بررسی موقعیت پروتئین غیرهیستونی LMG160 در کروماتین هسته سلولهای بافت کبد موش صحرایی

عذرا ربانی چادگانی، حسن آریاپور و سایه عبدالصمدی

مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران

چکیده

پروتئینهای غیر هیستونی دسته وسیعی از پروتئینهای کروماتین می باشند که علاوه بر ناهمگن بودن فعالیتهای مختلفی را در سلول ایفا می نمایند. دسته ای از این پروتئینها ، حرکت الکتروفورزی پایین دارند مورد توجه قرار گرفت، وبه نام پروتئینهای LMG نامگذاری شد. در این مطالعه موقعیت یکی از این پروتئینها بنام LMG160 در اجزاء کروماتین مورد بررسی قرارگرفت. پس از هضم کروماتین با آنزیم میکروکوکال نوکلئاز، بخشهای مختلف کروماتین(S1, S2) تهیه و عدم یا حضور این پروتئین در S1 و S2 با استفاده از روش ژل الکتروفورز و ایمنوبلاتینگ بررسی شد. نتایج نشان داد که پروتئین LMG160 تمایل زیادی به ساختارهای بالاتر کروماتین، دی و الیگونوکلئوزومی دارد، در جز کروماتین واجد منونوکلئوزوم وجود ندارد . این امر می تواند اطلاعاتی را در مورد موقعیت این پروتئین در کروماتین مشخص نماید.

کلید واژه ها: کروماتین، پروتئینهای غیرهیستونی، نوکلئوزوم

مقدمه

در سلولهای یوکاریوت ماده ژنتیکی در اتصال با پروتئینهایی است که مجموعاً یک ترکیب نوکلئوپروتئینی بنام کروماتین را در هسته سلولها ایجاد می نمایند. ترکیب اصلی کروماتین را DNA و پروتئینهای بازی بنام هیستونها تشکیل می دهند که در اتصال با یکدیگر واحدهای ساختاری کروماتین، نوکلئوزومها (nucleosomes)، را می سازند. هر نوکلئوزوم در سلولهای بافت کبدی از ۲۰۰ جفت باز DNA، اکتامر هیستونها (تترامر H3-H4 و دو دایمر H2A- H2B) و هیستون H1 ساخته شده است (۱و۲). هیستونها در واقع اولین پروتئینهای کروماتین هستند که از سلولها و بافتهای مختلف جداسازی و خصوصیات بیوشیمیایی و نحوه اتصال آنها به DNA مطالعه شده است.

پروتئینهای غیر هیستونی (nonhistone proteins) به کلیه پروتئینهای هسته سلول بغیر از هیستونها اتلاق می شود. این پروتئینها از نظر بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بسیار متنوع بوده و دارای نقشهای گوناگونی از قبیل ساختاری، آنزیمی، تنظیمی و غیره می باشند (۲و۳). بر خلاف هیستونها، پروتئینهای غیر هیستونی ویژگی بافتی و گونه ای زیادی از خود نشان می دهند و نقش بسیاری از آنها در تنظیم بیان ژنها بخوبی مشخص شده است .دسته ای از این پروتئینها که در قدرتهای یونی پائین از کروماتین جدا می شود مورد توجه محققین قرار گرفته و تا کنون دو دسته از این پروتئینها جدا سازی شده اند ، پروتئینهای با حرکت الکتروفورزی بالا (HMG; High Mobility Group) و پروتئینهای با حرکت الکتروفورزی پائین (LMG; Low Mobility Group) (۳و٤). پروتئینهای HMG بعلت حلالیت و وزن مولکولی پایین خود بدقت مطالعه شد و امروزه ساختار و نقش آنها در کروماتین خصوصاً تنظیم بیان ژنها شناخته شده است (۵ و ٦).

Archive of SID

www.SID.ir

پروتئینهای غیرهیستونی LMG بعلت حلالیت کم و وزن ملکولی بالا کمترمطالعه شده و اطلاعات محدودی در مورد آنها دردست است. در سال ۱۹۹۰، Wiland وهمکارانش برخی از پروتئینهای LMG را به پنج دسته تقسیم و میانکنش آنها را با هیستونها بررسی نمودند (۷). همچنین نشان داده شده است که برخی از این پزوتئینها با توالیهای خاصی از آنتی ژن 17-1A مانند TATA-box واکنش می دهند (۸) و برخی تغییرات شیمیایی از نوع ADP– ریبوزیلاسیون را طی می نمایند (۹). جزئی از پروتئینهای LMG با وزن مولکولی ۱۶۰ کیلودالتون (LMG160) از بافت کبد موش صحرایی در این آزمایشگاه جدا سازی و برخی از خصوصیات بیوشیمیایی آن مشخص شده است (۱۰و۱۱). در این بررسی موقعیت این پروتئین در هسته سلول در اجزاء مختلف حاصل از هضم آنزیمی کروماتین مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن می تواند اطلاعات مهمی را در مورد موقعیت این پروتئین، درهسته سلول بدست دهد.

مواد و روشها

مواد: کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده از درجه خلوص بالایی بر خوردار بوده و از شرکت مرک یا سیگما خریداری شده اند. آنزیم میکروکوکال نوکلئاز(MNase; micrococcal nuclease)، پروتئیناز k (proteinase k)، فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF)، spermine، spermidin، نشانگر وزن مولکولی از شرکت Sigma و رزین سفادکس از شرکت Pharmacia خریداری شد. موشهای صحرایی Albino Rat مورد استفاده (مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران) دارای وزن تقریبی ۲۵۰ گرم بودند.

روشها

تهیه هسته سلول: از روش Burgoyne و همکارانش (۱۲) با کمی تغییر استفاده شد . پس از بیهوش کردن موش صحرایی، بافت کبد جدا و با سرم فیزیولوژی سرد شسته شد. وزن معینی از بافت (۲۰–۱۵گرم) در پنج برابر محلول سوکروز ۰/۳٤ مولار در بافر A (تریس اسیدی ۱۵ میلی مولار با pH ۷/۵، کلرید سدیم ۱۵ میلی مولار، کلرید پتاسیم ٦۰ میلی مولار، اسپرمین ۰/۱۵ میلی مولار و اسپرمیدین۰/۵ میلی مولار) هموژن نموده (هموژنایزر STi-Model-563c) و محلول بمدت ۲۵ دقیقه در g ٤۰۰۰ در ٤ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید. رسوب حاصل در پنج حجم از محلول فوق حاوی ۰/۱ درصد تریتون ۱۰۰– X هموژن و مطابق فوق مجدداً سانتریفوژ گردید. به رسوب پنج حجم از محلول سوکروز ۲ مولار در بافر A اضافه و پس از هموژن نمودن بر روی حجم مساوی از همان محلول قرار داده شده و بمدت ٤۵ دقیقه در g ۵۰۰۰۰ در ٤ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید. رسوب هسته ها ابتدا دوبار با بافر A شستشو داده شدند و سپس خلوص و سالم بودن آنها با استفاده از رنگ متیل گرین زیر میکروسکوپ بررسی گردید.

هضم آنزیمی هسته ها: ابتدا هسته ها در بافر هضم شامل سوکروز ۰/۲۵ مولار، تریس ۱۰ میلی مولار با pH ۷/۵، کلرید سدیم ۱۵ میلی مولار و کلرید کلسیم یک مولار بحالت سوسپانسیون در آمد و مقدار DNA با استفاده از مقدار جذب در ۲٦۰ نانومتر اندازه گیری شد . نمونه برای مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد و سپس ۵ واحد آنزیم میکروکوکال نوکلئاز بازاء هر میلی لیتر اضافه و مجدداً ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه نگهداری شد. پس از آن نمونه EDTA با غلظت نهایی ۱۰ میلی مولار اضافه و درg ٤۰۰۰ بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی بنام S1 جدا و به رسوب حاصل مجدداً بافر هضم اضافه و پس از به تعادل رساندن در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد، ٤۰ واحد آنزیم به آن اضافه و بمدت ۱۰ دقیقه در همان شرایط نگهداری شد . پس از متوقف نمودن فعالیت آنزیمی با EDTA مانند فوق، نمونه سانتریفوژ (g ٤۰۰۰ بمدت ۱۵ دقیقه) و محلول رویی بنام S2 و رسوب حاصل p ,

Archive of SID

www.SID.ir

نامگذاری و برای آزمایشهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

کروماتوگرافی روی ستون ژل فیلتراسیون: بدین منظور از سفادکس G-150 استفاده شد. پس از به تعادل رساندن ستون با ابعاد ۱۰۰cm ×۱/۷ cm و سرعت جریان ٦ میلی لیتر در ساعت، نمونه مورد نظر روی ستون قرار گرفت . شستشوی ستون با بافر اولیه حاوی تریس ۵۰ میلی مولار pH =۷/۵ انجام و نمونه های با حجم سه میلی لیتر جمع آوری و جذب در طول موج ۲۳۰ و ۲٦۰ نانومتر اندازه گیری و کروماتوگرام رسم گردید.

استخراج DNA: از روش Lee و همکارانش (۱۳) استفاده شد. نمونه های S1، S2 و P را ابتدا با دستگاه لیوفلیزاتور خشک نموده و به هر یک، یک میلی لیتر از محلول تجزیه کننده (تریس۱۰ میلی مولار، EDTA یک میلی مولار، کلرید سدیم ۰/۱ مولار، SDS یک در صد، پروتئیناز K ۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر) اضافه و بمدت پنج ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس به هر نمونه هم حجم آن از محلول فنل اضافه شد و پس از بهم زدن، ۵ دقیقه در g ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد. پس از اضافه نمودن استات سدیم به فاز آبی به آن دو حجم اتانول اضافه و رسوب حاصل بوسیله سانتریفوژ جدا و در خلاء خشک گردید.

الکترو فورز روی ژل آکریلامید: از روش لاملی (Lammeli) استفاده شد (١٤). ژل شامل دو بخش جدا کننده با آکریلامید ۱۰ درصد و بخش متراکم کننده با غلظت آکریلامید ٤ درصد بود. ژل در حضور SDS ۰/۱ درصد تهیه و مقدار معینی از نمونه ها در بافر نمونه (تریس ۰/٦ مولار (pH ٦/۸) گلیسرول ۱۰ درصد، SDS ۲ درصد و مرکاپتواتانول ٤ درصد و بروموفنل بلو ۰/۰۰۱ درصد) حل ودر چاهک های ژل قرار داده شدند. الکتروفورز بمدت ۲ ساعت در V ۱۰۰ انجام و پس از رنگ آمیزی ژل با کوماسی بلو (Coomassie Brilliant Blue) عکسبرداری گردید.

روشWestern blot: از روش Twobin و همکارانش استفاده شد (۱۵). پس از الکتروفورز نمونه های S1 و S2 بر روی ژل SDS، نمونه ها بر روی کاغذ نیتروسلولز بلات گردیدند. زمان بلات ۳ ساعت و در ٤ درجه سانتی گراد انجام گردید.سپس کاغذ نیتروسلولز پس از شستشو تحت تأثیر آنتی بادی اولیه (آنتی بادی بر علیه پروتئین LMG160 تهیه شده دراین آزمایشگاه) و سپس آنتی بادی ثانویه آنتی بادی ضد IgG خرگوش همراه شد با پراکسیداز که ۳۰۰۰ بار با ژلاتین ۱٪ در بافر فسفات رقیق شده بود قرار گرفت. . پس از شستشوهای لازم کاغذ با محلول ٤- کلرونفتول (4-choloro-1-naphtol) مجاور گردید تا باندها ظاهر گردد.

ژل DNA: این ژل شامل آکریلامید ۱۰ درصد در تریس ۱ درصد، اسید بوریک ۰/۵ درصد و ۰/۰۹ درصد EDTA بود. به محلول آمونیوم پرسولفات در غلظت ۰/۲٦ درصد و TEMED ۰/۰٦٦ درصد اضافه و در صفحات شیشه ای ژل وارد گردید. نمونه های DNA پس از حل شدن در بافر نمونه در چاهکها وارد و ژل برای مدت ۲-۱/۵ ساعت در V ۸۰ الکتروفورز شد. ژل بوسیله رنگ اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) رنگ آمیزی و سپس بوسیله لامپ فرا بنفش مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج

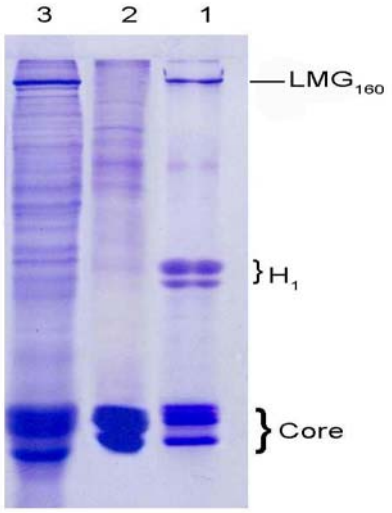
هسته های کاملاً خالص وسالم جدا شده از بافت کبد که شکل طبیعی خود را حفظ نموده بودند، برای زمان معین تحت تأثیر آنزیم ماکروکوکال نوکلئاز، آنزیمی اندونوکلئازی است قرار گرفتند. این آنزیم با حمله به نواحی رابط بین نوکلئوزومیDNA ، موجب شکسته شدن آن شده و بر حسب مقدار آنزیم و زمان هضم، قطعات متنوعی از DNA ایجاد می نماید. در این بررسی هسته ها

Archive of SID
www.SID.ir

ابتدا بطور مختصر تحت تأثیر آنزیم قرار گرفت(۵ واحد) این امر جهت آزاد سازی قطعات DNA بسیار حساس نسبت به آنزیم شد . محلول روئی حاصل از هضم S1 نامگذاری شد. ادامه هضم آنزیمی کروماتین با مقدار بیشتر آنزیم موجب آزادسازی قطعات دیگر کروماتین در محلول رویی می گردد که بعنوان جزء S2 نامگذاری شد. شکل ۱ طرح الکتروفورزی جزء S1 وS2 بر روی ژل SDS را نشان می دهد. بطوریکه در شکل مشاهده می شود نمونه S1 پروتئینهای ناحیه هیستونی را نشان می دهد و در ناحیه LMG160 باندی مشاهده نمی شود. در حالیکه جزء S2 علاوه بر هیستونها بطور مشخص واجد پروتئین LMG160 بصورت یک بند قوی است. هم چنین در این نمونه برخی از پروتئینهای غیر هیستونی ناشناخته نیز مشاهده می شود.

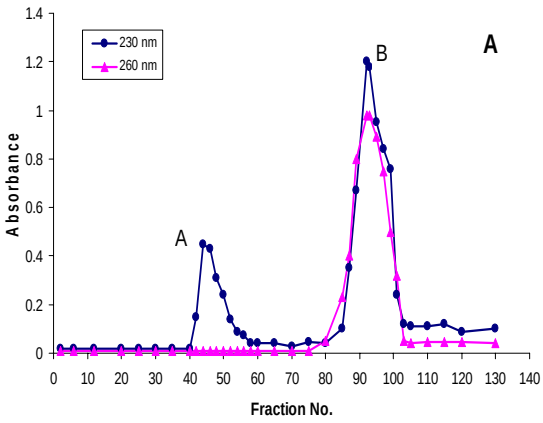
با توجه به آزاد شدن پروتئین LMG160 در جزء S2 حاصل از هضم آنزیمی کروماتین، این جزء بر روی ستون سفادکس کروماتوگرافی شد.

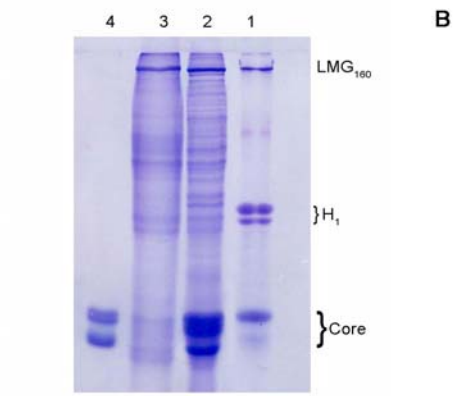
.



شکل ۱- طرح الکتروفورزی پروتئینهای موجود در اجزاء S_1 ,S_2 حاصل از هضم کروماتین کبد موش بوسیله میکروکوکال نوکلئاز بر روی ژل SDS ۱۰درصد.۱) مخلوطی از پروتئینهای هیستونی و LMG_{160} ۲) پروتئینهای جزء S_1 ، ۳) پروتئینهای جزء S_2

طرح کروماتوگرام در شکل ۲- الف نشان داده شده است که شامل دو پیک (A,B) است. الکتروفورز دو پیک A و B بر روی ژل SDS (۲- ب) بوضوح نشان می دهد که پیک A حاوی پروتئینهای غیرهیستونی خصوصاً LMG160 است در حالیکه پیک B حاوی هیستونها می باشد.

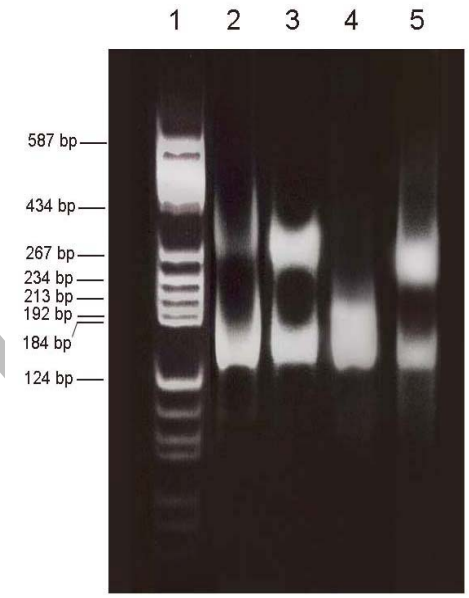




شکل۲- A: کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی جزء S_2 بر روی ستون کروماتوگرافی G-150.
B: طرح الکتروفورزی پیکهای A و B در مقایسه با نمونه قبل از دیالیز.
۱) مخلوطی از پروتئینهای هیستونی و LMG_{160} ۲) نمونه S_2 قبل از کروماتوگرافی ۳) پیک A ٤) پیک B

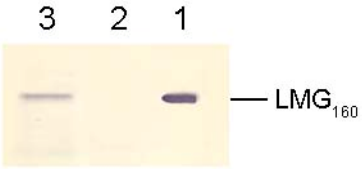
www.SID.ir

برای بررسی طرح DNA درنمونه های S1 و S2، DNA از نمونه ها استخراج و بر روی ژل آکریل آمید تأخیری الکتروفورز گردید (شکل۳). بطوریکه مشاهده می شود جزء S1 اساساً از DNA با ۱۴۵-۱۴۰ جفت باز تشکیل شده و باند بسیار ضعیفی نیز در ناحیه ۲۸۰-۲۶۰ جفت باز دارد در حالیکه DNA حاصل از S2 شامل باند اصلی در ناحیه ۲۸۰-۲۶۰ جفت باز و ۱۵۰-۱۶۰جفت باز است.



شکل۳- الکتروفورز DNA نمونه ها بر روی ژل تأخیری:
۱)استاندارد وزن ملکولی ۲) DNA جزء S_1 ۳) DNA جزء S_2
۴)DNA حاصل از پیک B ۵)DNA حاصل ازپیک A

جهت تأیید اینکه بند در ناحیه ۱۶۰ کیلو دالتون در روی ژل SDS متعلق به پروتئین LMG160 است نمونه ها در حضور آنتی بادی ضد LMG160 بلات گردیدند. طرح Western blot نمونه های S1 وS2 بر روی کاغذ نیتروسلولز در شکل ٤ نشان داده شده است. جزء S1 هیچگونه باندی را نشان نمی دهد در حالیکه جزء S2 بخوبی در ناحیه LMG160 باند مشخصی را نمایان می سازد.



شکل ٤- بلات (western blot) نمونه های S_1 وS_2 بر روی کاغذ نیتروسلولز و آنالیز آنها با آنتی بادی ضد LMG_{160}. ۱)LMG_{160} ۲)S_1 و ۳)S_2

بحث

پروتئینهای LMG بسیار ناهمگن بوده و بر روی ژل SDS بیش از ده پروتئین را نشان می دهند. پروتئین LMG160 یکی از این پروتئینها بوده که بعلت داشتن وزن ملکولی ۱۶۰ کیلو دالتون به این نام نامگذاری شده است.مطالعات اولیه در مورد خصوصیات این پروتئین نشان می دهد که این پروتئین تمایل زیاد به DNA دو رشته ای دارد و پس از اتصال نقطه ذوب حرارتی DNA را کاهش می دهد (۱۱) ولی در این خصوص که این پروتئین چه بخشهایی از کروماتین را ترجیح می دهد اطلاعاتی در دست نمی باشد. یکی از راههای ساده برای بررسی جایگاه این پروتئین در کروماتین استفاده از آنزیمهای هضم کننده است. هضم جزئی کروماتین معمولاً موجب برداشت بخشهایی از کروماتین می شود که ساختار بازتری دارند و در محلول رویی آزاد می گردد (S1). این جزء بطوریکه نشان داده شده است اساساً از واحدهای منونوکلئوزوم تشکیل یافته که مقدار پروتئین LMG160 در آن بسیار کم ویا اصلاً وجود ندارد این امر در طرح بلات و همچنین ژل SDS نمونه S1 بوضوح مشاهده می شود. در حالیکه جزء S2 که در اثر هضم شدید کروماتین با مقدار بیشتر آنزیم بدست می آید، حاوی اساساً دی نوکلئوزوم و یا قطعات بالاتر است. این بخش از کروماتین حاوی مقدار زیادی پروتئین LMG160 است که علاوه بر مشخص بودن بر روی ژل SDS براحتی می تواند با آنتی بادی LMG160 واکنش نشان دهد. مطالعات انجام شده بر روی پروتئینهای LMG نشان می دهد که این پروتئینها در کروماتین عملکرد وسیعی دارند. برخی از این پروتئینها به ترکیبات کروماتینی

Archive of
www.SID.ir

حساس بهDNase II متصل می شوند (۱۶) بهمین دلیل تمایل زیادی به کروماتین فعال دارند. در سال ۱۹۹۳، Wiland و همکارانش نشان دادند که پروتئینهای LMG با توالی خاصی از ملکول DNA ، حاوی توالیهای TATA و CAAT میانکنش می نمایند (۸). همچنین میانکنش بعضی از این پروتئینها با هیستونهای هسته مرکزی کروماتین نیز گزارش شده است (۷). لیکن در تمام موارد پروتئینهای مورد استفاده خالص نبوده و وزنهای ملکولی بین ۱۰۰–۵۵ کیلودالتون را شامل می شوند. مطالعات انجام شده دراین پژوهش بوضوح نشان می دهد که تمایل پروتئین LMG160 نسبت به ترکیبات دی و الیگونوکلئوزومی بیشتر از منونوکلئوزومی است. ولاما چگونگی اتصال این پروتئین به دی نوکلئوزومها ، جایگاه اصلی آن و ارتباط آن با پروتئینهای هیستونی هنوز مشخص نیست و نیاز به مطالعات وسیع تر دارد که درحال انجام است

تشکر و قدردانی: بدینوسیله از زحمات خانم مرضیه یوسف مصبوغ که در این طرح ما را یاری دادند تشکر و قدردانی می شود. هزینه این تحقیقات از محل بودجه پژوهشی دانشگاه تهران (طرح شماره ۵۲۱/٤/٦۰۲) تأمین شده است.

منابع

1- Bradbery, E. M., Maclean, N. and Mattews, H. R. (1981), DNA chromatin and chromosomes, Black Well Sci. Pub., Oxford London.

2- Lung, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997) Structure of the nucleosome core particle at 28 A resolution. Nature 389:251-260.

3- Bianchi, M.E. and Agresti, A. (2005) HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. Curr. Opin. Genet. Dev. 15: 496-506.

4- Bustin, M. and Reeves, R. (1996) High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function, Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol. 54, 35-100.

5- Bianchi, M. E., Beltrame, M. (2000) Upwardly mobile proteins. Workshop: the role of HMG proteins in chromatin structure, gene expression and neoplasia. EMBO Rep. 1:109- 114

6- Drajan, A. I., Read, C. M., Makeyeva, E.N., Milgolina, E. I., Churchill, M.E. A., Crane-Robinson, C. and Priualov, P. L. (2004) DNA binding and bending by HMG boxes, J. Mol. Biol. 343:371-393.

7- Wiland,E.,Siemieniako,B.,Trzeciak,W.H. (1990) Binding of low mobility group protein from rat liver chromatin with histones studies by chemical cross-linking, Biochem Biophys Res Commun. 166:11-21.

8- Chiu, J.F., Wang, S., Fujitant, H., Hnilica, L.S. (1975) DNA chromosomal non-histone proteins. Isolation, characterization and tissue specificity, Biochemistry 14:4552-4558.

9- Fu, H., Subramanian, R. R., Master, S. C. (2000) protein: structure, function and regulation, Annu. Rev. Pharmacol. Toxical. 40:617-647.

1- Fallah, S , Rabbani. A. (2002) Isilation and Characterization of LMG160 protein in rat liver and its interaction with DNA, Ph.D. Thesis, IBB, university of Tehran, Iran.

11- Fallah, S., Rabbani, A. (2003) Interaction of a low mobility group protein, LMG160, with deoxyribonucleic acid, Int. J. Biol. Macromol. , 31:217-221.

12- Leigh, A., Burgoyne, M., Wapar,A. and Murice, R. (1970) Calcium dependent priming of DNA synthesis in isolated rat liver nuclei. Biochem. Biophys. Res. Comm. 93(20): 245-259.

13- Lee, A., Whyte, M.K., Haslett, C. (1993) Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil function longevity by inflammatory mediators, J. Leukoc. Biol. 54:283-286.

14- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4 Nature 277:680-685.

15- Twobin, H., Staehelin,T., Gorden, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications, Proc Natl Acid Sci USA 79:4350-4354.

16- Wiland, E., Siemieniako, B., Trzeciak, W.H. (1993) Binding of low mobility group proteins with DNA examined in homologous and heterologous system by gel retardation assay Cell Biology Interaction 17:45-53.

Archive of SID
www.SID.ir

Studies on the position of nonhistone chromatin protein (LMG_{160}) in the chromatin fractions of rat liver nuclei

Rabbani Chadegani. A, Ariapour. H, Abdosamadi.S

Institute of Biochemistry & Biophysics, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Nonhistone chromosomal proteins are a set of heterogenous chromatin proteins which play different functions dependent on the cell type. A group of these proteins with a high molecular weight and low mobility on the gel electrophoresis, called LMG proteins, has been the subject of many workers. We have recently isolated a fraction of these proteins from rat liver nuclei, with a molecular weight of 160 KDa and named HMG_{160}.

In this study the position of this purified protein in different fractions of chromatin has been studied. After brief digestion of rat liver chromatin with MNase, chromatin fractions S1 and S2 were prepared and analyzed by gel electrophoresis and imminobloting techniques. The results show that the protein LMG_{160} has higher affinity to di- and oligonucleosomes rather than to mononucleosomes. This implies that LMG_{160} preferentially binds to bulk chromatin and may have a role in chromatin inactivation which demands further investigation.

Key words: Chromatin, Non-histone proteins, Nucleosome, LMG proteins

Archive of SID

www.SID.ir