



УДК 547.96 + 577.11

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НЕГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ  
ХРОМАТИНА, ПРОЧНО СВЯЗАННЫХ С ДНК

Оксман А. Я., Ибрагимов Р. Х., Воробьев В. И.

Институт цитологии Академии наук СССР, Ленинград

Разработан простой метод выделения прочно связанных негистоновых белков хроматина в мягких условиях, позволяющий получать эти белки достаточно полно и без существенных загрязнений другими белками хроматина.

Прочно связанные негистоновые белки хроматина выделены из зубной железы, печени и селезенки крыс, из зубной железы телят и из зародышей морского ежа *Strongylocentrotus droebachiensis* на двух стадиях развития.

По данным аминокислотного анализа, выделенные белки имеют нейтральный или слабоосновный характер. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле установлено, что эти белки малогетерогенны и характеризуются небольшим молекулярным весом. Их тканевая специфичность ниже видовой. Прочно связанные негистоновые белки, выделенные из хроматина зародышей морского ежа на стадиях бластулы и гаструлы, имеют четкие качественные различия.

Негистоновые белки хроматина могут быть разделены на две группы: белки, лабильно связанные с ДНК и другими компонентами хроматина [1, 2], и белки, прочно связанные с ДНК [3].

Негистоновые белки первой группы, экстрагируемые 0,35 М NaCl, изучены значительно лучше, чем белки второй группы, названные нами прочно связанными негистоновыми белками.

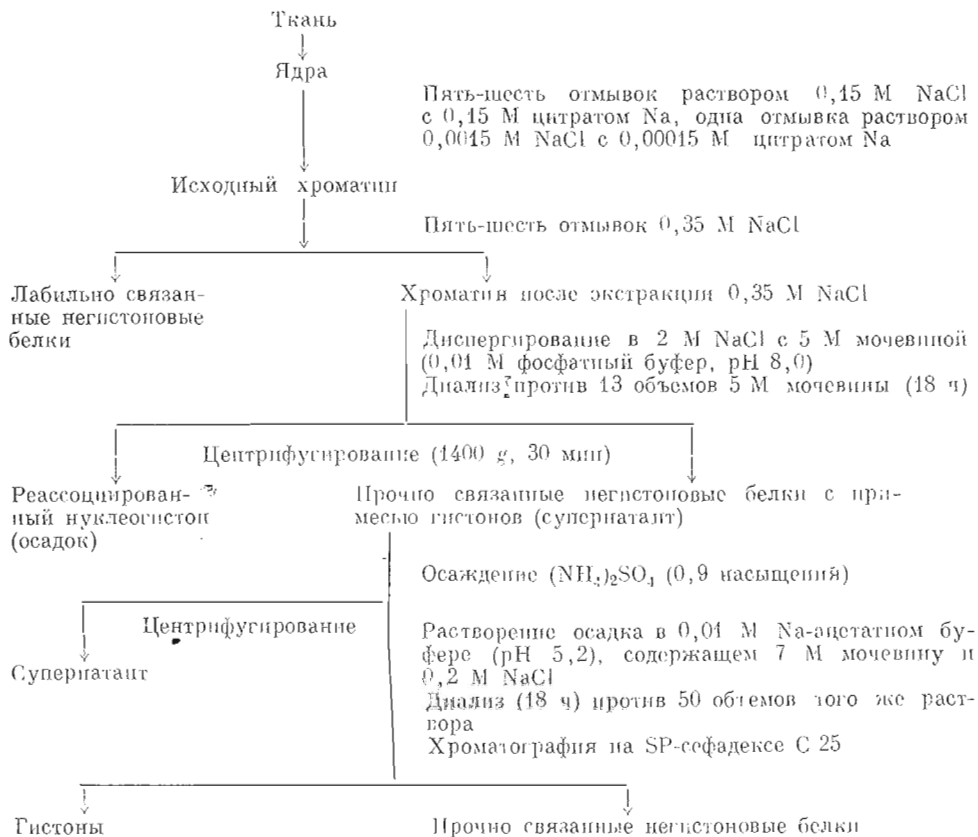
Цель данной работы заключалась в разработке простого метода выделения прочно связанных негистоновых белков в мягких условиях и в исследовании некоторых их свойств.

Разработанный нами метод выделения состоял в следующем (см. схему): после отделения лабильно связанных негистоновых белков (как описано ранее [2,4]) хроматин был диссоциирован в 2 М NaCl с 5 М мочевиной (рН 8, 0) и диализован. При этом в растворе оставались прочно связанные негистоновые белки, а гистоны реассоциировали с ДНК и выпадали в осадок.

Реассоциированный нуклеогистон удаляли центрифугированием, а к супернатанту, содержащему помимо негистоновых белков небольшое количество гистонов, добавляли порциями сульфат аммония до 0,9 насыщения. Прочно связанные негистоновые белки, осажденные сульфатом аммония, подвергали диализу и очищали от примеси гистонов с помощью хроматографии на SP-сефадексе С-25 по методу Грациано и Хуанга [5] с небольшой модификацией (см. «Экспериментальную часть»).

В предварительных опытах было установлено, что гистоны полностью задерживаются SP-сефадексом, если в элюирующем растворе содержится

Схема выделения негистоновых белков хроматина, прочно связанных с ДНК



0,25 М NaCl, и полностью вымываются при увеличении концентрации NaCl до 0,8 М. В этих модельных опытах были использованы гистоны из дезоксирибонуклеопротеида зубной железы телянка, полученные экстракцией 0,25 н. HCl [6].

В табл. 1 приведены весовые отношения белок/ДНК в исходном хроматине, в хроматине после экстракции 0,35 М NaCl и в реассоциированном нуклеогистоне для всех объектов, из которых выделяли прочно связанные негистоновые белки. Разность отношений белок/ДНК между препаратами исходного хроматина и хроматина, экстрагированного 0,35 М NaCl, соответствует содержанию лабильно связанных негистоновых белков в хроматине из этих источников [1, 2]. Весовые отношения белок/ДНК

Таблица 1

Весовое отношение белок/ДНК в хроматине из разных источников на трех этапах выделения прочно связанных негистоновых белков хроматина

Хроматин	Зубная железа		Цельная крыса	Селезенка крысы	Бластула морского ежа	Гастрюла морского ежа
	телянка	крася				
Исходный хроматин	1,4±0,05	1,4±0,05	2,3±0,05	1,6±0,05	1,45±0,05	1,75±0,05
Хроматин после экстракции 0,35 М NaCl	1,2±0,05	1,2±0,05	1,7±0,05	1,3±0,05	1,3±0,05	1,4±0,05
Реассоциированный нуклеогистон	1,0±0,05	1,0±0,05	1,0±0,05	1,0±0,05	0,95±0,05	0,90±0,05

для реассоциированных нуклеогистонов соответствуют данным о соотношении между гистонами и ДНК в хроматине из тканей млекопитающих и зародышей морского ежа *Strongylocentrotus droebachiensis* [6, 7].

Примесь гистонов, отделяемая при хроматографической очистке прочно связанных негистоновых белков на SP-сефадексе С-25, составляет для препаратов из печени и селезенки крысы, из зобной железы крысы и теленка и из зародышей морского ежа 5, 15—20 и 10—15% соответственно.

При определении полноты выделения прочно связанных негистоновых белков получали реассоциированный нуклеогистон печени и селезенки крысы и после удаления следов мочевины (3 отмывки 0,15 М NaCl с 0,015 М пикратом Na) проводили исчерпывающую экстракцию гистонов 0,25 н. HCl. Отношение белок/ДНК для кислотонерастворимых остатков составляло для печени и селезенки соответственно 0,05 и 0,03. Такие низкие величины отношения белок/ДНК получают после экстракции из хроматина суммарных белков в мягких условиях. Связанный с ДНК так называемый остаточный белок можно удалить только при весьма жестких воздействиях [8]. Электрофореграммы гистонов, экстрагированных из реассоциированного нуклеогистона, при сравнении с электрофореграммами гистонов, полученных из исходного хроматина, были практически идентичны, что указывает на отсутствие или незначительную величину протеолитической деградации белков хроматина в ходе выделения искомой фракции. Результаты этих опытов свидетельствуют о том, что в реассоциированном нуклеогистоне с ДНК связаны только кислоторастворимые белки.

Поскольку хроматографическая очистка препаратов прочно связанных негистоновых белков не может служить абсолютным показателем отсутствия примеси гистонов или возможных продуктов их протеолиза, образующихся при выделении белков, для доказательства чистоты полученных препаратов был поставлен специальный опыт (см. «Экспериментальную часть»). К хроматину после экстракции 0,35 М NaCl и диссоциации (см. схему) добавили гистоны, содержащие [<sup>14</sup>C]лизин, и анализировали радиоактивность в препаратах на последующих стадиях: до хроматографии на SP-сефадексе (фракция I), после одной (фракция II) и двух (фракция III) хроматографических очисток.

Поскольку меченые экзогенные гистоны входят в состав реассоциированного нуклеогистона, удельная радиоактивность гистонов, выделенных из этого комплекса, уменьшается в соответствии с «разбавлением» меченых гистонов гистонами хроматина. Значит, отношение удельной активности гистонов в препаратах негистоновых белков к удельной активности гистонов из реассоциированного нуклеогистона соответствует примеси гистонов в прочно связанных негистоновых белках. Как показывают данные табл. 2, содержание примеси после очистки на SP-сефадексе составляет 4—6%. Но даже эта незначительная величина, по-видимому, завышена.

Таблица 2

Определение удельной радиоактивности препаратов в опыте по проверке чистоты выделяемых прочно связанных негистоновых белков с помощью введения в систему экзогенных гистонов, содержащих [<sup>14</sup>C]лизин

Препараты	Белок, мкг	Общая радиоактивность, имп мин	Удельная активность, % от удельной активности гистонов из реассоциированного нуклеогистона
Негистоновые белки			
фракция I	410	1640	14,6
фракция II	415	635	5,6
фракция III	200	230	4,2
Гистоны из реассоциированного нуклеогистона	160	4365	100

Аминокислотный состав (мол. %) прочно связанных с ДНК негистоновых белков хроматина из разных источников

Аминокислоты	Зобная железа		Печень крысы	Селе- зенка крысы	Аминокислоты	Зобная железа		Печень крысы	Селе- зенка крысы
	телен- ка	крысы				телен- ка	крысы		
Lys	10,14	9,08	10,41	8,13	Ala	10,27	10,86	8,06	8,47
His	2,14	2,26	1,48	1,14	Val	5,74	6,23	3,60	5,58
Arg	8,65	9,15	8,92	6,82	Met	—	—	0,60	0,63
Asp	6,57	8,00	7,57	6,62	Ile	4,23	6,10	4,54	4,70
Thr	5,90	6,77	5,26	4,96	Leu	9,12	10,08	9,41	8,91
Ser	6,89	6,15	6,16	4,97	Tyr	2,55	2,43	1,32	1,87
Glu	11,04	6,54	12,05	10,29	Phe	2,99	2,67	2,72	1,42
Pro	5,44	4,05	5,60	3,64	Asp+Glu	0,94	0,80	1,01	1,06
Gly	8,34	8,93	7,20	8,82	Lys+Arg				

Связано это с тем, что добавление избыточного по отношению к ДНК количества гистонов может в какой-то степени затруднить их реассоциацию с ДНК, так как число мест на ДНК, где может происходить прочное связывание гистонов, ограничено. Избыточные гистоны могут образовывать более слабые связи с ДНК или с уже прореассоциировавшими с ДНК гистонами по принципу белок-белкового взаимодействия [9]. Следовательно, предложенный нами метод позволяет достаточно полно и без существенных загрязнений выделять прочно связанные с ДНК негистоновые белки хроматина.

Выделенные в соответствии с нашей схемой прочно связанные негистоновые белки из зобной железы, печени и селезенки крысы и из зобной железы теленка имеют нейтральный или слабоосновный характер (табл. 3). Это согласуется с результатами авторов, использовавших для выделения прочно связанных с ДНК негистоновых белков хроматина из тканей крысы принципиально различные методы выделения [10—12].

Принятая нами для исследования фракционного состава негистоновых белков система катионного электрофореза в полиакриламидном геле [13] весьма удобна для разделения гетерогенных белков, имеющих большую склонность к агрегации [14]. Для выявления возможностей этого метода было проведено параллельное электрофоретическое разделение гистонов хроматина зобной железы теленка и белков миофибрилл кролика, выделенных аспирантом нашей лаборатории Н. С. Шелудько [15]. Оказалось, что белки миофибрилл обнаруживают ту же степень гетерогенности, что и при разделении в электрофоретической системе с додецилсульфатом натрия [16]. Интересно, что при разделении в принятой нами катионной системе низкомолекулярный компонент миофибрилл с молекулярным весом 15 000, кислый по аминокислотному составу, совпадает по подвижности с гистоном F3. Таким образом, для белков с малым молекулярным весом подвижность в этой системе больше зависит от молекулярного веса, чем от заряда белка, как и в других резко катионных электрофоретических системах, используемых для разделения труднорастворимых белков [17].

Сравнение электрофоретического поведения негистоновых белков и гистонов из зобной железы крысы свидетельствует о небольшой степени гетерогенности прочно связанных негистоновых белков и об их малом молекулярном весе (рис. 1). Наибольший молекулярный вес из этих белков имеет фракция, близкая по подвижности к гистону F2a1.

Представленные на рис. 2 денситограммы и схемы электрофореграмм прочно связанных негистоновых белков из тканей крысы и зобной железы

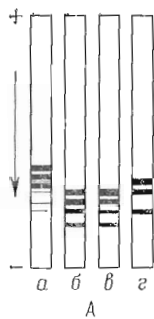


Рис. 1

Рис. 1. Схема электрофоретического разделения в расщепленном геле (см. «Экспериментальную часть») прочно связанных негистоновых белков (слева) и гистонов (справа) из хроматина зубной железы крысы

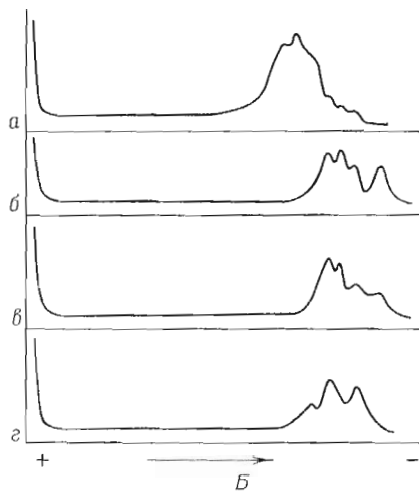


Рис. 2

Рис. 2. Электрофоретическое разделение прочно связанных с ДНК негистоновых белков хроматина из зубной железы теленка (а), зубной железы крысы (б), печени крысы (в), селезенки крысы (г). А — схемы, Б — денситограммы

теленка показывают, что для этих белков характерна небольшая степень гетерогенности и низкая тканевая специфичность. Так, сравнение белков из печени и зубной железы крысы выявляет только количественные различия. В то же время негистоновые белки из зубных желез теленка и крысы имеют значительные качественные различия. Однако небольшое количество объектов, использованное в нашей работе, не позволяет делать общих выводов о характере тканевой и видовой специфичности негистоновых белков, прочно связанных с ДНК.

Прочно связанные негистоновые белки, выделенные на разных стадиях развития из зародышей морского ежа, при небольшой степени гетерогенности имеют достаточно выраженные качественные различия (рис. 3). Из шести фракций негистоновых белков бластулы и четырех фракций гастролы совпадают только две. Следовательно, прочно связанные негистоновые белки бластулы и гастролы морского ежа отличаются друг от друга сильнее, чем аналогичные белки из разных тканей крысы.

Наши данные, указывающие на небольшой молекулярный вес прочно связанных негистоновых белков хроматина, находят подтверждение в работах, где исследование фракционного состава негистоновых белков проводили в жестких условиях, полностью исключающих опасность протеолиза [18, 19]. При этом значительная часть негистоновых белков имела молекулярный вес, не превышающий таковой гистонов. Это позволяет утверждать, что полученная нами картина фракционного состава прочно связанных негистоновых белков не может быть следствием протеолитической деградации других белков хроматина.

Наши результаты, касающиеся таких свойств прочно связанных с ДНК негистоновых белков хроматина млекопитающих, как небольшая гетерогенность, аминокислотный состав, низкий молекулярный вес, близки к результатам, полученным другими исследователями [10—12, 18, 19]. В работах группы Боннера и группы Хничики [10, 11] был принят сход-

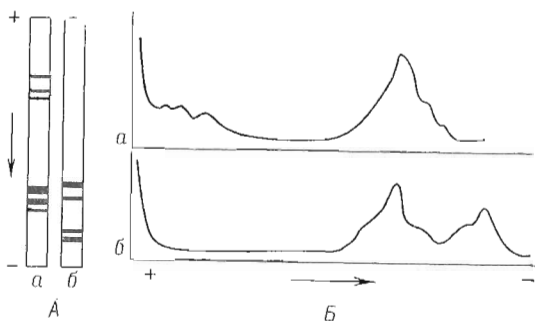


Рис. 3. Электрофоретическое разделение прочно связанных с ДНК негистоновых белков хроматина зародышей морского ежа на стадии бластулы (а) и гаструлы (б). А — схемы, В — денситограммы

ный в общих чертах метод выделения, состоящий из трех этапов: отделения суммарных белков хроматина от ДНК в мягких условиях; разделения гистонов и негистоновых белков с помощью катионообменной хроматографии и фракционирования негистоновых белков хроматина на колонках с иммобилизованной на агарозе или акриламиде ДНК по степени их сродства к ДНК. Обе работы, проведенные на хроматине из печени крысы, показали, что для прочно связанных с ДНК негистоновых белков характерен аминокислотный состав, близкий к «нейтральному», низкая степень гетерогенности и малый молекулярный вес ( $\leq 15\,000$ ). Используемый этими авторами метод выделения трудоемок. Кроме того, необходимы значительные меры предосторожности для предотвращения деградации белков на этапе выделения суммарных белков хроматина и искажения вследствие этого конечных результатов [20]. Аминокислотный состав прочно связанных белков хроматина печени крысы, выделенных в жестких условиях, также был охарактеризован авторами как «нейтральный» [12].

Разработанный нами метод выделения технически несложен и позволяет выделять прочно связанные с ДНК негистоновые белки хроматина в мягких условиях, практически без загрязнения гистонами и продуктами их протеолиза.

Группой Шелсберга был проведен ряд исследований иммунных свойств комплекса ДНК с прочно связанными негистоновыми белками из разных объектов [21, 22]. Эти комплексы получали при удалении из исходного хроматина гистонов и лабильно связанных негистоновых белков [3]. Было выявлено, что видовая иммуноспецифичность прочно связанных с ДНК негистоновых белков существенно выше тканевой [21, 22]. Следовательно, сделанные нами выводы о характере тканевой и видовой специфичности прочно связанных с ДНК негистоновых белков коррелируют с этими литературными данными.

Весьма интересен вопрос о прочно связанных с ДНК негистоновых белках хроматина из зародышей морского ежа. На основании полученных результатов можно сделать предположение о роли лабильно и прочно связанных негистоновых белков хроматина в раннем эмбриогенезе морского ежа. Ранее нами было показано, что качественные различия лабильно связанных негистоновых белков из хроматина зародышей морского ежа на стадии бластулы и гаструлы сравнительно невелики [4]. Исходя из этих данных и результатов настоящей работы, можно предположить, что в раннем эмбриогенезе существенная роль в специфическом ограничении матричной активности хроматина принадлежит прочно связанным с ДНК негистоновым белкам. Такое предположение находит некоторое подтверждение в работе [3], где было показано, что комплекс ДНК с прочно свя-

запными негистоновыми белками из хроматина позвоночных в значительной степени сохраняет тканеспецифические ограничения матричной активности.

Таким образом, данные о фракционном составе обеих групп негистоновых белков хроматина могут в какой-то степени оказаться отправной точкой для дальнейших исследований их функциональной роли.

### Экспериментальная часть

Хроматин из печени, зобной железы и селезенки крыс получали из ядер [23] с отмывкой 0,15 М NaCl, содержащим 0,015 М цитрат Na. Хроматин из зобной железы телят выделяли непосредственно из ткани [6]. Хроматин из зародышей морского ежа *Str. droebachensis* на стадии бластулы и гаструлы (40 и 90 ч развития при температуре 7—8°) получали из ядер, выделенных в 1 М сахарозе по описанному методу [7].

Содержание белка и ДНК в хроматине находили, применяя соответственно методы Лоури [24] и Спирина [25]. Калибровочная кривая для определения концентрации белка была построена на стандартной смеси, содержащей равное количество сывроточного альбумина и гистонов из хроматина зобной железы телят. Концентрацию белка в растворах, содержащих мочевины, определяли микробиуретовым методом [26].

*Хроматография негистоновых белков на SP-сефадексе C-25.* Раствор белка после осаждения сульфатом аммония и диализа (см. схему) наносили на колонку объемом 15 мл, заполненную гелем SP-сефадекса, уравновешенного 0,01 М натрий-ацетатным буфером (рН 5,2), содержащим 7 М мочевины и 0,25 М NaCl. Негистоновые белки снимали с колонки при пропускании через нее 20—25 мл того же раствора. Гистоны элюировали 30—35 мл 0,01 М натрий-ацетатного буфера (рН 5,2), содержащего 7 М мочевины и 0,8 М NaCl.

*Проверка чистоты выделяемых прочно связанных негистоновых белков* (табл. 2). К хроматину из печени крысы, предварительно экстрагированному 0,35 М NaCl (8 мг по ДНК), после диссоциации в растворе 2 М NaCl с 5 М мочевиной на 0,01 М фосфатном буфере, рН 8,0 (см. схему), добавляли 2,5 мг гистонов \*, содержащих [<sup>14</sup>C] лизин (уд. акт. 110 имп/мин/мкг белка). Далее выделяли прочно связанные негистоновые белки в соответствии с нашей схемой. Из реассоциированного нуклеогистона выделяли гистоны, которые затем осаждали 8 объемами ацетона, высушивали эфиром и растворяли в 2 М NaCl с 5 М мочевиной на 0,01 М фосфатном буфере (рН 8,0). В раствор такого же состава были переведены прочно связанные негистоновые белки до очистки на SP-сефадексе (фракция I) и подвергнутые одной и двум очисткам (фракции II и III). После этого во всех полученных препаратах определяли удельную радиоактивность (имп/мин/мкг белка).

*Фракционный состав негистоновых белков* исследовали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле при рН 3,2 [13]. Для полимеризации гелей были использованы трубка размером 5 × 100 мм. В состав раствора для проб белка входили 0,9 н. уксусная кислота, 8 М мочевины и 0,5 М β-меркаптоэтанол. Объем пробы 0,01—0,03 мл, количество белка в пробе 20—30 мкг. Концентрацию белка определяли до прибавления β-меркаптоэтанола [26]. В контрольных опытах было показано, что различия в 1,5—2 раза по количеству нанесенного на гель белка в параллельных пробах не отражаются на электрофоретической подвижности. Для достижения максимальной точности в идентификации белковых фракций

\* Меченые гистоны, полученные по обычной методике из регенерирующей печени крысы, были любезно предоставлены сотрудником нашей лаборатории С. Н. Борхсенгусом.

в отдельных случаях проводили разделение двух образцов в расщепленном геле (см. рис. 1). Для этого после проведения преэлектрофореза [13] на поверхность геля наносили 0,2 мл расплавленной 1,5% агарозы в растворе того же ионного состава, что и для полиакриламидного геля. В расплавленную агарозу опускали до уровня полиакриламидного геля прямоугольную перегородку из тонкой пластмассы, ширина которой совпадала с диаметром стеклянной трубки. На расплавленную агарозу наслаивали небольшое количество электродного буфера для достижения ровной поверхности. В итоге получали две камеры для одновременного разделения двух образцов в одном геле.

Аминокислотный состав белков определяли на полуавтоматическом аминокислотном анализаторе типа KLA-3 (Hitachi, Япония). Предварительно белки были гидролизованы 6 н. HCl при 110° в течение 24 ч.

Радиоактивность в препаратах белка измеряли на сцинтилляционном счетчике Mark II (Nuclear Chicago, США) в диоксановом сцинтилляторе

Авторы выражают глубокую признательность сотрудникам нашего института С. Н. Борхсениусу и Н. С. Шелудько за оказанную техническую помощь.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Wang T. J. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 2913—2917.
2. Johns E. W., Forrester S. (1969) *Eur. J. Biochem.*, **8**, 547—551.
3. Spelsberg T. C., Nailica L. S., Ansevin A. T. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **228**, 550—562.
4. Оксман А. Я., Воробьев В. И. (1974) в сб. *Функциональная морфология, генетика и биохимия клетки*, с. 103—105, Л.
5. Graziano S. L., Huang R. S. (1971) *Biochemistry*, **10**, 4770—4777.
6. Борхсениус С. Н., Туроверова Л. В., Винокурова Т. И., Ильина И. Д., Воробьев В. И. (1969) *Молекулярная биология*, **3**, 507—517.
7. Vorob'ev V. I., Gineitis A. A., Vinogradova I. A. (1969) *Exp. Cell Res.*, **57**, 1—7.
8. Кривцов Г. Г., Богданова А. А. (1970) *Молекулярная биология*, **4**, 422—427.
9. Combard-Vanderplacke A., Vandrelly R. (1968) *Bull. Soc. chim. Biol.*, **50**, 427—433.
10. Brock H. W. J., Larry D., Nooden Z., Sevall J., Bonner J. (1973) *Biochemistry*, **12**, 229—236.
11. Wakabayashi K., Wang S., Nailica L. S. (1974) *Biochemistry*, **13**, 1027—1032.
12. Chanda S. K., Cherian M. G. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **50**, 1031—1039.
13. Palim S., Chalkley R. (1969) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **130**, 337—346.
14. Davis R. H., Copenhagen J., Carver M. (1972) *J. Neurochem.*, **19**, 473—478.
15. Шелудько Н. С. (1974) *Цитология*, **15**, 597—603.
16. Weber K., Osborn M. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406—4412.
17. Островский Д. Н., Цфасман Н. М., Гельман П. С. (1969) *Биохимия*, **34**, 993—998.
18. Wu F. C., Elgin S. C. R., Hood L. E. (1973) *Biochemistry*, **12**, 3159—3165.
19. Tuan D., Smith S., Folkman J., Merler E. (1973) *Biochemistry*, **12**, 3159—3165.
20. Chae Ch. B., Carter D. B. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **57**, 740—746.
21. Chytil F., Spelsberg P. C. (1971) *Nature New Biol.*, **133**, 215—218.
22. O'Malley B. W., Spelsberg T. C., Schrader W. T., Chytil F., Steggle W. (1972) *Nature New Biol.*, **235**, 141—144.
23. Chauveau J., Moudle L., Rouiller C. (1957) *Bull. Soc. chim. Biol.*, **39**, 1521—1533.
24. Lowry O. H., Rosenbraugh N. J., Farr Q. S., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—273.
25. Смирнов А. С. (1958) *Биохимия*, **23**, 656—662.
26. Itzhaki R. F., Gill D. M. (1969) *Anal. Biochem.*, **3**, 401—410.

Поступила в редакцию  
29.XII.1975

После доработки  
18.III.1976



# ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE NON-HISTONE CHROMATIN PROTEINS TIGHTLY BOUND WITH DNA

OKSMAN A. Ya., IBRAGIMOV R. Kh., VOROB'EV V. I.

*Institute of Cytology, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad*

A simple method for the isolation in mild conditions of the non-histone chromatin proteins tightly bound with DNA has been worked out. The method allows these proteins to be isolated completely enough, without impurities of other chromatin proteins. The tightly bound non-histone chromatin proteins were prepared from the calf thymus, the liver, spleen and thymus of rats and from the sea urchin embryos *Strongylocentrotus droebachiensis* at the blastula and gastrula stages. Amino acid composition showed that the proteins are of neutral or slightly basic character. As revealed by polyacrylamide gel electrophoresis, these proteins are characterized by limited heterogeneity and a low molecular weight. Their tissue specificity is considerably lower than the species one. The tightly bound non-histone proteins from chromatin of the sea urchin embryos at the blastula and gastrula stages have significant qualitative differences. The importance of this group of non-histone proteins for the regulation of functional activity of chromatin is discussed in light of literature and the present results.