

استخراج و بررسی طرح پروتئینها و DNA نوکلئوزومی کروماتین سلولهای برگ گیاه سیب زمینی (*Solanum tuberosum*)

آسیه آرام وش و عذرا ربانی چادگانی*

تهران، دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، گروه بیوشیمی

تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۵

تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۱۹

چکیده

سیب زمینی چهارمین محصول تغذیه ای جهان است که در معرض قارچها، باکتریها و ویروسهای زیادی قرار دارد. کروماتین اساساً از DNA، پروتئینهای هیستونی و غیرهیستونی ساخته شده است. این ترکیبات پروتئینی علاوه بر ایجاد ساختار نوکلئوزومی در تنظیم بیان ژن، متابولیسم سلولی و رونویسی نیز شرکت دارند. مطالعات بسیاری بر روی نوع پروتئینهای کروماتین و طرح نوکلئوزومی سلولهای جانوری انجام شده است، لیکن در خصوص گیاهان به علت مشکلاتی در روشهای استخراج و پیچیدگیهای دیگر این مسئله کمتر مطالعه شده است. در این مطالعه پروتئینها و طرح نوکلئوزومی کروماتین سلولهای برگ گیاه سیب زمینی مورد بررسی قرار گرفته است. بدین منظور پس از کشت گیاه سیب زمینی، از برگها کالوس تهیه و سلولها به مدت ۱۰-۵ روز در شرایط استاندارد کشت داده شده و سوسپانسیون سلولی به دست آورده شد. پروتئینهای کروماتین از این دو نمونه جداسازی و به وسیله ژل الکتروفورز و وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت، همچنین DNA از سلولهای برگ جداسازی و پس از هضم آنزیمی، طرح نوکلئوزومی بر روی ژل آگارز تعیین گردید. نتایج حاصل نشان داد که پروتئینهای استخراج شده به روش اسید طرح پیچیده تری نسبت به سلولهای جانوری دارند به طوری که علاوه بر باندهایی در ناحیه هیستونهای هسته مرکزی در سلولهای جانوری که در وسترن بلات با آنتی بادی علیه پروتئینهای هیستونی بافت تیموس شناسایی شدند، پروتئینهایی با وزنهای مولکولی بالاتر از ۱۷ کیلو دالتون مشاهده گردید که با آنتی بادی جانوری قابل شناسایی نبودند. پروتئینهای غیر هیستونی این گیاه نیز چه از نظر حرکت الکتروفورزی و چه از نظر خصوصیات ایمونوشیمیایی با پروتئینهای مشابه در سلولهای جانوری متفاوت بودند. بررسی DNA استخراج شده از سلولهای برگ سیب زمینی پس از هضم آنزیمی و استفاده از منحنی کالیبراسیون بر روی ژل آگارز قطعاتی با مضربی از ۱۵۸ جفت باز نشان داد. از نتایج فوق می توان نتیجه گرفت که پروتئینهای هیستونی و غیرهیستونی و همچنین طول DNA نوکلئوزومی در سلولهای برگ سیب زمینی متفاوت از سلولهای جانوری است و مقایسه آنها با سلولهای گیاهی دیگر نیز تفاوتهای فاحشی را نشان می دهد.

واژه های کلیدی: سیب زمینی، نوکلئوزوم، هیستون، پروتئینهای غیر هیستونی، الکتروفورز

* نویسنده مسئول: تلفن: ۶۶۴۹۹۴۲۲، پست الکترونیکی: Rabbani@ibb.ut.ac.ir

مقدمه

وزن مساوی DNA در کروماتین وجود دارند. امروزه محققین معتقدند هیستونها به طور عموم از ۵ نوع پروتئین متفاوت تشکیل شده اند که عبارتند از: H1, H2B, H3 و H2A, H4 (۱۱). هیستون H1 بزرگترین هیستونهاست. هیستونهای H2A, H2B, H3, H4 در تشکیل هسته

کروماتین ترکیب نوکلئوپروتئینی (Nucleoprotein) است که از اسیدهای نوکلئیک (DNA, RNA) و پروتئینها تشکیل شده است. پروتئینهای آن عمدتاً پروتئینهای هیستونی و غیر هیستونی می باشند (۱۱). هیستونها عمده ترین پروتئینهای تشکیل دهنده ساختار کروماتین هستند که با

هیستون H1 تنوع زیرجزء ای (Variant) زیادی هم در گیاهان و هم در جانوران دارد.

عمده تنوعات زیرجزء ای هیستونی گیاهان و تعداد کمی از جانوران در وزن مولکولی می باشد. در گیاهان به خصوص گیاهان عالی تر هیستونها به صورت پروتئینهای تک باندی دیده نمی شوند (بر روی ژل دارای چندین باند هستند) و معمولاً انواع زیرجزء های آنها یافت می شود. اولین مطالعات بر روی پروتئینهای HMG گیاهی بر روی جنین گندم انجام شده است که چهار پروتئین HMG در آن شناسایی گردید (HMGa-d)، که بر روی ژل SDS-PAGE وزن مولکولی بالاتری را نسبت به همین پروتئینها در جانوران نشان می دادند. مطالعات ایمونولوژیکی گندم تفاوتهای بیشتری را میان پروتئینهای HMG اصلی گیاهی و جانوری نشان داده است، به طوری که آنتی بادی ویژه HMG جوجه نمی تواند به خوبی پروتئینهای HMG گندم را شناسایی کند، این امر نشان می دهد که این پروتئینها خصوصیات آنتی ژنتیکی مشترکی ندارند (۲۰ و ۲۱).

گیاه سیب زمینی از تیره سولاناسه (Solanaceae) می باشد و نام علمی آن *Solanum tuberosum* L. است. توبرهای این گیاه از نظر ارزش غذایی جایگاه ویژه ای در جهان دارند. امروزه سیب زمینی عمده ترین محصول با ارزش جهان و پس از برنج و گندم و ذرت به عنوان چهارمین محصول تغذیه ای جهان به حساب می آید. سیب زمینی در معرض باکتریها و قارچهای زیادی قرار دارد که مطالعه بر روی آنها در بهبود کشت این گیاه و کنترل بیماریهای مربوط به آن تأثیر به سزایی دارد. همچنین به دلیل اهمیت تغذیه ای، تحقیقات زیادی بر روی این گیاه از جمله اثر عوامل زنده نظیر باکتریها و قارچها همچون تولید زیرجزء های مختلف اکسیژن در ارتباط با قارچ *Phytophthora infestans* انجام شده است. از جمله این تحقیقات می توان اثر هورمونهای گیاهی نظیر سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید در پاسخهای دفاعی گیاه (۱۹) و سوکروز

نوکلئوزومی شرکت دارند، لذا این پروتئینها را تحت عنوان هیستونهای هسته مرکزی (Core histones) نیز می شناسند (۲۵،۱۱). هیستونها تقریباً در تمام سلولهای عالی یوکاریوتی وجود دارند و در گیاهان و جانوران تا حدودی حفاظت شده اند.

عمده ترین واحد کروماتین را نوکلئوزوم با ۱۴۷ جفت باز تشکیل میدهد که اطراف هسته اکتامری پروتئینهای هیستونی به صورت سوپر هلیکس منفی پیچیده شده است (۱). این ساختار فیبرهای ۱۰ نانومتری معروف به ساختار Beads on a string را ایجاد می کند.

به تمام پروتئینهای موجود در هسته به غیر از هیستونها، پروتئینهای غیر هیستونی اطلاق می شود. از مهم ترین این پروتئینها می توان پروتئینهای غیر هیستونی HMG (High mobility group) را نام برد (۵). پروتئینهای غیر هیستونی HMG پروتئینهایی هستند با وزن مولکولی بین ۲۸-۹ کیلوالتون که به دلیل حرکت الکتروفورزی بالا روی ژل الکتروفورزی پلی آکریلامید HMG نامیده شده اند.

ساختار کروماتین در سلولهای گیاهی تا حدودی مشابه ساختار آن در سلولهای جانوری می باشد (۱۳). اولین تحقیقات بر روی هیستونهای گیاهی توسط Famebrough و Bonner در سال ۱۹۶۹ انجام شد (۱۳). آنها به شباهت میان هیستونهای گیاهی و جانوری اشاره نمودند که هیستونهای گیاهی را همانند نوع جانوریشان می توان به ۵ نوع دسته بندی نمود. تحقیقات بعدی حاکی از حفاظت شدگی هیستونهای H3 و H4 بود. البته هیستون H3 حفاظت شدگی کمتری را نشان می دهد. همچنین هیستونهای H2A و H2B جانوری و گیاهی چه از نظر محتویات آمینو اسیدی و چه از نظر حرکت الکتروفورزی، تفاوتهای بسیاری دارند. هیستونهای H2A و H2B بر روی ژل SDS-PAGE حرکت کندتری نسبت به همتای جانوری خود دارند و تعداد باندهایشان نیز بیشتر است (۱۲).

در شرایط مناسب کاشته شدند و در دمای 25 ± 2 درجه سانتی گراد و ۱۶ ساعت روشنایی با شدت روشنایی ۲۵۰۰ لوکس قرار گرفتند. پس از حدود یک ماه برگهای حاصل، جمع آوری و در ازن مایع قرار گرفت تا استخراج پروتئینها بر روی آنها انجام گیرد.

استخراج پروتئینهای هیستونی و غیر هیستونی: تمامی مراحل استخراج در ۴ درجه سانتی گراد انجام گردید. برای استخراج پروتئینهای هیستونی و غیر هیستونی در آزمایشات مختلف، از بافرهای شستشوی مختلف استفاده گردید که بشرح زیر می باشند:

بافر a: 0.075 M NaCl و 0.025 M EDTA با $\text{pH}=7.5$.
بافر b: 1 M KCl ، 1 mM MgCl_2 ، 50 mM Tris-HCl و Triton X-100.
بافر c: 1 mM EDTA ، 1 M KCl ، 10 mM Tris-HCl ، 1 mM MgCl_2 ، 3 mM CaCl_2 ، 0.25 SDS درصد و $0.5 \text{ mM } \beta$ -مرکاپتو اتانول.

استخراج پروتئینهای هیستونی به وسیله اسید مطابق با روش Johns (۹) انجام شد. استخراج این پروتئین ها از سلولهای کالوس، سوسپانسیون سلولی و سلولهای برگ سیب زمینی انجام گرفت. سلولها پس از شستشو با اسید کلریدریک ۰/۳ نرمال استخراج و محلولهای استخراجی توسط استون رسوب داده شدند.

استخراج پروتئینهای غیر هیستونی مطابق با روش Goodwin و Johns (۴) انجام شد. استخراج این پروتئینها از سلولهای کالوس، سوسپانسیون سلولی و سلولهای برگ سیب زمینی انجام گرفت که سلولها در بافر شستشو دهنده فوق ۲ الی ۴ مرتبه هموژنیزه و در 3000 g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس پروتئینهای غیر هیستونی HMG از رسوب سلولی حاصل استخراج و پس از رسوب دادن با استن در خلاء خشک گردید.

بر روی رشد و تغییر فعالیت آنزیمهای تنشی در دمای پایین را نام برد (۶).

در این مطالعه پروتئینهای هیستونی و غیر هیستونی کروماتینی و طرح نوکلئوزومی کروماتین گیاه سیب زمینی با استفاده از روشهایی که برای سلولهای جانوری به کار رفته است، استخراج و مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل می تواند از نظر شناخت بیشتر و مقایسه با گیاهان دیگر اطلاعات مفیدی به دست دهد.

مواد و روشها

تهیه و کشت مایع سیب زمینی: در ابتدا برگهای گیاهچه استریل سیب زمینی از رقم Cosima که از مؤسسه بیوتکنولوژی کرج تهیه شده بود به قطعات مناسب بریده و سپس این قطعات بر روی پتریهای حاوی محیط کشت MS (۱۵) جامد (با غلظت ۰/۸ درصد آگار) که دارای هورمونهای 2,4-D و کینتین (Kinetin) به ترتیب با غلظت ۵ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر محیط کشت بودند، قرار داده شدند. پس از گذشت چهار الی شش هفته، کالوسهای نرم و شکننده و سفید در ارلنهای ۲۵۰ میلی لیتری حاوی محیط کشت MS هورمون دار مایع ریخته و بر روی شیکر با ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند تا کشت تعلیقی سلولی حاصل شود. درصد بقای سلولها در زمانهای مختلف به وسیله رنگ تریپان بلو تعیین شد. همچنین سلولها با رنگ فلورسانس مخلوطی از اتیدیوم برماید-آکریدین اورنج (Ethidium bromide-Acrydine orange) رنگ آمیزی و مورد بررسی قرار گرفت. پس از گذشت حدود ۱۰-۵ روز سلولها در ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ و به منظور استخراج آماده گردیدند.

در مورد سلولهای برگ سیب زمینی، از انواع کشت شده در محیط طبیعی و شرایط گلخانه ای به منظور استخراج استفاده گردید. بدین منظور در ابتدا تویرهای سیب زمینی

سپس غشاء با آنتی سرمهای ویژه ضد HMG و ضد هیستون رقیق شده در بافر بلوکه کننده شب تا صبح در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه گردید، سپس غشاء با محلول تریس-کلرید سدیم توین دار شسته و با آنتی سرم بزی ضد IgG خرگوش و کونزوگه شده با پراکسیداز به مدت دو ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. شستشوی دیگری انجام شد و غشاء با محلول سوسترای ۴-کلرو-۱-نفتل و H_2O_2 به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد تا باندها ظاهر و قابل مشاهده گردید.

رنگ آمیزی ژل با نترات نقره: از روش Towbin استفاده (۲۳) و مراحل بشرح زیر انجام گردید:

در مرحله تثبیت کردن، ژل به مدت یک ساعت در محلول حاوی ۵۰ درصد متانول، ۱۲ درصد اسید استیک و ۰/۵ ml/L فرمالدهید ۳۷ درصد قرار گرفت، سپس مرحله آبگیری در سه نوبت ۲۰ دقیقه ای در اتانول ۵۰ درصد انجام شد. در مرحله پیش از عمل (Pretreating) ژل به مدت یک دقیقه در محلول ۰/۲ گرم در لیتر تیوسولفات سدیم ($Na_2S_2O_3$) قرار داده شد و با آب مقطر شستشو داده شد. در مرحله اشباع (Impregnation) ژل به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ۲ گرم در لیتر نترات نقره و ۰/۷۵ میلی لیتر در لیتر فرمالدهید قرار داده شد. مرحله شستشو مجدداً صورت گرفت. در مرحله توسعه (Developing) برای آشکار شدن باندها، ژل در محلول حاوی ۶۰ گرم در لیتر کربنات سدیم، ۰/۵ میلی لیتر در لیتر فرمالدهید ۳۷ درصد و ۴ میلی گرم در لیتر تیوسولفات سدیم قرار داده شد تا باندها ظاهر شوند، سپس دو بار شستشو با آب مقطر انجام شد. در مرحله توقف (Stopping) ژل به مدت ۱۰ دقیقه در محلول حاوی متانول ۵۰ درصد و اسید استیک ۱۲ درصد قرار گرفت. در آخر شستشو با متانول ۵۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد و ژل در اتانول ۲۰ درصد نگهداری گردید.

ژل الکتروفورز: الکتروفورز بر روی ژل SDS به روش Laemmli (۱۰) انجام گردید. ژل شامل دو قسمت ژل تفکیک کننده و ژل متراکم کننده بود. ژل تفکیک کننده حاوی ۱۵ درصد آکریل آمید-بیس آکریل آمید، تریس ۱/۵ مولار با $pH=8.8$ و SDS ۰/۱ درصد بود که TEMED ۰/۰۲۵ درصد و آمونیوم پیرسولفات ۰/۰۶ درصد به آن اضافه و محلول حاصل بین صفحات شیشه ای ریخته تا پلیمریزه گردید. بدین ترتیب ژل به طول ۷cm و به قطر داخلی ۱ mm تهیه شد. ژل متراکم کننده حاوی ۴ درصد آکریل آمید-بیس آکریل آمید، تریس M ۰/۵ با ۶/۸ $pH=$ SDS ۰/۱ درصد بود که با افزودن ۰/۰۲۵ درصد TEMED و ۰/۰۶ درصد آمونیوم پیرسولفات، به طول ۱ cm بر روی ژل تفکیک کننده پلیمریزه گردید. سپس مقدار معینی از هر یک از نمونه های پروتئینی در مقدار مشخصی از بافر نمونه حل و بر روی ژل برده شدند. الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۱۰۰ V به مدت ۲/۵ ساعت انجام گرفت و پس از آن در محلول کوماسی بلو رنگ آمیزی شد و در محلول رنگ بر قرار گرفت تا باندها مشخص گردد.

جهت الکتروفورز DNA از ژل آگارز استفاده گردید. بدین منظور پودر آگارز به مقدار ۱/۸ درصد در بافر TBE (شامل تریس بازی ۹۰ mM، بوریک اسید ۹۰ mM و EDTA ۲ mM با $pH=8$) به کمک حرارت حل و سپس در تانک افقی مخصوص ریخته شد تا پلیمریزه گردد. الکتروفورز به مدت یک ساعت در ولتاژ ۱۰۰ انجام گرفت و سپس در رنگ اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید. بافر تانک نیز TBE بود.

وسترن بلائینگ: پس از الکتروفورز نمونه های پروتئینی هیستونی و غیر هیستونی بر روی ژل، انتقال پروتئینها به غشاء نیترو سلولوز به روش Towbin (۲۴) انجام شد. پس از انتقال پروتئینها، غشاء یک ساعت در بافر بلوکه کننده که حاوی ژلاتین (W/V) ۱ درصد است قرار گرفت و سه بار در کل به مدت ۱۵ دقیقه در محلول Tris-NaCl شسته شد،

سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. محلول رویی با یک حجم کلروفرم مخلوط و مجدداً سانتریفیوژ شد. محلول رویی آن با دو حجم اتانول در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد رسوب داده شد و پس از سانتریفیوژ نمونه ها در ۱۰۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد، رسوب حاصل در دمای اتاق خشک و در بافر TE (تریس ۱۰mM، ۱ mM EDTA pH=۸) حل گردید.

دلیل معمولاً با اسید استخراج می شوند. در ابتدا از خود سلولهای برگ سیب زمینی استفاده گردید. برگهای گیاه جمع آوری و در ازت مایع پودر شد. پودر حاصل با بافر a شستشو داده شد و هیستونها به وسیله اسید کلریدریک N ۰/۳ استخراج و با استون رسوب داده و روی ژل الکتروفورزی SDS-PAGE برده شدند. همان طور که در شکل ۲A دیده می شود پروتئینهای استخراج شده، باندهای مشخصی در روی ژل نشان می دهند که با حرکت الکتروفورزی آنها در سلولهای جانوری، کمی متفاوت است ولی تا حدودی در مجاورت هیستونهای هسته مرکزی و بالاتر از آن (حدود ۱۷ کیلو دالتون) هستند.

در مرحله دوم، جهت مطالعه بیشتر و تأیید نتایج کار، از سیستم سوسپانسیون سلولی استفاده گردید. استخراج از سوسپانسیونهای ۱۰-۵ روزه با HCl، اجرا شد. سلولها قبل از استخراج در بافر a شستشو داده شدند. شکل ۲B ژل SDS-PAGE حاصل از این استخراج را نشان می دهد. به علت ضعیف بودن باندها، ژل به روش نیترا نقره نیز رنگ آمیزی شد (شکل ۲C). همان طور که مشاهده می شود در رنگ آمیزی با نیترا نقره باندهایی در مجاورت هیستونهای هسته مرکزی و بالاتر از آن دیده می شود.

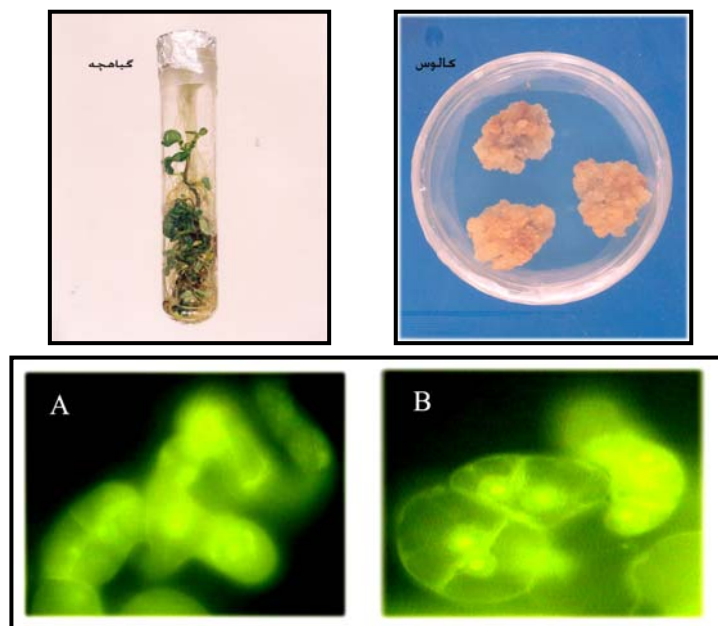
استخراج DNA: استخراج مطابق با روش Dellaporta و همکارانش (۳) انجام شد. ابتدا سلولهای حاصل از برگ سیب زمینی با چهار حجم از بافر لیز کننده سلولی (تریس ۱۰۰ mM، EDTA ۵۰ mM، کلرید سدیم mM ۵۰۰، SDS ۱ درصد و پروتئیناز K ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت، سپس به میزان هم حجم با فنول مخلوط شد و در ۱۰۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه

نتایج

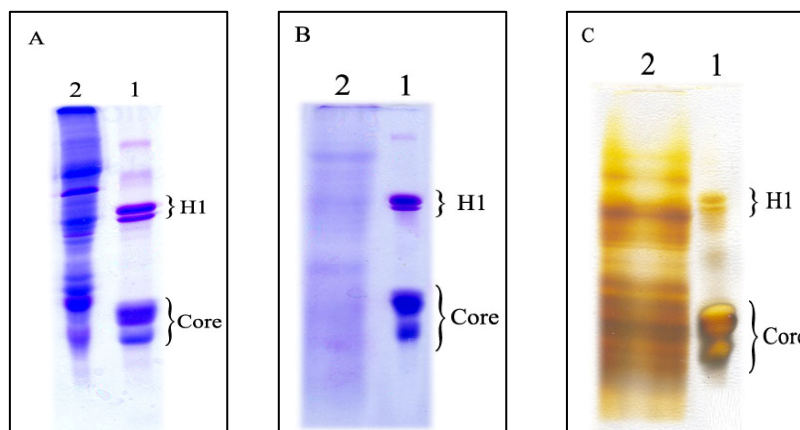
تعیین درصد بقای سلولی و بررسی سیتولوژیکی آنها: ابتدا درصد بقای سلولی با استفاده از رنگ تریپان بلو تعیین و در صورتیکه درصد بقا بیش از ۹۷ درصد بود، آزمایشات مربوطه ادامه داده شد. به منظور بررسی سیتولوژیکی سوسپانسیونهای سلولی از رنگ فلئورسنت اتیدیوم بروماید و آکریدین استفاده گردید. شکل ۱ تصویر گیاهچه های استریل، کالوس و همچنین سلولهای رنگ آمیزی شده با رنگ فلورسانس را نشان می دهد.

همان طور که مشاهده می شود سلولها سالم و هسته سلولها کوچک هستند که در گوشه ای از سلول قرار دارند. با وجود تنوعی که در اشکال آنها وجود دارد، اکثر سلولها طویل و سیتوپلاسم یکنواختی دارند که عمده حجم این سلولها را واکوئل پر کرده است. این سلولها غنی از ترکیبات فنولی و نشاسته بوده و هسته آنها در مقایسه با حجم کل سلول فضای بسیار کمی را اشغال می کند. در کالوس، سلولها بسیار به هم چسبیده و تشکیل توده هایی را می دهند و سلولهای منفرد و مجزا کمتر مشاهده می شوند که این تجمعات در سوسپانسیون سلولی کمتر دیده می شود.

پروتئینهای هیستونی در سلولهای گیاه سیب زمینی: پروتئینهای هیستونی قابل حل در اسید هستند و به همین



شکل ۱- گیاهچه استریل سیب زمینی ازدیاد شده در آزمایشگاه، کالوس و سلولهای رنگ آمیزی شده با رنگ فلورسانس به ترتیب (A ۱۰X و B ۴۰X).



شکل ۲ - A) طرح الکتروفورزی پروتئینهای هیستونی استخراج شده از برگ سیب زمینی با شستشو با بافر a قبل از استخراج، بر روی ژل SDS-PAGE (۱۵ درصد). B) هیستونهای تیموس (۲) پروتئینهای هیستونی استخراج شده از سوسپانسیون سلولی ده روزه با شستشو با بافر a قبل از استخراج، بر روی ژل SDS-PAGE (۱۵ درصد). C) همان ژل با رنگ آمیزی نترات نقره است. ۱) هیستونهای تیموس (۲) محلول استخراجی پروتئینهای هیستونی

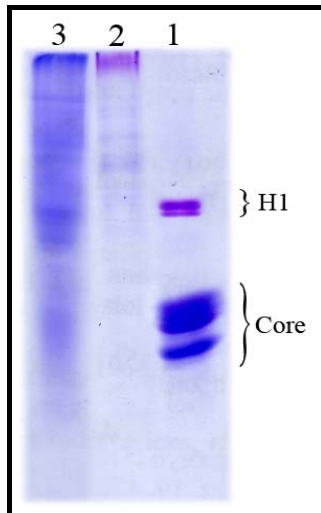
هیستونهای Core اطلاق نمود مشاهده نگردید. لیکن در ناحیه هیستون H1 باند یا باندهایی مشاهده می شود که احتمال دارد به H1 تعلق داشته باشند. در صورتی که با رنگ آمیزی نترات نقره (شکل ۳B) باندهایی نیز در ناحیه هیستونها مشاهده می شود لیکن با توجه به اینکه رنگ نترات نقره قادر به رنگ آمیزی ترکیبات غیرپروتئینی نیز

برای انجام مطالعات بعدی، سلولهای سوسپانسیون قبل از استخراج در بافر c حاوی SDS هموژن و شستشو داده شدند تا دیواره سلولی کاملاً شکسته شود. نمونه ها پس از استخراج با استون رسوب داده شدند. ژل حاصل با نترات نقره رنگ آمیزی شد تا باندها بهتر آشکار شود. به طوری که در شکل ۳A مشاهده می شود در مجاورت هیستونهای جانوری پروتئینهای قابل ملاحظه ای که بتوان آنها را

می باشد، صرفاً با این رنگ آمیزی نمی توان حضور

هیستونها را تأیید نمود.

ضعیف و در استخراج دوم نیز باندهای بسیار ضعیفی به همراه اسمیر دیده می شود.



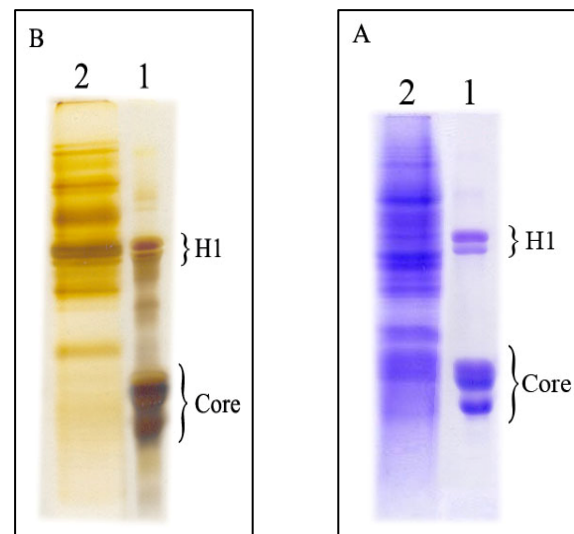
شکل ۴ - طرح الکتروفورزی پروتئینهای هیستونی استخراج شده از کالوس بر روی ژل SDS-PAGE ۱۵ درصد. (۱) هیستونهای تیموس ۲ و (۳) محلول استخراجی پروتئینهای هیستونی با اسید کلریدریک ۰/۳ نرمال بترتیب حاصل از استخراج اول و دوم

پروتئینهای غیر هیستونی در سلولهای گیاه سیب زمینی:

به ترتیب استخراج پروتئینها از برگ، سوسپانسیون سلولی و کالوس توضیح داده می شود. با توجه به تنوع زیاد این پروتئینها در این مطالعه جهت ساده تر نمودن آزمایشات منحصراً پروتئینهای غیر هیستونی از نوع HMG مورد بررسی قرار گرفتند.

ابتدا، استخراج پروتئینهای HMG مستقیماً از برگ گیاه سیب زمینی با اسیدپرکلریک انجام گرفت. پروتئینها پس از استخراج و رسوب دادن با استون بر روی ژل الکتروفورزی SDS-PAGE برده شدند. شکل ۵A تصویر مربوط به این ژل را نشان می دهد (ردیف ۲).

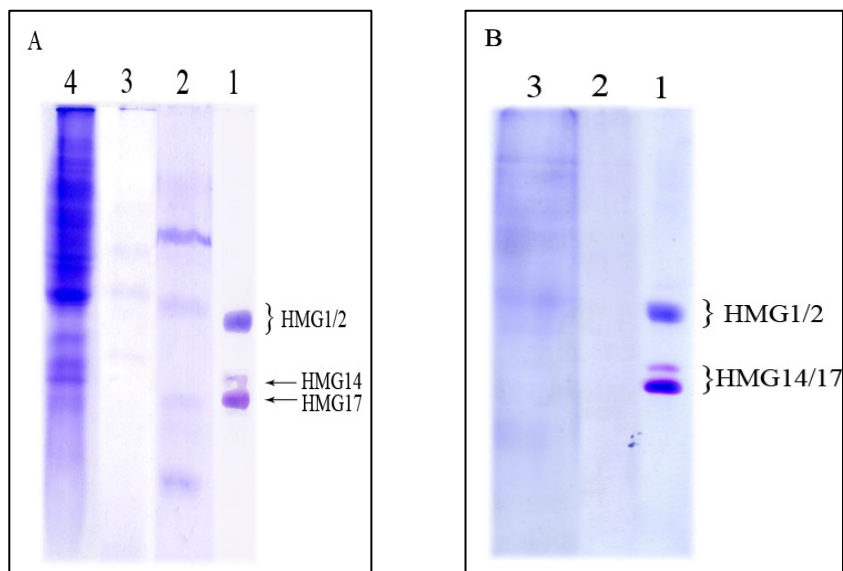
آزمایشات بعدی بر روی سوسپانسیون سلولهای برگ پس از ۱۰-۵ روز کشت متمرکز گردید. سلولها پس از شستشو با بافر a استخراج گردیدند. همان طور که در شکل ۵A مشاهده می شود در استخراج با اسیدپرکلریک باندهای



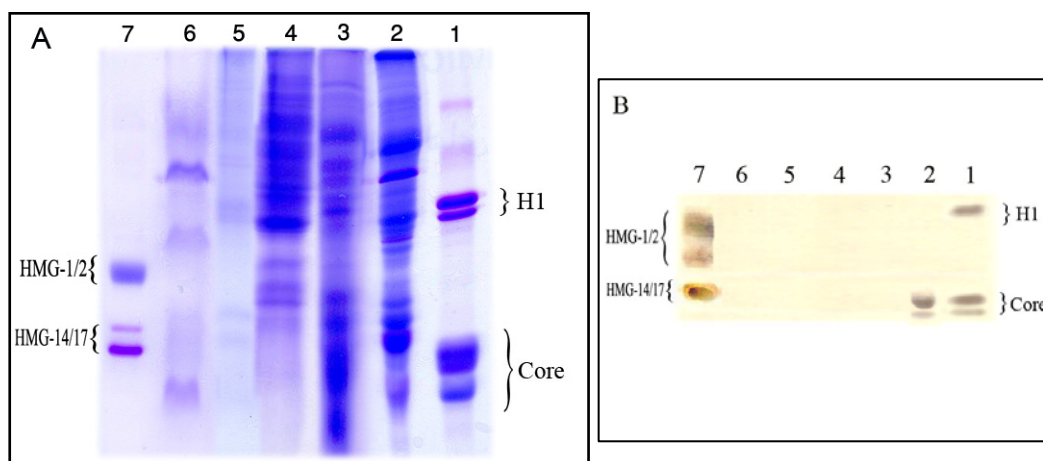
شکل ۳ - طرح الکتروفورزی پروتئینهای هیستونی استخراج شده از سوسپانسیون سلولی ده روزه با شستشو با بافر c قبل از استخراج، بر روی ژل SDS-PAGE ۱۵ درصد. A: رنگ آمیزی با کوماسی بلو B: رنگ آمیزی با نترات نقره. (۱) هیستونهای تیموس (۲) محلول استخراجی پروتئینهای هیستونی

در نهایت، برای جداسازی پروتئینهای هیستونی از کالوس استفاده گردید. کالوسهای ترد و شکننده با اسید کلریدریک ۰/۳ N استخراج و بر روی ژل SDS الکتروفورز شدند. به دلیل ضعف بودن باندهای حاصل از این استخراج و از آنجایی که تصور بر این بود که احتمالاً به دلیل وجود دیواره سلولی در این سلولهای گیاهی، هموژنیزه کردن در اسید کلریدریک برای شکستن این سلولها کافی نبوده است، بنابر این بار دیگر استخراج انجام شد، به طوری که زمان هموژنیزاسیون افزایش یافت و قبل از استخراج، سلولها در بافر شستشوی b حاوی Triton X-100 هموژن و بار دیگر در همین بافر بدون Triton X-100 شستشو داده شده و سپس استخراج شدند. نمونه ها با استون رسوب داده و بر روی ژل SDS برده شدند. همان طوری که در شکل ۴ مشاهده می شود در مکانهایی که پروتئینهای استخراج اول بر روی ژل برده شده اند باندهایی بسیار

مشاهده نمی شود (ردیف ۳) ولی در استخراج با نمک کلرید سدیم ۰/۳۵ M، پروتئینهای در مجاورت مارکر HMG دیده می شود (ردیف ۴).



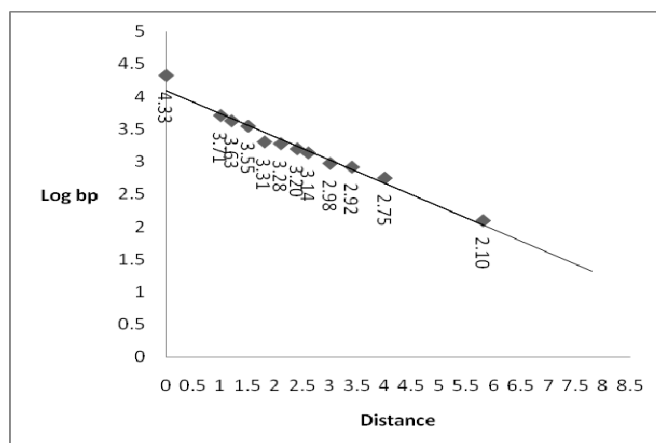
شکل ۵ - A) طرح الکتروفورزی پروتئینهای HMG استخراج شده از برگ و سوسپانسیون سلولی سیب زمینی. (۱) HMG تیموس (۲) محلول استخراجی پروتئینهای HMG از برگ با اسید پرکلریک ۵٪ (۳-۴) به ترتیب پروتئینهای HMG استخراج شده از سوسپانسیون سلولی با اسید پرکلریک ۵٪ و نمک کلرید سدیم ۰/۳۵ نرمال. B) طرح الکتروفورزی پروتئینهای غیر هیستونی استخراج شده از کالوس بر روی ژل SDS ۱۵ درصد. (۱) HMG تیموس (۲) محلول استخراجی پروتئینهای غیر هیستونی به ترتیب حاصل از استخراج اول و دوم



شکل ۶ - طرح وسترن بلات پروتئینهای هیستونی و HMG استخراج شده از برگ و سوسپانسیون سلولی. A) ژل الکتروفورز به عنوان شاهد بلات. (۱) هیستونهای تیموس (۲) هیستونهای برگ (۳) هیستونهای سوسپانسیون سلولی (۴ و ۵) به ترتیب پروتئینهای HMG استخراج شده از سوسپانسیون سلولی با نمک کلرید سدیم ۰/۳۵ مولار و اسید پرکلریک ۵٪ (۶) محلول استخراجی پروتئینهای HMG از برگ با اسید پرکلریک ۵٪ (۷) HMG تیموس B) وسترن بلاتینگ پروتئینها روی ژل

ضعیفی دیده می شد، تصور گردید که پروتئینهای گیاهی حالیت کمتری نسبت به هیستونهای جانوری در این اسید دارند.

در نهایت محلولهای استخراجی هیستونی و پروتئینهای غیر هیستونی حاصل از سوسپانسیون سلولی و برگ با آنتی بادی علیه هیستونها و پروتئینهای غیر هیستونی تیموس ایمونوبلات شدند تا ماهیت باندهای حاصل مشخص شوند. نتایج در شکل ۶ نشان داده شده است. آنتی بادیهای علیه هیستونهای هسته مرکزی جانوری در آزمایشگاه تهیه شده اند و به علت حفاظت شدگی زیاد هیستونهای H3 و H4 در تمامی موجودات، آنتی بادیهای استفاده شده در این آزمایش عمدتاً علیه هیستونهای H2A و H2B است.



شکل ۷ - نمودار لگاریتم طول قطعات فاز λ هضم شده به وسیله EcoRI-HindIII در مقابل حرکت نسبی باندهای آن در ژل آگارز.

پروتئینهای HMG جانوری واکنش نشان ندادند. همچنین با توجه به اینکه در استخراج با اسید پرکلریک در زمینه سلولهای برگ سیب زمینی، در وسترن بلاتی که با همین آنتی بادی انجام شد نیز باندی دیده نشد، به نظر می رسد به علت نبود خصوصیات آنتی ژنتیکی مشترک، آنتی بادی های جانوری نمی توانند پروتئینهای HMG گیاهی را شناسائی کنند.

هضم آنزیمی کروماتین سلولهای برگ: ابتدا سلولهای برگ گیاه سیب زمینی با واحدهای مختلف آنزیم و

در مرحله بعد، استخراج مطابق آنچه قبلاً توضیح داده شده بر روی سلولهای کالوس انجام گردید. در این خصوص در استخراج اول، ابتدا پروتئینها به طور مستقیم از بافت استخراج شدند و در استخراج دوم، زمان هموژنیزاسیون افزایش یافت و قبل از استخراج شستشو با بافر b انجام شد و نمونه ها با استون رسوب داده شدند. شکل ۵B طرح الکتروفورزی پروتئینهای HMG استخراج شده از کالوس بر اساس دو روش اولیه فوق را نشان می دهد. به طوری که مشاهده می شود در استخراج مستقیم باندهای دیده نمی شود. وقتی زمان هموژنیزاسیون افزایش یافت باندهای بسیار ضعیفی به همراه اسمیر دیده می شد. از آنجایی که در استخراج پروتئینهای HMG با اسیدپرکلریک چه در زمینه کالوس و چه در مورد سوسپانسیونها باندهای خیلی

به طوری که مشاهده می شود آنتی بادی، هیستونهای هسته مرکزی را در نمونه استخراجی برگ شناسایی نموده است، اما پروتئینهای استخراج شده از سوسپانسیون سلولی را شناسائی نمودند. در مجاورت هیستون H1 برای هیچ یک از نمونه ها باندی دیده نشد. با توجه به اندازه گیری فاصله میان هیستون H1 و هیستونهای Core به نظر می رسد باند ظاهر شده در نمونه استخراج شده از برگ مربوط به هیستونهای H2A و H2B باشد. نمونه های HMG سلولهای سوسپانسیون برگ سیب زمینی با آنتی بادی علیه

از روشهای مشابه آنچه برای سلولهای جانوری به کار می رود و استخراج و با استفاده از روش ژل الکتروفورز و واکنش با آنتی بادی بر علیه هیستونهای جانوری مورد بررسی قرار گرفتند. در روشهای استخراجی که برای انواع مختلف بافت به کار رفت، از بافرهای مختلفی برای شستشو استفاده گردید. بافر a محلولی است که معمولاً برای سلولهای جانوری استفاده می شود. در بافر شستشو b از Triton X-100 برای شکستن دیواره سلولی استفاده گردید و در بافر c از β -مرکاپتواتانول که در سلولهای گیاهی برای تخریب کمتر پروتئینها توسط سیستمین پروتئازها و ترکیبات فنلی درحین مراحل شستشو به کار می رود و SDS که با اتصال به پروتئینهای غشاء موجب تخریب آن می شود استفاده گردید.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سلولهای کالوس، سلولهای مناسبی برای استخراج نبودند، احتمالاً این امر به علت واکنشی شدن این سلولها و حجم کم هسته این سلولها در مقایسه با کل سلول در ارتباط با از دست دادن تمایز بود. در زمینه سلولهای برگ و سوسپانسیون سلولی باندهایی دیده می شد که برای شناسایی این باندها از تکنیک وسترن بلائینگ، استفاده گردید.

هیستون H1 نیز معمولاً در بافتها، گونه ها و شرایط نموی مختلف تفاوت زیادی نشان می دهد و دارای تفاوتهای زیادی هم در گیاهان و هم در جانوران است که هم در وزن مولکولی و هم در محتویات آمینو اسیدی با هم تفاوت دارند (۸). سکانس این پروتئین در گیاهان کمتر مطالعه شده است ولی نکته مسلم این است که این هیستون در گیاهان و جانوران دارای شباهتهای بسیاری است. یکی از گزارشهای موجود توسط Hurley و Stout (۱۹۸۰) نشان می دهد که این هیستون در ذرت نظیر سایر هیستونهای H1 دارای وزن مولکولی بیشتری نسبت به همتای جانوری خود می باشد (۷). همان طور که در جانوران نشان داده شده است، در گیاهان نیز میزان نسبی

زمانهای مختلف هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند و هضم DNA با غلظت ۱۰ Unit آنزیم میکروکوکال به مدت ده دقیقه در بهترین شرایط انتخاب شد. DNA هضم شده قبل از استخراج به مدت یک ساعت در مجاورت RNAase و سپس ۱ ساعت در مجاورت بافر لیز سلولی قرار گرفت و بعد با فنل استخراج شد و بر روی ژل آگارز الکتروفورز گردید. همانطور که در شکل ۸ دیده می شود DNA در اثر هضم آنزیمی به حالت نردبانی قرار گرفته است که تعداد جفت بازهای باندهای مربوط به آن، از قرار دادن میزان حرکت نسبی باندها در ژل، در نمودار کالیبراسیونی که از لگاریتم تعداد جفت بازهای (اندازه قطعات DNA) باندهای مارکر فاز ۸ هضم شده به وسیله EcoRI-HindIII در مقابل حرکت نسبی این باندها کشیده شده بود (شکل ۷)، حاصل شد.

به طوری که در شکل ۸ مشخص است، باندهای تفکیک شده ای بر روی ژل موجود است. باند شماره ۱ که کوچکترین اندازه را دارد، حدود ۱۵۸ جفت باز است. شکل ۸B منحنی حرکت الکتروفورزی باندها بر حسب تعداد جفت باز را نشان می دهد. به طوری که مشاهده می شود، باندها مضربی از ۱۵۸ جفت باز می باشند.

بحث

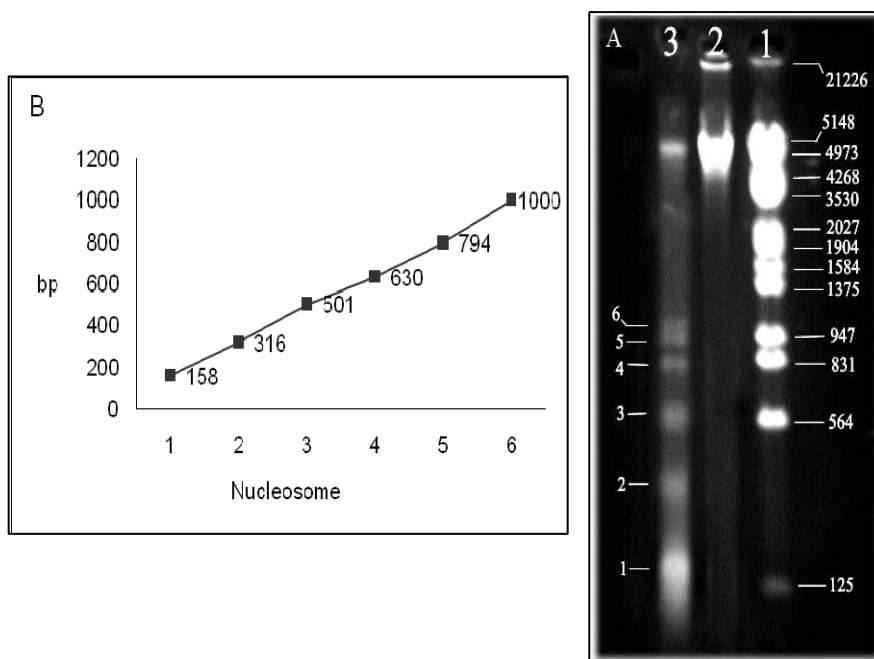
هیستونها در تمام سلولهای عالی یوکاریوتی وجود داشته و در گیاهان و جانوران تا حدودی حفاظت شده اند. هیستونهای گیاهی از نظر وزن مولکولی و زیرجزءهای مختلف دارای تفاوتهایی نسبت به جانوران هستند. در اکثر گیاهان هیستونهای H2A و H2B بر روی ژل حرکت کندتری نسبت به همتای جانوری خود دارند و تعداد باندهایشان نیز بیشتر است. هیستونهای H3 و H4 در گیاهان و جانوران تا حدود زیادی محافظت شده اند (۲).

در این مطالعه پروتئینهای هیستونی سلولهای برگ، سوسپانسیون سلولی و کالوس گیاه سیب زمینی با استفاده

جانوران هستند، نظیر آنچه که در مورد گندم دیده شده بود (۲۲). در گیاهان، عمدتاً هیستونهای H3 و H4 بر روی ژل الکتروفورز حرکتی مشابه همتای جانوری خود دارند در حالی که H2A و H2B بر روی ژل SDS-PAGE حرکت کندتری نسبت به همتای جانوری خود نشان می دهند و تعداد باندها نیز بیشتر است در حالی که در مورد هیستونهای جانوری H2A و H2B در ژل SDS هر کدام تنها به صورت یک باند دیده می شوند. مطالعات با استفاده از ژل دو بعدی نشان داده است که در گندم سه واریته اصلی H2A و چهار واریته اصلی H2B دیده می شود (۱۲).

واریته های این هیستون در شرایط مختلف نمو تغییر می کند. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، به نظر می رسد به علت تنوعی که در هیستون H1 در انواع گونه ها و بافتها وجود دارد (۲۵)، آنتی بادی جانوری قادر به شناسایی آن نیست و این به علت تفاوت زیاد میان این پروتئین در گیاه سیب زمینی با همتای جانوری خود می باشد.

در مطالعه ای که در گیاه *Arabidopsis thaliana* انجام شده است (۱۴) حداقل سه واریته برای هیستون H2A و هفت واریته برای هیستون H2B یافت شده است که این امر نشان می دهد که گیاهان از نظر هیستونها (وزن مولکولی و تعداد واریته ها) دارای تنوعاتی نسبت به



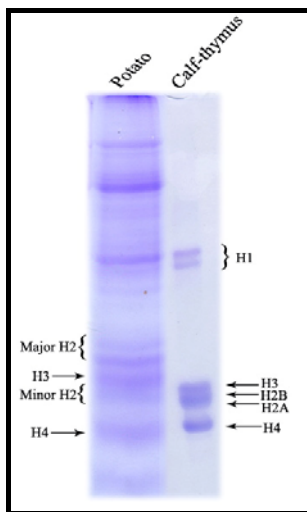
شکل ۸ - A) طرح الکتروفورزی DNA استخراج شده از سلولهای برگ و هضم شده به وسیله ۱۰ Unit آنزیم میکروکوکال نوکلئاز به مدت ۱۰ دقیقه بر روی ژل آگارز ۱/۸ درصد. (۱) مارکر DNA فاژ λ هضم شده به وسیله EcoRI-HindIII (۲) DNA برگ قبل از افزودن آنزیم (۳) DNA برگ هضم شده توسط آنزیم (B) نمودار تعداد نوکلئوزوم بر اساس جفت بازهای حاصل از ژل

مطالعاتی که با استفاده از سکانس نوکلئوتیدی انجام گرفته است نشان می دهد که عمده تنوعات واریته ای هیستونی در جانوران در اثر تفاوت در محتویات اسیدهای آمینه حاصل می شود در حالی که در گیاهان و تعداد کمی از جانوران انواع واریته های هیستونی در وزن مولکولی تفاوت دارند (۲). به نظر می رسد که واریته های هیستونی

مطالعاتی که با استفاده از سکانس نوکلئوتیدی انجام گرفته است نشان می دهد که عمده تنوعات واریته ای هیستونی در جانوران در اثر تفاوت در محتویات اسیدهای آمینه

بالات برگ مربوط به وارپته های فرعی از هیستونهای H2A و H2B از گیاه سیب زمینی می باشد.

بنابراین می توان هیستونهای هسته مرکزی استخراج شده از سلولهای گیاه سیب زمینی را با توجه به آزمایشات فوق و وزن مولکولی و میزان حفاظت شدگی آنها به صورت شکل ۹ نامگذاری نمود.



شکل ۹ - مقایسه پروفیل الکتروفورزی پروتئینهای هیستونی استخراج شده از برگ سیب زمینی و هیستونهای تیموس بر روی ژل SDS-PAGE ۱۵ درصد.

پروتئینهای غیر هیستونی HMG در گیاهان نیز نظیر جانوران نقش تنظیمی در بیان ژن دارند. اولین مطالعات بر روی پروتئینهای HMG گیاهی توسط Spiker بر روی جنین گندم انجام شد (۲۱) که چهار پروتئین HMG در آن شناسایی گردید (HMGa-d) که بر روی ژل SDS-PAGE وزن مولکولی بالاتری را نسبت به همین پروتئینها در جانوران نشان می دادند. بعدها مطالعات ایمونولوژیکی و آنالیز سکانسی انتهای آمینی (۱۷) گندم تفاوتهای بیشتری را میان پروتئینهای HMG اصلی گیاهی و جانوری نشان داد، به طوری که آنتی بادی ویژه HMG جوجه نتوانست بخوبی پروتئینهای HMG گندم را شناسایی کند و مشخص کرد که این پروتئینها خصوصیات آنتی ژنتیکی مشترکی ندارند.

علاوه بر نقشهای ساختاری، نقشهای متفاوتی را در تنظیم بیان ژن و سایر فعالیتهای فیزیولوژیکی نشان می دهند.

با توجه به تمامی آزمایشات فوق در مورد هیستونهای گیاه سیب زمینی و تحقیقات انجام شده بر روی هیستونهای گیاهانی نظیر گندم و نخود و Arabidopsis و با توجه به اینکه آنتی بادیهیهای به کار رفته در این آزمایش عمدتاً هیستونهای H2A و H2B را شناسایی می کنند، می توان به نتایج زیر رسید:

باند ظاهر شده در بالات سلولهای برگ سیب زمینی، مربوط به وارپته های فرعی H2A و H2B می باشد. زیرا H2A و H2B وارپته های مختلفی در گیاهان از جمله سیب زمینی دارند. دو نوع از این وارپته ها که احتمالاً نسبت به وارپته های دیگر H2A و H2B به میزان کمتری بیان می شوند مشابه همتای خود در بافت تیموس هستند. زمانی که مقدار زیادی از پروتئینهای هیستونی استخراج شده از بافت برگ مورد استفاده قرار گرفت، آنتی بادیهیهای جانوری به علت حساسیت فوق العاده زیادی که دارند توانستند این مقدار کم از این وارپته ها را شناسایی نمایند (شکل ۲) ولی چنین واکنشی را در مورد نمونه های قبلی که از سوسپانسیون حاصل شده بود (شکل ۲) نشان ندادند. چرا که در این نمونه ها به علت کم بودن مقدار پروتئینی که بر روی ژل برده شده بود یا در مواردی به علت کم بودن پروتئین استخراج شده، این وارپته های فرعی نسبت به وارپته های اصلی بر روی ژل نمودار نشدند و آنتی بادیهیهای جانوری نیز قادر به شناسایی آنها نبودند (شکل ۲). بنابراین، به نظر می رسد وارپته های اصلی هیستونهای H2A و H2B که به صورت باندهای واضح تری موجود می باشند در بالای هیستون H3 قرار دارند و از نظر وزن مولکولی با همین وارپته ها در جانوران متفاوت می باشند و عمدتاً مشابه الگوی این هیستونها در گیاهان دیگر، همان طور که در فوق توضیح داده شده است می باشند و باند ظاهر شده در

یابد ولی این باندها همگی از نظر تعداد جفت باز تا حدودی مضربی از ۱۵۸ جفت باز هستند و با توجه به اطلاعات به دست آمده در این تحقیق تعداد جفت بازهای نوکلئوزوم در گیاه سیب زمینی ۱۵۸ جفت باز است و باند ۱ نماینده مونوکلوئوزوم ها می باشد و باند ۲ نماینده دی نوکلئوزوم تا باند شش که هگزا نوکلئوزوم را نشان می دهد.

تعداد جفت بازهای نوکلئوزوم برای اولین بار در گیاهان، در سال ۱۹۷۵ توسط Mcghee و Engel در مورد گیاه نخود و با هضم آنزیمی توسط آنزیم میکروکوکال نوکلئاز ± 30 ۱۷۰ جفت باز تخمین زده شد (۱۶). پس از آنها دانشمندان مختلفی بر روی گیاهان مختلف آزمایشاتی را انجام دادند. به عنوان مثال در گیاه توتون، این مقدار 192 ± 8 جفت باز است و به طور کلی در مطالعات پیرو نشان داده شد که تعداد جفت بازهای نوکلئوزوم در گیاهان مختلف ۱۷۰ تا ۲۰۰ جفت باز متغیر می باشد. همچنین مطالعات مختلف بر روی سایر موجودات یوکاریوتی اعم از گیاهان و جانوران نشان داده که تعداد جفت بازهای نوکلئوزومی در زیرجزء های مختلف متفاوت می باشد.

برای پروتئینهای غیر هیستونی HMG نیز مطالعاتی به موازات پروتئینهای هیستونی بر روی برگ، سوسپانسیون سلولی و کالوس سیب زمینی انجام شد. همان طور که دیده شد، نمونه های حاصل از سوسپانسیون و برگ سیب زمینی با آنتی بادی HMG جانوری واکنش نشان نمی دهند. بنابراین به نظر می رسد که پروتئینهای HMG گیاه سیب زمینی از ۴ پروتئین تشکیل شده است که از نظر وزن مولکولی و خصوصیات آنتی ژنتیکی با همتای خود در سلولهای جانوری متفاوت می باشند. همچنین به طور کلی نمک کلرید سدیم برای گیاه سیب زمینی محلول استخراجی بهتری نسبت به اسید پرکلریک برای استخراج پروتئینهای HMG بود.

در این مطالعه پس از هضم آنزیمی DNA برگ سیب زمینی با آنزیم میکروکوکال نوکلئاز در زمان ۱۰ دقیقه و غلظت مناسب از آنزیم و بردن بر روی ژل آگارز، شش باند عمده دیده شد.

با به دست آوردن تعداد جفت بازهای باندهای شماره گذاری شده در شکل ۸ به نظر می رسد که با وجودی که اندازه DNA در باندهای شماره گذاری شده افزایش می

منابع

- 1- Bradbury, E. M. (2002) Chromatin structure and dynamics: state-of-the-art, *Mol. Cell* 10, 13-19
- 2- Chaboute, M. E., Chaubet, N., Gigot, C., and Philipps, G. (1993) Histones and histone genes in higher plants: structure and genomic organization, *Biochimie* 75, 523-531.
- 3- Dellaporta, S. L., wood, J. and Hicks, J.B. (1983) A plant DNA miniprep, *Mol. Biol. reporter*. 1, 19-21.
- 4- Goodwin, G. H. and Johns, E. W. (1977) The isolation and purification of high mobility group (HMG) non-histone chromosomal proteins., *Methods Cell Biol.* 16, 69-75.
- 5- Goodwin, G. H., Woodhead, L., and Johns, E. W. (1977) The presence of high mobility group non-histone chromatin proteins in isolated nucleosomes, *FEBS Lett.* 73, 85-88.
- 6- Halim, V. A., Vess, A., Scheel, D., and Rosahl, S. (2006) The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence, *Plant Biol. (Stuttg)* 8, 307-313.
- 7- Hurley, C. K., and Stout, J. T. (1980) Maize histone H1: a partial structural characterization, *Biochemistry* 19, 410-416
- 8- Izzo, A., Kamieniarz, K., and Schneider, R. (2008) The histone H1 family: specific members, specific functions?, *Biol. Chem.* 389, 333-343.
- 9- Johns, E. W. (1964) Studies on histones, *Biochem. J.* 92, 5559-5564.
- 10- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.

- 11- Lindner, H. H. (2008) Analysis of histones, histone variants, and their post-translationally modified forms, *Electrophoresis* 29, 2516-2532.
- 12- Loidl, P. (2004) A plant dialect of the histone language, *Trends Plant Sci.* 9, 84-90.
- 13- McGhee, J. D., Engel, E. W. (1975) Subunit structure of chromatin is the same in the plants and animals, *Nature* 254, 449-450.
- 14- Moehs, C. P., McElwin, E.F. and Spiker, S. . (1988) Chromosomal proteins of Arabidopsis thaliana, *Plant Mol. Biol.* 11, 507-515
- 15- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant* 15, 473-497..
- 16- Murray, M. G. a. Kennord, W. C. . (1984) Altered chromatin conformation of the higher plant gene phaseolin, *Biochemistry* 23, 4225-32.
- 17- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., and Bonner, W. (2002) Histone H2A variants H2AX and H2AZ, *Curr Opin Genet Dev.* 12, 162-169.
- 18- Redon, D., Albert, P., Lacorre-Arescaldino, I. and Bierne, J. (1999) Electrophoresis heterogeneity of grapevine histones, (50), 13-18.
- 19- Rey, P., Pruvot, G., Becuwe, N., Eymery, F., Rumeau, D., and Peltier, G. (1998) A novel thioredoxin-like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants, *Plant J.* 13, 97-107.
- 20- Spiker, S. (1988) Histone variants and high mobility group non-histone chromosomal proteins of higher plants: Their potential for forming a chromatin structure that is either poised for transcription or transcriptionally inert, *Physiol. Plant* 74, 200-213.
- 21- Spiker, S., and Everett, E. M. (1987) Blotting index of dissimilarity: use to study immunological relatedness of plant and animal high mobility group (HMG) chromosomal proteins, *Plant Mol. Biol.* 9, 431-442.
- 22- Spiker, S., Hopkinsb, R., Fischerb, R. and Quatrano, R.S. (1987) Histones and histone genes in higher plants: structure and genomic organization, *Biochimica et Biophysica Acta.* 910, 157-162.
- 23- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 76, 4350-4354.
- 24- Zhang, K., Siino, J. S., Jones, P. R., Yau, P. M., and Bradbury, E. M. (2004) A mass spectrometric "Western blot" to evaluate the correlations between histone methylation and histone acetylation, *Proteomics* 4, 3765-3775.
- 25- Zlatanova, J., Caiafa, P., and Van Holde, K. (2000) Linker histone binding and displacement: versatile mechanism for transcriptional regulation, *FASEB J.* 14, 1697-1704.

Identification of chromatin proteins and DNA repeat length in *Solanum tuberosum*

Aramvash A. and Rabbani Chadegani A.

Biochemistry Dept., Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Chromatin is a complex of DNA, RNA, histones and nonhistone chromosomal proteins. Identification of these proteins help us for better understanding of different mechanisms of gene expression. There are several methods for extraction of histones and nonhistone proteins from animal cells, but less information of a comparable state is available for plants. Also, biochemical evidence has shown that the DNA repeats length in micrococcal nuclease digests of the chromatin of higher eukaryotes varies widely. In this study, potato leaf cells, cell suspensions and calli were extracted with different methods using acids and salts. Then the proteins were analyzed on SDS polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted against histones and HMG antisera. The results show that histones H3 and H4 are relatively the same as their animal counterparts but H2A and H2B in potato are larger than their animal counterparts and exist as a several molecular weight variants. Also HMG proteins exhibit four main proteins in total tissue extract potato leaves and their electrophoretic pattern is different from mammalian HMG proteins. The potato leaf HMG proteins could not be detected by immunoblotting against thymus HMG antisera. Examination of extensive Micrococcal nuclease digest suggests that the DNA repeat length is approximately 158 base pairs which are shorter than the DNA repeat length of mammals and also other plants. It is concluded that there is little homology between the chromatin proteins and DNA repeat length of the animals and potato leaf cells.

Keywords: potato, nucleosome, histones, non-histone proteins, electrophoresis