

УДК 582.542.1:577.112:547.96:581.174.1

ПЕРВИЧНЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ХЛОРОПЛАСТОВ ОЗИМОЙ РЖИ И МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ЕГО ПРОВЕДЕНИЮ

А.А. КУЗОВКОВА, Е.В. СПИРИДОВИЧ, В.Н. РЕШЕТНИКОВ

Государственное научное учреждение «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»

220012 Минск, ул. Сурганова, 2В

e-mail: floraia@nm.ru

Методом 2D-электрофореза (изоэлектрофокусирование на IPG-стрипах и электрофорез в денатурирующей системе в щелочных условиях) в хлоропластах 168-часовых проростков озимой ржи обнаружено около 250 легкорастворимых и 100 труднорастворимых хлоропластных белков. Некоторые из них первично идентифицированы.

Ключевые слова: озимая рожь, хлоропласты, протеомный анализ.

В настоящее время логическим продолжением проектов по секвенированию геномов растений (геномика растений) является определение белковых продуктов генов (протеомика растений) [3]. Сегодня активно исследуются протеомные вариации как между различными геномами растений, так и внутри одного генома. По характеру спектра идентифицированных белков проанализированы изменения в экспрессии генов растений в различных тканях, органах, органеллах и субклеточных компартментах в процессе их роста и развития [9, 13] в ответ на воздействие внутренних и внешних факторов (обработка гормонами, химическими соединениями, биотический, абиотический стрессы) [11, 16, 18].

Анализ специфических белков, связанных с определенными биологическими процессами, составляет суть «функциональной протеомики». Она сконцентрирована на идентификации индивидуальных белков, которые модифицируются или синтезируются с генов, дифференциально экспрессирующихся в ответ на внешнее воздействие или вследствие внутриклеточных структурно-функциональных процессов. Современными методами «функциональной протеомики» можно проанализировать белковые фракции лимитированной сложности из-за широкого круга ограничений, присущих применяемым сегодня протеомным методам исследования. Одним из главных ограничений, например для 2D-электрофореза, является доминирование в окрашенном геле мажорных белков, тогда как минорные трудно детектировать, а значит, и идентифицировать [4, 5].

Проблему идентификации белков, содержащихся в низких количествах, можно обойти, если анализировать специфические субпротеомы, например, в хлоропластах субпротеомы системы мембран оболочки или системы тилакоидных мембран [7, 17]. Мы описали методические подходы к широкомасштабному протеомному анализу хлоропластов озимой

ржи с использованием 2D-электрофореза, включающего изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) и электрофорез в денатурирующей системе в щелочных условиях, представили 2D-электрофореграммы легко- и труднорастворимых хлоропластных белков озимой ржи сорта Верасень, а также попытались первично проанализировать протеом хлоропластов данного вида злаковых с использованием программы 2D Phoretix и сопоставить его с представленными в литературных источниках данными о протеомах других видов растений.

Методика

Объектом исследований были 168-часовые проростки озимой ржи (*Secale cereale* L.) сорта Верасень. Зерновки ржи промывали в растворе хозяйственного мыла, обеззараживали в растворе перманганата калия. Проростки выращивали в лабораторных условиях на покрытых марлей решетках на водопроводной воде при +22 °С, освещенности 3–5 клк, фотопериоде — 16 ч. Выделение хлоропластов осуществляли по Гавриленко и др. [1] с некоторыми модификациями. Все процедуры проводили на холоде. В качестве среды выделения использовали 0,25 М *трис*-HCl буфер (рН 7,8) с 0,4 М сахарозы, 4 мМ цистеина, 10 мМ этилендиаминтетраацетата и 0,01 М MgCl₂ (буфер А) [2]. Хлоропласты подвергали очистке в градиенте сахарозы: верхний слой — 25 % (м/м), средний — 34, нижний — 51 %. Полученный осадок хлоропластов хранили при температуре —20 °С.

Хлоропластные белки разделяли на 2 фракции по степени растворимости (условно обозначенные как легко- и труднорастворимые). Замороженные хлоропласты лизировали в двойном объеме 0,25 М *трис*-HCl буфера (рН 7,8) с 4 мМ цистеина, 10 мМ этилендиаминтетраацетата, 0,01 М MgCl₂ и 0,8 мМ ингибитора сериновых протеаз диизопропилфлуорофосфата (буфер Б) в холодильнике в течение 30 мин. Лизированные хлоропласты центрифугировали 10 мин при 10 000 g, надосадочную жидкость (легкорастворимые белки) сливали в пробирку, осадок вновь заливали буфером. Процедуру повторяли 3–4 раза для полного выхода легко- и труднорастворимых белков. Для выделения труднорастворимых белков к осадку добавляли двойной объем буфера Б с 1 % (о/о) тритона X-100. Далее следовали алгоритму выделения легко- и труднорастворимых белков. Из надосадочной жидкости белки осаждали 5 объемами 100 %-го ацетона в течение ночи, после чего центрифугировали 20 мин при 10 000 g. Полученные осадки легко- и труднорастворимых белков отмывали от хлорофилла, залив 5 Е g. Процедуру повторяли до полной экстракции хлорофилла. Полученные осадки белков растворяли в 100–200 мкл буфера Б.

Легко- и труднорастворимые хлоропластные белки очищали от примесей, мешающих ИЭФ (соли, детергенты и др.), с помощью набора реагентов 2D Clean-Up Kit (GE Healthcare, США). Очищенный и сконцентрированный осадок растворяли в 50 мкл регидратирующего раствора (GE Healthcare, США), содержащего 0,5 % (о/о) буфера IPG 3–11 NL (GE Healthcare, США). Количество вносимого белка и тип буфера IPG в регидратирующем растворе определяется типом сухих полиакриламидных гелевых полосок (стрипов) с иммобилизованным градиентом рН (GE Healthcare, США), на которых проводится ИЭФ. Для исследования хлоропластных белков озимой ржи сорта Верасень использовали стрипы рН 3–11 NL длиной 11 см (GE Healthcare, США). Нагрузка белка на данный тип стрипов составляла 30–100 мкг. Легко- и труднорастворимые хлоропластные белки озимой ржи загружали в количестве соот-

ответственно 70 и 60 мкг, что было установлено эмпирически. Содержание белка в образце определяли с помощью набора реагентов 2D Quant Kit (GE Healthcare, США), который позволяет оценить концентрацию белка в микроколичествах образца (1–50 мкл). При этом содержание белка в выбранном объеме образца должно быть >0,5 и <50 мкг.

Стрипы предварительно регидратировали в специальной кювете (GE Healthcare, США) в течение 20 ч при комнатной температуре в 200 мкл регидратирующего раствора (описан выше), содержащего 70 или 60 мкг образца. Изофокусирование на стрипах проводили при комнатной температуре на приборе Multiphor II (Amersham Pharmacia, Швеция), используя дополнительные специальные аксессуары для стрипов (GE Healthcare, США). Источником тока служил прибор ECSP 2000/300 (Amersham Pharmacia, Швеция). Изофокусирование проводили в следующем режиме: 1-й шаг — 300 В в течение 4 ч (1200 В · ч), 2-й шаг — 1200 В в течение 14,5 ч (17 400 В · ч).

После ИЭФ белков стрипы уравнивали с буферными системами для вертикального электрофореза белков в денатурирующих условиях в щелочной системе. С этой целью стрипы инкубировали дважды по 15 мин (со сменой раствора) при покачивании в кювете с 15 мл 0,05 М *трис*-HCl буфера (pH 6,8), содержащего 30 % глицерина и 1 % (о/о) додецилсульфата натрия. Вертикальный электрофорез белков в денатурирующих условиях в щелочной системе по методу Леммли [12] проводили на пластинках размером 18 × 24 см, где полиакриламидный гель (60 % (м/о) акриламидметилена-*бис*-акриламид, C = 3) имел толщину 0,1 см с концентрацией мономеров в разделяющем геле 12 % (о/о), в концентрирующем — 6 % (о/о). При заливке концентрирующего геля использовали препаративную гребенку. Электрофорез проводили в буфере, содержащем 0,025 М *трис*-HCl, 0,192 М глицина (pH 8,3) и 0,1 % (о/о) додецилсульфата натрия, при постоянной силе тока 20 мА в течение 40 мин и далее 30 мА в течение 4 ч 50 мин. После разделения белки фиксировали и окрашивали раствором серебра, используя набор реагентов PageSilver™ (Fermentas, Литва). Параллельно с исследуемым образцом разделяли белки-маркеры диапазона мол. м. 116–14,4 кД (Fermentas, Литва). Окрашенные гели фотографировали цифровой фотокамерой и обрабатывали в программе 2D Phoretix.

Результаты и обсуждение

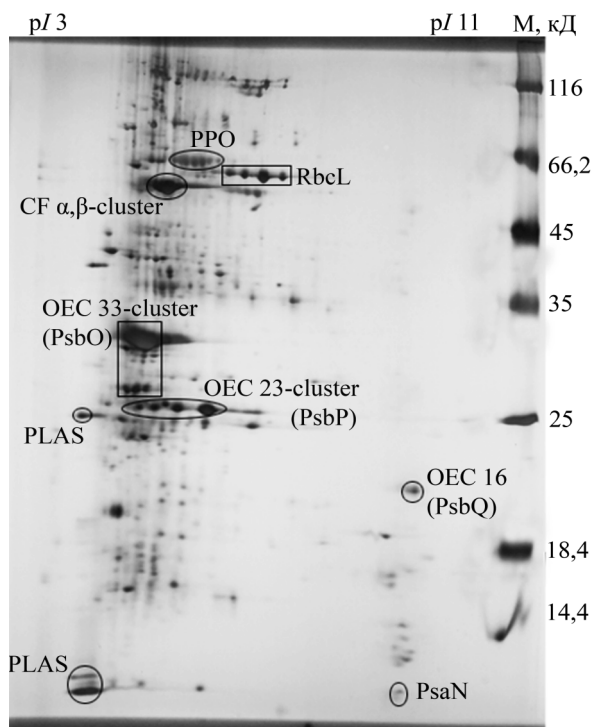
Благодаря расшифровке генома *Arabidopsis thaliana* стала возможной первичная оценка протеома хлоропластов методами предсказания белков. С использованием компьютерных программ TargetP или ChloroP и специфических N-концевых последовательностей ядернокодируемых белков, облегчающих их импорт в хлоропласт (так называемые транзитные пептиды), предсказано существование в хлоропластах более 3600 протеинов (<http://mips.gsf.de>) [4, 6]. По другим данным предполагается, что пластиды всех типов содержат от 2000 до 4000 различных белков, среди которых приблизительно 550 — α -спиральные, интегрированные в тилакоиды и мембраны внутренней оболочки. Количество периферических белков, связанных с этими мембранами, пока неизвестно. Строма, вероятно, содержит больше 1000 протеинов [19]. Однако оценка протеома органелл на основе компьютерного предсказания локализации белков дает далеко не полные и недостаточно надежные данные, поэтому важным дополнительным подходом к получению новой информации о бел-

ках пластид является применение таких методов протеомного анализа, как 2D-электрофорез, аффинная хроматография и масс-спектрометрия. С помощью данных методов в течение последних 5 лет получена ценная информация о количестве и локализации хлоропластных белков по субклеточным компартментам [4, 8]. Так, Клеффман и др. [10] установили, что полный протеом хлоропластов *A. thaliana* включает всего 636 белков, при этом 604 белка кодируются ядерной ДНК и 32 — хлоропластной.

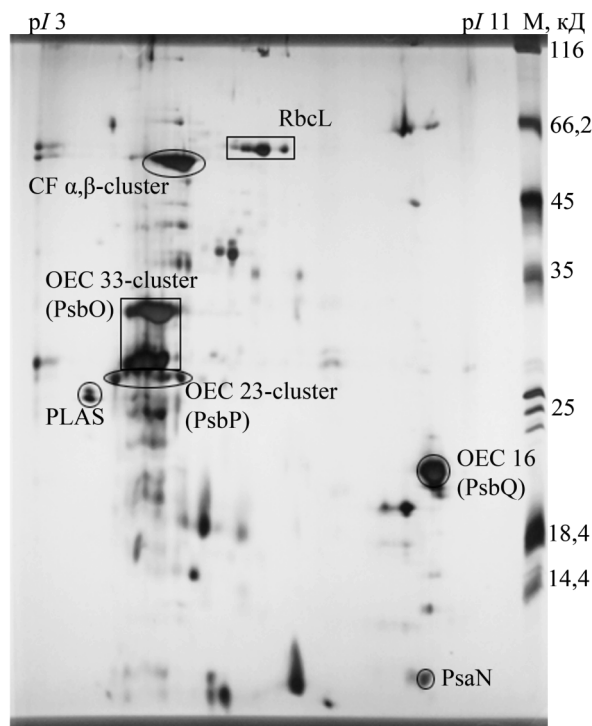
На рисунке представлены 2D-электрофореграммы легко- и труднорастворимых хлоропластных белков 168-часовых проростков озимой ржи сорта Верасень, полученные при проведении ИЭФ на стрипах рН 3—11 NL длиной 11 см (GE Healthcare, США) с нагрузкой белка соответственно 70 и 60 мкг. Проведение ИЭФ в полиакриламидном геле с иммобилизованным градиентом рН позволило преодолеть проблемы воспроизводимости результатов, разрешения и разделения сильнокислых и (или) основных белков, определяемые амфолитами, формирующими градиент рН [20]. Выбор стрипов с иммобилизованным градиентом рН в диапазоне 3—11 был оптимальным для проведения широкомасштабного протеомного анализа хлоропластов, поскольку диапазон рI и легко-, и труднорастворимых хлоропластных белков очень широк, хотя большая часть белков имеет рI от 4 до 6. Эмпирически подобранная нагрузка белка на стрип также представляется оптимальной, так как позволила получить достаточно четкую 2D-электрофореграмму, несмотря на содержание ряда белков в больших количествах.

В ходе первичного протеомного анализа во фракции легкорастворимых хлоропластных белков 168-часовых проростков озимой ржи выявлено около 250 белков (см. рисунок, а). Некоторые группы белков, содержащихся в больших количествах, были предположительно идентифицированы на основании представленных в литературе 2D-электрофореграмм хлоропластных белков *Arabidopsis* [14], гороха [15] и кукурузы [13] (таблица). В частности, это изоформы полифенолоксидазы (PPO), большие субъединицы рибулозо-*bis*-фосфаткарбоксилазы (RbcL), белки АТФ-синтетазного (CF α , β -cluster) и кислородвыделяющего (OEC 33-cluster, OEC 23-cluster, OEC 16) комплексов, пластоцианины (PLAS) и белок PsaN фотосистемы I. Во фракции труднорастворимых хлоропластных белков 168-часовых проростков озимой ржи выявлено около 100 белков (см. рисунок, б). Из них первично идентифицированы RbcL, CF α , β -cluster, OEC 33-cluster, OEC 23-cluster, OEC 16, PLAS и PsaN, т.е. те же белки, что и во фракции легкорастворимых белков, за исключением PPO. Однако, как видно из 2D-электрофореграмм, представленных на рисунке, при меньшем количестве вносимого в ПААГ белка (60 против 70 мкг) содержание OEC 33-cluster, OEC 16 и PsaN во фракции труднорастворимых хлоропластных белков выше, что свидетельствует о сильной связи этих белков с хлоропластными мембранами. Подобное перекрытие 2D-электрофореграмм — частое явление. Например, Пелтиер и др. [15], исследовав люменные и периферические тилакоидные белки хлоропластов гороха, установили 39 % перекрытия люменной и периферической 2D-электрофореграмм. Неустойчивая связь белков с тилакоидной мембраной может быть частью их функции (например, как у пластоцианина) или наблюдаться во время биогенеза тилакоида и сборки белковых комплексов (например, как у белков OEC). Однако при анализе 2D-электрофореграмм всегда можно четко различить белки, легко переходящие в раствор и преимущественно связанные с мембранами. При 2D-электрофорезе с ИЭФ в качестве 1-го направления для боль-

шинства белков экспериментально определенных молекулярные массы совпадают с теоретически рассчитанными. Однако в некоторых случаях (например, для ферредоксина, пластоцианина, CF_{1γ}) один и тот же белок имеет фактическую молекулярную массу больше теоретической. В работе Пелтиера и соавт. [15] ферредоксин с мол. м. 11 кД представен слабо выраженным пятном на уровне 30 кД и *pI* 5,0. Во время ИЭФ молекулы ферредоксина агрегируют, что модифицирует как значение молекулярной массы, так и экспериментально полученное значение *pI* (теоретическое значение *pI* мономерного ферредоксина ниже 4,0). Такая ситуация также характерна для пластоцианина [15]. Чтобы подсчитать общее число функционально различных белков среди наблюдаемого числа пятен, необходима поправка на различные изоформы, посттрансляционные модификации, РНК-редактирование и протеолиз белков, поскольку именно вследствие этих процессов некоторые белки на 2D-электрофореграммах формируют шлейфы или бусы из белковых пятен (с различными значениями *pI*, но с одинаковой молекулярной массой). Это, например, характерно для белков ОЕС 33, ОЕС 23, CF_{1α}, CF_{1β}, для шаперонов БТШ 70, Срп 60 и др.



a



б

2D-электрофореграмма легко растворимых (*a*) и трудно растворимых (*б*) хлоропластных белков 168-часовых проростков озимой ржи сорта Верасень

Идентифицированные белки из протеома хлоропластов различных растений, использованные для первичного анализа протеома хлоропластов озимой ржи

Белок	Растение	Номер доступа в базах NSBI, SWISS-Prot, PIR, MIPS или TIGR Zm	Молекулярная масса, кД		pI	Литературный источник
			теоретическая	по 2D-электрофореграмме		
ОЕС 16	<i>Onobrychis vicifolia</i>	AF026400 (PIR)	25,4	17,1	9,3	[15]
ОЕС 16	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4583542 (NSBI) At4g21280 (MIPS)	—	16,7	9,3	[14]
ОЕС 16 подобный	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7267278 (NSBI) At4g05180 (MIPS)	—	16,7	9,1	[14]
ОЕС 23	<i>Pisum sativum</i>	P16059 (SWISS-Prot)	28	21,9	5,7—6,4	[15]
ОЕС 23	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7443217 (NSBI) At1g06680 (MIPS)	—	20,5	5,7—6,0	[14]
ОЕС 33	<i>Pisum sativum</i>	P14226 (SWISS-Prot)	34,9	29,8—30,2	5,5—5,8	[15]
ОЕС 33	<i>Pisum sativum</i>	P14226 (SWISS-Prot)	34,9	21,5	6,3	[15]
ОЕС 33	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3286693 (NSBI) At5g66570 (MIPS)	—	28,5	5,1—5,6	[14]
ОЕС 33 (ФС I)	<i>Zea mays</i>	15912247 13926292 (NSBI)	35,128	—	5,55 (теорет.)	[13]
ОЕС 33 (ФС I)	<i>Zea mays</i>	1508655 (NSBI)	34,861	—	6,09 (теорет.)	[13]
ОЕС 33 (ФС II)	<i>Zea mays</i>	TC81083 (TIGR Zm)	37,531	—	5,92 (теорет.)	[13]
PLAS	<i>Pisum sativum</i>	P16002 (SWISS-Prot)	17,1	9,8	4,7	[15]
PLAS	<i>Pisum sativum</i>	P16002 (SWISS-Prot)	17,1	26,9	4,7	[15]
PLAS 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1169201 (NSBI) At1g20340 (MIPS)	—	14—35	4,4—4,9	[14]
PLAS 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	130261 (NSBI) At1g76100 (MIPS)	—	28,9	4,2	[14]
RbcL	<i>Pisum sativum</i>	P04717 (SWISS-Prot)	47,3	54,3	6,6	[15]
RbcL	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1944432 (NSBI)	47,3	50,6	6,6	[14]
CF _{1α}	<i>Pisum sativum</i>	114522 (NSBI)	55,1	55—55,5	6,0—6,7	[15]
CF _{1α}	<i>Pisum sativum</i>	114522 (NSBI)	55,1	12,6	5,2	[15]
CF _{1α}	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5881679 (NSBI)	55,1	53,4	5,4—5,6	[14]
CF _{1α}	<i>Zea mays</i>	TC90687 (TIGR Zm)	55,707	—	5,86 (теорет.)	[13]
CF _{1β}	<i>Pisum sativum</i>	114560 (NSBI)	53,1	51,5—52,5	5,6—5,8	[15]
CF _{1β}	<i>Pisum sativum</i>	114560 (NSBI)	53,1	37,3	5,6	[15]
CF _{1β}	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5881701 (NSBI)	53,1	51,3	5,7—6,0	[14]
CF _{1β}	<i>Zea mays</i>	TC85581 (TIGR Zm)	54,041	—	5,31 (теорет.)	[13]

ПЕРВИЧНЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ХЛОРОПЛАСТОВ

Окончание таблицы

Белок	Растение	Номер доступа в базах NSBI, SWISS-Prot, PIR, MIPS или TIGR Zm	Молекулярная масса, кД		pI	Литературный источник
			теоретическая	по 2D-электрофореграмме		
CF _{1β}	<i>Zea mays</i>	629818 (NSBI)	59,249	—	5,56 (теорет.)	[13]
CF _{1β}	<i>Zea mays</i>	552857 (NSBI)	53,954	—	5,30 (теорет.)	[13]
CF _{1β}	<i>Zea mays</i>	6815115 (NSBI)	53,997	—	5,38 (теорет.)	[13]
CF _{1β}	<i>Zea mays</i>	874823 (NSBI)	53,717	—	5,20 (теорет.)	[13]
PsaN	<i>Hordeum vulgare</i>	P31093 (SWISS-Prot)	15,5	7,2	9,0	[по 15]
PsaN	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1709825 (NSBI) At5g64040 (MIPS)	—	12,1	9,6	[14]

[15]. Такие фотосинтетические белки, как ОЕС 23, ОЕС 33 и ферредоксин-НАДФН-редуктазы, в горохе, шпинате и табаке кодируются семействами генов, поэтому для них можно ожидать существование изоформ. Многие хлоропластные белки после трансляции модифицируются путем фосфорилирования. Малая субъединица рибулозо-бис-фосфаткарбоксилазы (RbcS) подвергается метилированию и карбамилрованию, большая (RbcL) — карбамилрованию. Белки CF₁ из АТФ-синтетазного комплекса гликозилируются, белок D1 модифицируется через пальмитоилирование. Две формы аскорбатпероксидазы — стромальная и связанная с тилакоидами — дают альтернативный сплайсинг, к гетерогенности белков ведет также редактирование мРНК. Наконец, цепочки пептидов могут быть результатом карбамилрования в ходе приготовления образца из-за содержания в буфере мочевины, даже если соблюдены все меры предосторожности [15]. Указанное необходимо учитывать при подсчете общего числа функционально различных белков.

Таким образом, в ходе анализа 2D-электрофореграмм хлоропластных белков 168-часовых проростков озимой ржи обнаружено около 250 легкорастворимых и около 100 труднорастворимых белков. Это число, вероятно, занижено, так как ряд белков с низким содержанием может маскироваться доминирующими белками ОЕС 16, ОЕС 23, ОЕС 33, CF₁ или быть ниже порога чувствительности к красителю. Визуализация этих белков может быть осуществлена после удаления протеинов ОЕС и CF₁, например, с помощью аффинной хроматографии и (или) 2D-электрофореза в более узком диапазоне pI.

1. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание / Под ред. Б.А. Рубина. — М.: Высш. шк., 1975. — 392 с.
2. Техника биохимического исследования субклеточных структур и биополимеров растительной клетки / Под ред. А.С. Вечера. — Минск: Наука и техника, 1986. — 197 с.
3. Baginsky S., Grusissem W. *Arabidopsis thaliana* proteomics: from proteome to genome // J. Exp. Bot. — 2006. — 57. — P. 1485—1491.
4. Baginsky S., Grusissem W. Chloroplast proteomics: potentials and challenges // Ibid. — 2004. — 55. — P. 1213—1220.

5. *Baginsky S., Kleffmann T., von Zychlinski A., Gruissem W.* Analysis of shotgun proteomics and RNA profiling data from *Arabidopsis thaliana* chloroplasts // *J. Proteome Res.* — 2005. — **4**. — P. 637—640.
6. *Emanuelsson O., Nielsen H., Brunak S., Heijne G.* Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence // *J. Mol. Biol.* — 2000. — **300**. — P. 1005—1016.
7. *Froehlich J.E., Wilkerson C.G., Ray W.K. et al.* Proteomic study of the *Arabidopsis thaliana* chloroplastic envelope membrane utilizing alternatives to traditional two dimensional electrophoresis // *J. Proteome Res.* — 2003. — **2**. — P. 413—425.
8. *Jarvis P.* Organellar proteomics: Chloroplasts in the spotlight // *Curr. Biol.* — 2004. — **14**. — P. 317—319.
9. *Kleffmann T., von Zychlinski A., Russenberger D. et al.* Proteome dynamics during plastid differentiation in rice // *Plant Physiol.* — 2007. — **143**. — P. 919—923.
10. *Kleffmann T., Russenberger D., von Zychlinski A. et al.* The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions // *Curr. Biol.* — 2004. — **14**. — P. 354—362.
11. *Konishi H., Komatsu S.* A proteomics approach to investigating promotive effects of brassinolide on lamina inclination and root growth in rice seedlings // *Biol. Pharmacol. Bull.* — 2003. — **26**. — P. 401—408.
12. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* — 1970. — **227**. — P. 680—685.
13. *Lonosky P.M., Zhang X., Honavar V.G. et al.* A proteomic analysis of maize chloroplast biogenesis // *Plant Physiol.* — 2004. — **134**. — P. 560—574.
14. *Peltier J.-B., Emanuelsson O., Kalume D.E. et al.* Central functions of the luminal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis thaliana* determined by experimentation and genome-wide prediction // *Plant Cell.* — 2002. — **14**. — P. 211—236.
15. *Peltier J.-B., Friso G., Kalume D.E. et al.* Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of luminal and peripheral thylakoid proteins // *Ibid.* — 2000. — **12**. — P. 319—341.
16. *Rakwal R., Komatsu S.* Role of jasmonate in the rice (*Oryza sativa* L.) self-defense mechanism using proteome analysis // *Electrophoresis.* — 2000. — **21**. — P. 2492—2500.
17. *Schubert M., Petersson U.A., Haas B.J. et al.* Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana* // *J. Biol. Chem.* — 2002. — **277**. — P. 8354—8365.
18. *Shen S., Jing Y., Kuang T.* Proteomics approach to identify wound-response related proteins from rice leaf sheath // *Proteomics.* — 2003. — **3**. — P. 527—535.
19. *Van Wijk K.J., Peltier J.-B., Giacomelli L.* Isolation of chloroplast proteins from *Arabidopsis thaliana* for proteome analysis // *Methods in molecular biology*, **335**: Plant proteomics: methods and protocols / Ed. by H. Thiellement, M. Zivy, C. Damerval, V. Mechin. — Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2006. — P. 43—48.
20. *Weiss W., Gorg A.* Two-dimensional electrophoresis for plant proteomics // *Ibid.* — P. 121—143.

Получено 29.03.2010

ПЕРВИННИЙ ПРОТЕОМНИЙ АНАЛІЗ ХЛОРОПЛАСТІВ ОЗИМОГО ЖИТА І МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ДО ЙОГО ПРОВЕДЕННЯ

Г.А. Кузовкова, О.В. Спиридович, В.М. Решетников

Державна наукова установа «Центральний ботанічний сад Національної академії наук Білорусі», Мінськ

Методом 2D-електрофорезу (ізоелектрофокусування на IPG-стріпах та електрофорез у денатурувальній системі за лужних умов) у хлоропластах 168-годинних проростків озимого жита виявлено близько 250 легкорозчинних і 100 важкорозчинних хлоропластних білків. Деякі з них первинно ідентифіковано.

PRIMARY PROTEOMIC ANALYSIS OF WINTER RYE CHLOROPLASTS AND METHODICAL APPROACHES FOR IT REALIZATION

A.A. Kuzovkova, E.V. Spiridovich, V.N. Reshetnikov

State Scientific Institution «Central Botanical Gardens of National Academy of Sciences of Belarus»
2V Surganov St., Minsk, 220012, Belarus

It was detected near 250 readily soluble and 100 hardly soluble proteins in the chloroplasts of 168-hours winter rye seedlings by 2D-electrophoresis (isoelectric focusing on the IPG-strips and SDS — electrophoresis). Some of detected proteins were identified.

Key words: winter rye, chloroplasts, proteomic analysis.

