

Влияние наночастиц металлов на протеомный статус представителей рода *Silene* L.

Ковзунова О. В.¹, Эрст А. А.², Азизбемян С. Г.³

¹ Государственное научное учреждение «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, РБ, olga-kopa@mail.ru

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центральный сибирский ботанический сад сибирского отделения российской академии наук, г. Новосибирск, РФ

³ Государственное научное учреждение «Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси» г. Минск, РБ

Резюме. Методом 1D-электрофореза получены протеомные карты «hairy roots» *Silene linicola*, *Silene sendtneri*, *Silene frivaldszkyana* при воздействии препарата «Наноплант — Co, Mn, Cu, Fe» выявил белки-маркеры, не характерных для «hairy roots», культивируемых без добавления препарата наночастиц элементов. Выявленные белки-маркеры, предположительно, отвечают за повышенный биосинтез биологически активных веществ.

Effect of metal nanoparticles on the proteomic status of representatives of the genus *Silene* L. Kovzunova O. V., Erst A. A., Azizbekyan S. G. **Summary.** Using the method of 1D-electrophoresis, proteoly cards «hairy roots» *Silene linicola*, *Silene sendtneri*, *Silene frivaldszkyana* were obtained by exposure to the preparation «Nanoplant-Co, Mn, Cu, Fe», markers that were not characteristic for «hairy roots», cultivated without addition of a preparation of nanoparticles of elements. Identified marker proteins, presumably, are responsible for the increased biosynthesis of biologically active substances.

Лекарственные растения являются природными источниками биологически активных веществ (БАВ), поэтому в настоящее время их широко применяют в медицине и различных отраслях промышленности [1]. Использование современных биотехнологических подходов может решить проблему доступности природных соединений для практического использования в промышленности нашей республики: возобновляемым источником ценных вторичных метаболитов могут стать культуры клеток и органов высших растений.

К сожалению, в настоящее время известны лишь единичные примеры успешного коммерческого применения растительных культур *in vitro*. Основными причинами сложившейся ситуации являются недостаточная продуктивность культур клеток по вторичным метаболитам и высокая стоимость выращивания. Для изменения биосинтетических способностей и повышения продуктивности клеток *in vitro* на один-два порядка используют как традиционные методы (селекцию продуктивных штаммов, оптимизацию сред, элиситирование, добавление предшественников синтеза), так и новейшие методы метаболической (суперэкспрессия генов белков, определяющих синтез целевого продукта) и генетической (получение трансформированных органов и растений) инженерий. Культура генетически трансформированных корней — перспективный источник ценных вторичных метаболитов, в частности фитоэкдистероидов, обладающих высокой гормональной активностью [1]. Культуры так называемых «бородатых» корней (hairy root) по продуктивности БАВ превосходят корни нормальных растений [2,3,4].

Клеточная биотехнология позволяет не только удешевить редкие и дорогостоящие лекарства, но и получить экологически чистые препараты более высокого качества за счет насыщения среды культивирования клеток не только микро — и макроэлементами, но и специальными веществами, способными направленно регулировать биосинтез биологически активных веществ.

Однако для грамотного контроля биосинтеза БАВ в клеточных «фабриках» представителей рода *Silene L.* необходимо знать в деталях не только метаболомику лекарственного растения, но и определяющие данную метаболомику исследуемых видов Смолевки — протеом.

В качестве потенциального регулятора метаболизма нами был рассмотрен комплексный препарат наночастиц «Наноплант — Co, Mn, Cu, Fe», в состав которого входят такие микроэлементы, как кобальт, марганец, медь и железо. Кобальт является необходимым микроэлементом растений. Он входит в состав важного витамина B12, при недостатке которого нарушаются процессы обмена веществ, в частности, ослабляется синтез белков. Также кобальт участвует в синтезе ДНК и клеточном делении и активирует ряд ферментов, в т. ч. дегидрогеназы, гидрогеназы, нитратредуктазы. Марганец, как и медь, играет важную роль в окислительно-восстановительных реакциях, протекающих в растении, входит в состав ферментов. Участвует в процессах фотосинтеза, дыхания, в углеводном и белковом обмене. Кроме того, марганец участвует в синтезе витамина С и ряда антиоксидантных витаминов. Железо, как и другие микроэлементы, входит в состав окислительно-восстановительных ферментов растений и участвует в синтезе хлорофилла, процессах дыхания и обмена веществ. Является составной частью дыхательных ферментов и отвечает за нормальный синтез ауксинов в растении.

Используя метод ТХУ-ацетоновой преципитации, нами были выделены общие пулы белков из генетически трансформированных корней трех представителей рода смолевка, асептически выращенных на среде МС растений рода *Silene L.*, а также корней, культивируемых на средах с добавлением в культуральную среду препарат «Наноплант — Co, Mn, Cu, Fe» в двух исследуемых концентрациях 0,01 и 0,015 мг/л.

Методом 1D-электрофореза были получены протеомные карты «hairy roots» *Silene linicola*, *Silene sendtneri*, *Silene frivaldszkyana* при воздействии препарата «Наноплант — Co, Mn, Cu, Fe» и проведен их сравнительный анализ (рис. 1).

Обнаружены зоны (табл. 1), в которых присутствуют дифференциально экспрессируемые белки, претендующие на роль белков-маркеров функционального состояния различных представителей рода Смолевка.

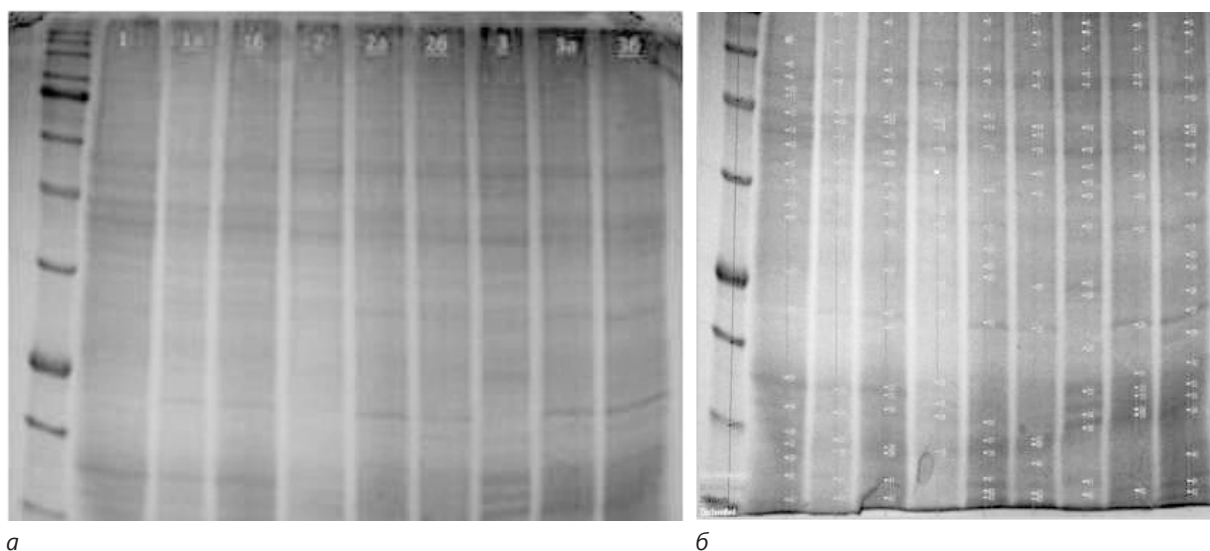


Рис. 1. 1D-электрофореграммы общего пула клеточных белков «hairy roots» *Silene linicola* (1), *Silene sendtneri* (2), *Silene frivaldszkyana* (3), а — концентрация препарата «Наноплант — Co, Mn, Cu, Fe» 0,01 мг/л среды; б — концентрация препарата «Наноплант — Co, Mn, Cu, Fe» 0,0015 мг/л среды (а — необработанный; б — обработанный с помощью программы Quantity One)

Таблица 1
Разделение общего пула клеточных белков «hairy roots» *Silene linicola*, *Silene sendtneri* и *Silene frivaldszkyana* по молекулярным массам при воздействии модификатора метаболизма при 1D-электрофорезе

Молекулярная масса, KDa	Контроль	Концентрация препарата 0,01 мг/л среды	Концентрация препарата 0,015 мг/л среды
Silene linicola			
44,9	–	+	+
38,4	–	–	+
29,4	–	+	–
28,1	–	–	+
24,8	–	+	–
21,3	–	–	+
18,1	–	+	+
17,8	–	–	+
14,9	–	–	+
Silene sendtneri			
66,7	–	+	–
66,5	–	–	+
66,0	–	+	+
45,9	–	+	–
40,3	–	–	+
34,7	–	–	+
32,0	–	+	+
26,7	–	+	–
25,6	–	+	–
21,3	–	+	+
17,3	–	+	–
15,3	–	+	+
14,9	–	–	+
13,7	–	–	+
12,9	–	+	–
12,0	–	+	+
11,4	–	+	+
Silene frivaldszkyana			
154,3	–	+	+
100,8	–	+	–
72,8	–	+	–
51,6	–	–	+
44,9	–	–	+
40,3	–	+	+
29,4	–	+	+
22,4	–	–	+
21,3	–	+	+
18,6	–	+	–
17,8	–	+	+
17,3	–	+	–
13,7	–	–	+

Примечание: жирным выделены белки, возможно отвечающие за повышенный синтез вторичных метаболитов.

Были выявлены белки с молекулярной массой от 154,3 до 11,4 KDa наблюдаемые у всех представителей рода Смолевка. Экспрессия белков с одинаковой молекулярной массой у разных видов значительно отличалась.

Протеомный анализ общего пула клеточных белков генетически трансформированных корней представителя рода Смолевка при воздействии препарата «Наноплант — Co, Mn, Cu, Fe» выявил белки-маркеры, не характерных для «hairy roots», культивируемых без добавления препарата наночастиц элементов.

Для вида *S. linicola* было выявлено девять белков, не экспрессируемые в корнях, культивируемых без добавления в культуральную среду препарата наночастиц элементов. Так, добавление препарата «Наноплант — Co, Mn, Cu, Fe» в концентрации 0,01 мг/л вызвало экспрессию 2 белков с Mr 29,4 и 24,8. А при концентрации 0,015 мг/л выявлены белки с Mr 38,4; 21,3; 17,8; 14,9 и 28,1, которые можно считать маркерными белками. Белки с молекулярной массой 44,9 и 18,1 можно расценивать как белки-маркеры «hairy roots» *S. linicola* при воздействии модификатора метаболизма.

Также была выявлена группа белков с молекулярными массами 66,0; 32,0; 21,3; 15,3; 12,0 и 11,4 которые синтезируются в рRi корнях вида *Silene sendtneri*, при добавлении в культуральную среду наночастиц металлов в любой концентрации. А вот белки с Mr 66,7; 45,9; 26,7; 25,6; 17,3 и 12,9 характерны при концентрации 0,01 мг/л, а белки с Mr 66,5; 40,3; 34,7; 14,9 и 13,7 при концентрации наночастиц 0,015 мг/л культивируемой среды. Для *S. frivaldszkyana* маркерными белками можно считать белки с Mr 100,8; 72,8; 18,6; 17,3 при концентрации 0,01 мг/л и 51,6; 44,9; 22,4 и 13,7 при концентрации 0,015 мг/л. Белки с молекулярной массой 154,3; 40,3; 29,4; 21,3 и 18,8 KDa отмечены лишь у представителей вида *S. frivaldszkyana* в ответ на внесение препарата «Наноплант — Co, Mn, Cu, Fe».

В результате проведенного исследования были обнаружены идентичные белки, экспрессируемые у каждого представителя, в ответ на внесение препарата «Наноплант — Co, Mn, Cu, Fe». Белки с молекулярными массами 44,9; 40,3; 29,4; 21,3; 17,3 и 13,7 можно отнести к белкам-маркерам, которые экспрессируются в ответ на внесение комплексного препарата наночастиц металлов «Наноплант — Co, Mn, Cu, Fe» и возможно, отвечающих за повышенный синтез ценных вторичных метаболитов.

Список литературы

1. Лафон, Р. Фитоэкдистероиды и мировая флора: разнообразие, распределение, биосинтез и эволюция / Р. Лафон // Физиология растений. — 1998. — Т. 45. — № 3. — С. 326–346.
2. Bonhomme, V. Tropane alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing rol A, B, C genes only / V. Bonhomme [et al.] // Biotech. — 2000. — Vol. 81. — P. 151–158.
3. Guillon, S. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects / S. Guillon [et al.] // Curr Opin Plant Biol. — 2006. — Vol. 9. — P. 341.
4. Gangopadhyay, A. Twin fetus in fetu in a child: a case report and review of the literature / A. Gangopadhyay [et al.] // J Med Case Reports. — 2010. — Vol. 4. — P. 96.