицу вышеуказанные характерные для данного вида участки электрофоретического спектра. При делении спектра можно ориентироваться на доминирующие белковые зоны, обозначив участки (отрезки спектра) через относительную электрофоретическую подвижность (ОЭП) доминирующей зоны данного участка. Такой подход даст возможность на основе электрофореза в полиакриламидном геле разделить весь белковый спектр исследуемых семян на более мелкие характерные для данного вида группы белков, которые затем могут подвергаться обычным методам анализа, в том числе и аминокислотному. Данные аминокислотного состава белковых фракций позволят вести отбор сортов и селекционных форм с наиболее выгодным по питательной ценности соотношением белковых фракций.

Для осуществления анализа была разработана методика препаративного выделения белковых фракций электрофорезом в полиакриламидном геле и последующего их аминокислотного анализа тонкослойной хроматографией (ТСХ) (Тали, 1977). Метод ТСХ был выбран из-за малого количества выделяемых белковых фракций, что сильно затруд-

няют их анализ на аминоканализаторе. В качестве примера приведены результаты исследования некоторых сортов гороха посевного и фасоли обыкновенной.

Материал и методика

Исследовали семена полной спелости двух сортов гороха посевного ('Иыгева рохелине' и 'Торсдаг') и двух сортов фасоли обыкновенной ('Грузинская пестрая' и 'Крупная сахарная').

Препараты солеорастворимых белков семян получили по ранее описанной методике (Тали, 1974). Гели полимеризовали в приборе для препаративного электрофореза в виде блока размером 140×150×3 мм, используя систему, принятую в нашей лаборатории (Тали, 1974). Прибор позволяет полимеризовать и использовать для электрофореза одновременно до 10 блоков. Белковый экстракт наносили в количестве 30—40 мг на гель. Время электрофореза — 4 ч, сила тока 50 мА на гель. Электродный буфер — *трис*-глициновый рН 8,3, нижний электрод — анод.

После электрофореза гели помещали на 30 мин в насыщенный раствор сульфата аммония. На поверхности гелей появлялись опалесцирующие зоны белковых компонентов. Гели разрезали на соответствующие белковым зонам полосы. Вырезанные полосы тщательно растирали в ступке и заливали растертый гель пятикратным объемом 2 М раствора мочевины. После настаивания в течение 1 ч взвесь центрифугировали при 8000 об/мин в течение 20 мин. К охлажденному супернатанту добавляли равный объем 40%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и оставляли в холодильнике на ночь. Осажденные белковые компоненты отделяли центрифугированием при 8000 об/мин в течение 25 мин. Осадки промывали дистиллированной водой с целью очистки белка от мочевины. Центрифугирование повторяли, и осадки белков переносили посредством солянокислого раствора (4 см³ 6 М HCl) в ампулы, которые запаивали и помещали для гидролиза в термостат при 110° С на 22 ч. По истечении срока ампулы вскрывали, содержимое фильтровали и освобождали от избытка соляной кислоты. Сухой остаток растворяли в 0,5 см³ 10%-ного раствора изопропанола. Аминокислоты определяли методом ТСХ.

Хроматографировали на пластинках Silufol UV 254 (Чехословакия) — силикагель, нанесенный тонким слоем на алюминиевую фольгу. В качестве закрепителя использован крахмал. Растворитель для хроматографирования: *n*-бутанол, этановая кислота и вода в объемном соотношении 40 : 10 : 50 — два пропускания, и те же компоненты в соотношении 48 : 12 : 20 — тоже два пропускания. Для обнаружения пятен аминокислот на хроматограммах перед последним пропусканием к хроматографическому растворителю *n*-бутанол — этановая кислота — вода (48 : 12 : 20), к которому было добавлено 0,05 г этаната кадмия, прибавляли 10 см³ 0,4 М раствора нингидрина. Хроматограмму нагревали при 80° в течение 10 мин. Стандартную смесь 17 аминокислот готовили растворением препаратов аминокислот в 10%-ном растворе изопропанола.

Пробы наносили на пластинку по 0,5 мкл на расстоянии 15 мм от нижнего края пластинки. На одну пластинку помещали 8 стандартных проб и три пробы гидролизата исследуемых белков. После нанесения образцов пластинку высушивали в потоке воздуха и помещали в хроматографическую камеру. Дно камеры заливали слоем растворителя в 0,5 см. Хроматографировали без предварительного насыщения камеры. Когда растворитель доходил до верхнего края пластинок, их вынимали, сушили в потоке холодного воздуха до испарения раство-

рителя. Хроматографическое пропускание растворителя повторяли два раза с первым растворителем и два раза со вторым, но перед вторым пропусканием добавляли проявитель. Каждый раз между пропусканиями растворителя пластинки тщательно высушивали. После последнего пропускания для развития окраски пятен пластинки прогревали при температуре 100° в течение 10 мин.

Для количественного определения аминокислот диаметры пятен измеряли измерительной лупой (цена деления 0,1 мм) перпендикулярно направлению распределения аминокислот. Калибровочные графики строились по данным, полученным хроматографированием смесей аминокислот, содержащих 0,10, 0,25, 0,50 и 0,75 мкг каждой аминокислоты в 0,5 мкл раствора. Воспроизводимость метода $\pm 6\%$.

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 представлены данные об аминокислотном составе выделенных белковых фракций семян двух сортов гороха посевного ('Йыгева рохелине' и 'Торсдаг'). По аминокислотному составу электрофоретические компоненты солерастворимых белков семян сортов гороха посевного значительно различаются. Высоким содержанием фенилаланина, тирозина и гистидина выделяется фракция 4, но содержание аспарагиновой и глутаминовой кислот в ней сравнительно низкое. Содержание серусодержащих аминокислот оказалось высоким во фракциях 3, 5 и 6. Много серина содержали фракции 2, 5 и 6.

Между аминокислотным составом идентичных фракций наблюдаются отчетливые сортовые различия. Это относится в первую очередь к лизину, содержание которого во фракции 2 семян сорта 'Йыгева рохелине' составляло 13,9%, в то время как у сорта 'Торсдаг' оно было лишь 2,5%. Почти наполовину меньше лизина у сорта 'Торсдаг' и во фракциях 1 и 3. Наблюдаются значительные сортовые различия также и в содержании аргинина во фракциях 1 и 4, треонина во фракциях 5

Таблица 1

Аминокислотный состав белковых фракций семян гороха посевного (общее содержание определенных аминокислот, среднее трех определений, %)

Аминокислоты	Белковые фракции												
	1-ОЭП		2-ОЭП		3-ОЭП		4-ОЭП		5-ОЭП		6-ОЭП		
	И	Т	И	Т	И	Т	И	Т	И	Т	И	Т	
Лей+													
Илей	18,7	19,1	16,1	18,7	18,9	23,3	15,6	13,3	15,8	15,5	15,4	14,5	
Фен	5,3	4,4	4,0	3,9	9,3	2,9	17,0	14,8	6,9	7,8	8,4	7,3	
Вал	3,1	3,1	3,1	4,3	4,4	2,6	3,9	4,4	4,8	5,3	5,4	5,1	
Мет	0,3	0,4	0,3	0,9	2,7	3,8	2,9	1,5	2,1	0,6	0,7	1,1	
Тир	1,7	1,3	1,3	1,8	1,6	1,5	9,9	7,4	3,1	3,4	3,4	3,2	
Ала	2,3	2,6	3,3	3,2	3,3	2,6	1,6	3,0	3,8	3,4	2,7	3,2	
Тре	2,0	2,2	2,4	2,6	1,9	2,0	4,1	4,4	2,8	4,4	4,7	8,8	
Глу	21,1	20,2	14,1	18,2	18,9	27,4	3,9	5,4	18,9	16,2	15,1	14,2	
Гли	3,3	3,5	8,0	3,6	1,6	0,9	4,1	3,0	3,1	3,4	3,4	3,2	
Сер	2,8	2,6	6,4	8,2	1,4	0,6	2,9	4,4	6,9	6,8	8,4	7,7	
Асп	17,3	18,3	15,9	19,4	15,3	17,5	10,0	8,9	12,4	12,1	12,1	11,4	
Арг	7,8	13,7	9,7	11,9	10,4	8,5	8,6	16,3	7,6	7,8	8,4	7,9	
Гис	3,4	2,8	1,4	0,5	2,2	2,3	5,7	5,9	2,1	3,1	2,0	3,2	
Лиз	10,8	6,0	13,9	2,5	7,1	3,5	10,0	7,4	8,3	8,7	6,7	6,3	
Цис	—	—	0,2	0,3	1,1	0,6	—	—	1,7	1,6	3,4	3,2	

Примечание. И — 'Йыгева рохелине', Т — 'Торсдаг'.

и 6, аланина во фракции 4, метионина во фракции 5 и серина, глутаминовой кислоты, цистина и фенилаланина во фракции 3 (табл. 1).

У обоих сортов по аминокислотному составу наименее сбалансированными оказались фракции 1 и 2 (табл. 2), где первыми лимитирующими аминокислотами были цистин и метионин, а второй и третьей — треонин и валин. При этом содержание лейцина и изолейцина более чем в три раза превышает норму, предусмотренную Организацией питания и земледелия ООН (ФАО). Хорошо сбалансированы фракции 5 и 6, но содержание их в общем экстракте семян низкое. Содержание серусодержащих аминокислот во фракциях 3, 5 и 6 соответствует норме или даже превышает ее. Содержание лизина превышает норму во всех фракциях за исключением 2 и 3 у сорта 'Торсдаг'.

В табл. 3 представлены данные по аминокислотному составу белковых фракций семян сортов фасоли обыкновенной ('Грузинская пестрая' и 'Крупная сахарная'). По этим данным видно, что аминокислотный состав электрофоретических белковых фракций семян фасоли различен. В отдельных фракциях незначительно изменяется содержание тирозина, аланина, глутаминовой кислоты, глицина и фенилаланина. Метионина весьма много во фракции 2, во фракциях же 4, 5 и 8 он полностью отсутствует. Большое количество треонина во фракции 1, в то время как во фракции 5 его в четыре раза меньше. Содержание серина особенно высоко во фракции 4, в остальных фракциях его почти наполовину меньше. Аспарагина особенно много во фракциях 6, 7 и 8, мало во фракции 2. Исключительно богата аргинином фракция 5. Содержание аргинина больше во фракции 5 и меньше во фракции 4. Лизина много во фракциях 2 и 3. Цистина относительно много во фракции 6, в то время как во фракциях 4, 5 и 8 он полностью отсутствует.

Сортовые различия в аминокислотном составе идентичных белковых фракций у сортов фасоли не столь значительны, как у семян сортов гороха посевного. Но некоторые различия имеются и здесь, особенно в количестве серусодержащих аминокислот.

Наиболее сбалансирован аминокислотный состав фракции 6 (табл. 4) у сорта 'Крупная сахарная', где только немного недостает треонина, а содержание всех остальных незаменимых аминокислот превышает норму ФАО. У сорта 'Грузинская пестрая' не доходит до нормы и количество серусодержащих аминокислот. В остальных фракциях первые лимитирующие аминокислоты — метионин и цистин, во фрак-

Таблица 2

Скоры незаменимых аминокислот белковых фракций семян гороха посевного, определенные методом ФАО

Аминокислоты	Белковые фракции											
	1-ОЭП 0,05		2-ОЭП 0,16		3-ОЭП 0,37		4-ОЭП 0,45		5-ОЭП 0,70		6-ОЭП 1,00	
	И	Т	И	Т	И	Т	И	Т	И	Т	И	Т
Лиз	196	109	253	45	129	64	182	135	151	158	122	115
Тре	50	55	60	65	48	50	103	110	70	110	118	220
Цис+												
Мет	9	11	14	34	109	126	83	43	109	91	117	123
Вал	62	62	62	86	88	52	78	88	96	106	108	102
Лей+												
Илей	336	344	290	336	349	419	281	239	284	279	277	261
Тир+												
Фен	117	95	88	95	182	73	448	370	167	187	197	175

Примечание. И — 'Пыгева рохелине', Т — 'Торсдаг'.

Аминокислотный состав белковых фракций семян фасоли обыкновенной (общее содержание определенных аминокислот, среднее трех определений, %))

Аминокислоты	Белковые фракции															
	1-ОЭП ГП	0,05 КС	2-ОЭП ГП	0,15 КС	3-ОЭП ГП	0,31 КС	4-ОЭП ГП	0,44 КС	5-ОЭП ГП	0,51 КС	6-ОЭП ГП	0,65 КС	7-ОЭП ГП	0,75 КС	8-ОЭП ГП	1,00 КС
Лей+Илей	10,2	11,0	11,6	11,4	13,5	12,2	10,2	10,1	13,3	12,8	13,0	12,4	13,4	12,5	13,7	14,1
Фен	6,4	5,2	6,2	5,5	7,0	6,7	5,2	5,2	3,9	4,3	4,5	5,6	5,6	5,9	5,7	5,6
Вал	6,4	6,6	5,4	5,7	5,3	4,9	6,5	6,3	3,2	2,9	5,4	5,1	5,9	5,2	6,0	5,8
Мет	0,5	0,8	1,3	1,6	0,9	1,0	—	—	—	—	0,6	1,4	0,8	1,0	—	—
Тир	1,8	1,9	2,6	2,3	3,1	3,1	2,6	2,8	—	2,7	2,5	2,5	2,8	2,8	—	2,5
Ала	4,6	5,2	4,6	4,6	3,1	3,1	3,7	3,5	3,2	3,2	3,4	3,4	3,3	3,5	3,4	3,8
Тре	8,4	8,1	4,4	5,5	3,5	3,3	6,0	6,3	2,1	2,1	3,4	2,8	3,9	3,8	4,0	4,3
Глу	18,4	17,6	18,3	18,5	19,7	22,0	19,1	17,5	15,7	16,0	15,8	15,2	15,6	13,2	16,0	15,7
Сер	7,4	7,3	5,7	5,7	7,7	7,4	10,5	11,2	6,3	6,1	5,7	6,5	5,6	4,8	5,7	5,8
Асп	11,5	12,0	9,8	9,3	10,6	10,2	14,1	14,3	12,2	12,3	22,6	22,5	20,9	21,8	20,5	20,0
Арг	6,4	6,9	10,8	10,5	8,8	8,4	7,9	8,4	20,9	20,0	7,3	5,6	7,8	10,4	8,0	8,1
Гис	4,4	4,2	3,9	4,1	3,7	3,3	2,6	2,1	8,7	9,3	4,5	5,6	4,5	4,2	4,6	4,6
Лиз	8,9	8,3	10,8	10,3	8,4	8,2	6,3	6,3	5,2	5,3	5,7	5,6	6,1	5,9	6,3	6,3
Цис	1,0	0,8	0,5	1,1	0,9	2,0	—	—	—	—	2,3	3,1	0,6	1,7	—	—

Примечание. ГП — 'Грузинская пестрая', КС — 'Крупная сахарная'.

Скоры незаменимых аминокислот белковых фракций семян фасоли обыкновенной, определенные методом ФАО

Аминокислоты	Белковые фракции															
	1-ОЭП ГП	0,05 КС	2-ОЭП ГП	0,15 КС	3-ОЭП ГП	0,31 КС	4-ОЭП ГП	0,44 КС	5-ОЭП ГП	0,51 КС	6-ОЭП ГП	0,65 КС	7-ОЭП ГП	0,75 КС	8-ОЭП ГП	1,00 КС
Лиз	162	151	196	187	153	149	115	115	95	96	104	102	111	107	115	115
Тре	210	203	110	138	88	83	150	158	53	53	85	70	98	95	100	108
Цис+Мет	43	46	51	77	51	86	0	0	0	0	83	129	40	77	0	0
Вал	128	132	108	114	106	98	130	126	64	58	108	102	118	104	120	116
Лей+Илей	183	198	209	205	243	219	183	182	239	230	234	223	241	225	246	254
Тир+Фен	137	118	147	130	168	163	130	133	107	117	117	135	140	145	143	135

Примечание. ГП — 'Грузинская пестрая', КС — 'Крупная сахарная'.

циях же 3, 6 и 7 вторая лимитирующая аминокислота — треонин, а во фракции 5 ощущается и недостаток валина.

В доминирующей фракции 3 сбалансированность аминокислотного состава у сорта 'Крупная сахарная' в некоторой мере лучше, чем у сорта 'Грузинская пестрая', что связано с более высоким содержанием цистина у первого из них. Это позволяет надеяться, что при анализе широкого набора сортов удастся выделить те, в семенах которых содержание серусодержащих аминокислот в доминирующей фракции 3 соответствует норме и хорошо сбалансирован аминокислотный состав.

Выводы

По аминокислотному составу электрофоретические компоненты соле-растворимых белков семян гороха посевного значительно различаются. Наиболее сбалансированными по составу незаменимых аминокислот оказались фракции 5 (ОЭП 0,70) и 6 (ОЭП 1,00). Высоким содержанием цистина и метионина отличается фракция 3 (ОЭП 0,37), лимитирующими аминокислотами в ней являются треонин (скор 48...50) и валин (скор 52...88). Между аминокислотным составом идентичных белковых фракций семян гороха наблюдаются отчетливые сортовые различия, что влияет на сбалансированность незаменимых аминокислот и биологическую ценность белковых фракций.

В семенах фасоли обыкновенной также обнаружены различия аминокислотного состава белковых фракций. Наиболее сбалансирован аминокислотный состав фракции 6 (ОЭП 0,65), в остальных фракциях первыми лимитирующими аминокислотами являются серусодержащие аминокислоты. Сортовые различия в аминокислотном составе идентичных фракций у семян фасоли обыкновенной менее выражены, чем у гороха посевного. Сбалансированность аминокислотного состава доминирующей фракции 3 (ОЭП 0,31) у сорта 'Крупная сахарная' лучше, чем у сорта 'Грузинская пестрая'.

Полученные данные о явных различиях в аминокислотном составе электрофоретически выделенных белковых фракций семян и различной сбалансированности их позволяют предположить, что направленной селекцией можно значительно повысить биологическую ценность семян в целом, изменив соотношение фракций в пользу более сбалансированных. Для улучшения сбалансированности аминокислотного состава доминирующих фракций надо вести подбор и селекцию на повышение содержания лимитирующих аминокислот (у гороха посевного во фракции 2 — цистина, метионина, треонина и валина, у фасоли обыкновенной во фракции 3 — цистина и метионина).

ЛИТЕРАТУРА

- Конарев В. Г. Биохимические и молекулярно-генетические предпосылки в селекции растений на белок. — Вестник с.-х. н., 1973, № 1, 96—106.
- Конарев В. Г. Молекулярно-генетические аспекты оценки исходного материала на белок. — Тр. прикл. ботан., генет. и селекции. ВНИИ растениеводства, 1975, 54, 163—172.
- Сосинов А. А., Попереля Ф. А., Стаканова А. И. Использование электрофореза глиадина в селекции пшеницы на качество. — Вестник с.-х. н., 1974, № 7, 99—108.
- Тали В. С. Тонкослойная хроматография аминокислот на пластинках силуфол. — Сб. науч. тр. ЭСХА, 1977, № 119, 63—68.
- Тали В. С. Исследование белков семян бобовых I. Диск-электрофоретическое изучение соле-растворимых белков семян видов трибы *Trifolieae* Вгрупп. — Сб. науч. тр. ЭСХА, 1974, № 80, 75—83.

LIBLIKÕIELISTE SEEMNETE ELEKTROFOREETILISELT ERALDATUD VALGUFRAKTSIOONIDE AMINOHAPPELINE KOOSTIS

Valgufraktsioonid on eraldatud aedherne (sordid 'Jõgeva roheline' ja 'Torsdag') ja aedoa (sordid 'Gruzinskaja pjostraja' ja 'Krupnaja saharnaja') seemnete soolalahuse ekstraktist elektroforeesiga polüakrüülamiidgeelis. Valgufraktsioonide hüdrolüsaatide aminohappeline koostis on määratud kihtkromatograafiliselt.

On täheldatud olulisi erinevusi sama liigi eri sortide seemnete valgufraktsioonide aminohappelises koostises ja asendamatute aminohapete tasakaalustatuses. Täisväärtuslikumateks osutusid aedhernel fraktsioonid R_f 0,70 ja 1,00 ning aedoyal fraktsioon R_f 0,65.

AMINO ACID CONTENT OF ELECTROPHORETICALLY SEPARATED PROTEIN FRACTIONS OF PAPILIONACEOUS SEEDS

Protein fractions were separated by electrophoresis in polyacrylamide gel from the saline solution extract of the seeds of *Pisum sativum* (varieties 'Jõgeva roheline' and 'Torsdag') and *Phaseolus vulgaris* (varieties 'Gruzinskaya pyostraya' and 'Krupnaya saharnaya'). The amino acid content of the protein fraction hydrolysates were determined thin layer-chromatographically.

The separated protein fractions differed from each other in respect to the amino acid content (Tables 1 and 3). Significant differences were also stated in the amino acid content and in the balance of essential amino acids of different varieties within the same species (Tables 2 and 4). The fractions R_f 0.70 and 1.00 of peas and the fraction R_f 0.65 of beans proved to be of the best quality.