

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР «БИОРЕСУРСЫ»
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
Отдел биохимии и биотехнологии растений

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ
АСПЕКТЫ БИОХИМИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ
РАСТЕНИЙ**

Сборник научных трудов
III Международной научной конференции
14–16 мая 2008 г., Минск

*К 50-летию Отдела биохимии
и биотехнологии растений*

Минск
«Издательский центр БГУ»
2008

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55
Т33

Научные рецензенты:

д-р биол. наук, проф., акад. НАН Беларуси *В. Н. Решетников*;
д-р биол. наук, проф. *В. М. Юрин*;
д-р биол. наук, проф. *В. Л. Калер*

Редакционная коллегия:

*В. Н. Решетников, О. П. Булко, И. И. Паромчик, Т. И. Фоменко,
Е. В. Спиридович, Т. В. Антипова*

Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений : сб. науч. тр. 3-й Междунар. науч. конф., 14–16 мая 2008 г., Минск : к 50-летию Отд. биохимии и биотехнологии растений / НАН Беларуси, Центр. ботан. сад [и др.] ; редкол. : В. Н. Решетников [и др.] . — Минск : Изд. центр БГУ, 2008. — 562 с.
ISBN 978-985-476-604-1.

В сборнике изложены результаты исследований по составу, свойствам, организации интерфазных клеточных ядер и пластид высших растений, путей регулярного воздействия на ядерный аппарат, включая реконструкцию генома с помощью трансгенеза. Представлены отдельные проблемы регуляции морфогенеза растительных клеток и микрклонального размножения некоторых культур, использования молекулярных маркеров в документировании ботанических коллекций. Рассмотрены биохимические основы практического использования растительных ресурсов.

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55

ISBN 978-985-476-604-1

© Центральный ботанический сад
НАН Беларуси, 2008

УДК 575.117.2; 581.48:577.217.5

ПРОТЕОМНЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ У РАСТЕНИЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

1. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ОБЩЕГО ПУЛА БЕЛКОВ МЕТОДОМ УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЦЕЛОСТНОЙ КАРТИНЫ ПРОТЕОМА В СВЯЗИ С ОБРАБОТКОЙ СЕМЯН

Спиридович Е.В., Власова А.Б., Горбацевич В.И., Решетников В.Н.

ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси» Минск 220012, ул. Сурганова 2В, e-mail: spiridovich@cbg.basnet.by

Для получения целостной картины протеома растительной клетки и ее органелл (ядер и пластид) адаптирована методика фракционирования и ультрацентрифугирования, которая позволила получить препараты растворимых (цитозольных), мембранно-связанных и ДНК-связанных белков 72-часовых проростков озимой ржи, качество которых удовлетворяет для их разделения методом 2-D форе́за. Констатирована высокая степень полиморфизма ДНК-связанной фракции белков между контрольными и подвергшимися микроволновой обработке растениями.

Ведение. Большинство современных исследований протеома растений можно разделить на 2 категории. Первое – профилирование (картирование) по выявленным белкам биологического материала, с целью разделения, идентификации и составления каталогов как можно большего количества белков, и, таким образом, наиболее полного сканирования экспрессируемых последовательностей генома у отдельных представителей, на определенных фазах развития. В ряде работ предприняты попытки получения целостных протеомных спектров отдельных субклеточных компартментов растений. Это так называемая структурная (экспрессионная) протеомика [1 – 4, и др.]. Второе направление протеомного анализа – функциональная (клеточно-картируемой) протеомика – изучает полиморфизм между различными белковыми популяциями. С помощью двумерного электрофореза осуществляется сравнительный анализ белковых экстрактов контрольных и экспериментальных растений. Примеры могут включать белки мутантов и дикого типа, тканей на разных стадиях развития или в ответ на разные внешние факторы [5].

В настоящей работе представлены результаты по изучению воздействия электромагнитного излучения (на этапе семян) на общий протеом проростков озимой ржи. Обсуждается первая ступень протеомного анализа – получение белкового препарата. Предложенная обработка семенного материала может

изучаться для дальнейшего использования в технологии промышленного возделывания сельскохозяйственных культур как альтернатива традиционным химическим методам предпосевной обработки семян, которая не приводит к разрушению структуры материала и является экологически безопасной [6].

Материалы и методы. В работе использовали семена ржи Верасень, обработанные на установке ВЧЭР (высокочастотное электромагнитное поле), созданной на основе генератора высокочастотного тока «ВЧИ-62-5-ИГ-101» [6]. Ступенчатое фракционирование белков 72-часовых проростков контрольных и опытных растений ржи проводили методом ультрацентрифугирования по схеме, предложенной Giavalisco [7]. Определение содержания белка в образце вели с использованием набора реагентов «2-D Quant Kit» (производство GE Healthcare, США).

Электрофорез белков: препарат белка очищали с помощью набора реагентов «2-D Clean-Up Kit» по методике предлагаемой производителем (GE Healthcare, США). Далее белковый осадок растворяли в регидратирующем растворе (DeStreak Rehydration Solution, GE Healthcare), содержащем 8М мочевины, тиомочевину, 2% CHAPS, бромфеноловый синий, DeStreak Reagent и буфер IPG.

Первое направление – изофокусирование белков – проводили на иммобилизованных сухих стрипах pH 3-11 NL, длиной 11 см (Immobiline Dry Strip, GE Healthcare, США) на приборе Multiphor II (LKB, Швеция) с аксессуарами IPGphor™ Regular Strip Holder (GE Healthcare, США) по инструкции производителя. Режим изофокусирования: 1-ая фаза – 300 Вольт в течение 4 ч, 2-ая фаза – 1200 Вольт в течение 14,5 ч. Второе направление проводили по методу Laemmli [8] в 12 % полиакриламидных гелях (ПААГ) размерами 18X24 см, толщиной 0,1 см. После разделения белки окрашивали серебром с использованием набора Silver Staining kit, protein (Amersham Pharmacia Biotech) согласно инструкции производителя.

Результаты и обсуждение. Одной из задач данного исследования было разработать и оптимизировать под культуру озимой ржи схему выделения и фракционирования общего пула белков из растительной ткани (72-часовых проростков), с целью наиболее полно отразить его состав в целом. При работе с растительными объектами существует проблема получения чистого препарата белков для двумерного электрофореза – наличие большого количества сопутствующих соединений, которые искажают результаты и не позволяют получить картину разделения компонентов высокого разрешения. В литературе приводятся несколько схем «разборки» растительной клетки и ее компартментов для изучения общего пула белков [1–4, 8], которые очень гетерогенны по составу и находятся в комплексе с другими биополимерами. В работе представлены результаты комплексного использования ультрацентрифугирования и экстракции белков определенными буферными системами для фракционирования общих белков растительной клетки.

Электрофорез в щелочной системе белковых фракций, полученных в результате ступенчатого фракционирования растительной ткани опытных и контрольных 72-часовых проростков ржи «Верасень» показал, что примененное фракционирование действительно позволяет получать гетерогенные по своему компонентному составу фракции белков. Как видно на рисунке 1 фракции I, II и III существенно отличаются по компонентному составу полипептидов. В III фракции – ДНК-связанных белков, отчетливо представлена группа гистоновых белков в области 20 – 14 kDa. Одномерное разделение также позволило выявить качественные отличия между контрольными и опытными вариантами в областях ~32, ~40 и ~28 kDa.

Причем, все указанные полипептиды присутствуют у контрольного вари-

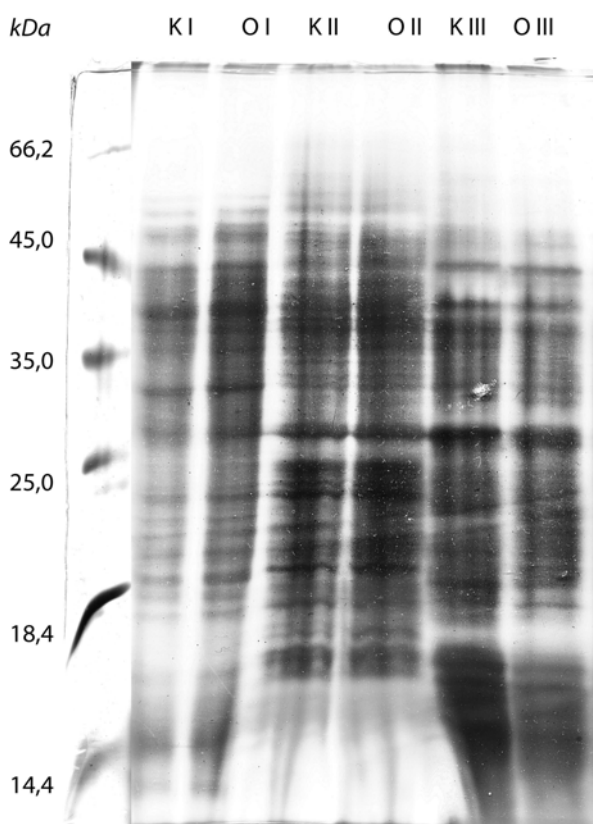


Рис. 1. SDS-электрофорез белковых фракций контрольных (К) и опытных (О) растений ржи сорта Верасень. I – высокорастворимые белки, белки цитозоля; II – белки, высвобожденные детергентами из плазматических мембран, НК-связанные белки; III – белки, высвобожденные DNase и хаотропами, НК-связанные белки.

анта и отсутствуют у опытного. Отметим, что полипептид ~40 kDa обнаруживается только у опытных растений при данных условиях электрофореза. Предварительное разделение компонентов различных белковых фракций, полученных методом ступенчатого фракционирования, в ПААГ в денатурирующих условиях позволило получить предварительные результаты о различиях в компонентном составе изучаемых фракций и перейти к дальнейшему исследованию белков, в частности белков III фракции методом двумерного электрофореза.

Использование стрипов с широким диапазоном рI 3-11 для 1-го направления 2-D электрофореза позволило максимально исключить потерю

полиморфных компонентов на начальных этапах исследования. Полученные результаты двумерного разделения компонентов фракции III (ДНК-связанные белки) контрольных и опытных растений ржи сорта «Верасень» представлены на рисунке 2. Представленные гели дают «картинку» высокого разрешения, с четкими дискретными пятнами.

Условно мы выделили «консервативные» белковые зоны, присутствующие у двух исследуемых групп растений. К таковым нами были отнесены зоны: pI 8-7; ~66kDa; pI 6-5; ~60kDa; pI 4-3; ~14-18kDa. составу, так и по экспрессии ряда полипептидов.

Данные зоны обозначены на рисунке 2 прямоугольником, треугольником и овалом, соответственно.

На гелях присутствуют белковые зоны, которые существенно различаются как по качественному, так и по количественному составу. Как видно из представленного рисунка 2 наблюдается высокий полиморфизм компонентного состава белков опытных и контрольных вариантов. Условно мы выделили 3 такие зоны, обозначенные скобками: Зона 1 – pI 7-5; 45-35 kDa; Зона 2 – pI 7-10; 14-20 kDa; Зона 3 – pI 6-5; 16-19 kDa; Зона 4 – (расширенная 1) pI 5-8; 25-45 kDa (рисунок 2). Среди отдельных мажорных полипептидов были выявлены серьезные различия относительно п/п ~26kDa, pI 7 и п/п ~14,4 kDa pI 3,5. Первый п/п был выявлен только у опытных растений, а второй – только у контрольного варианта при данных условиях электрофореза.

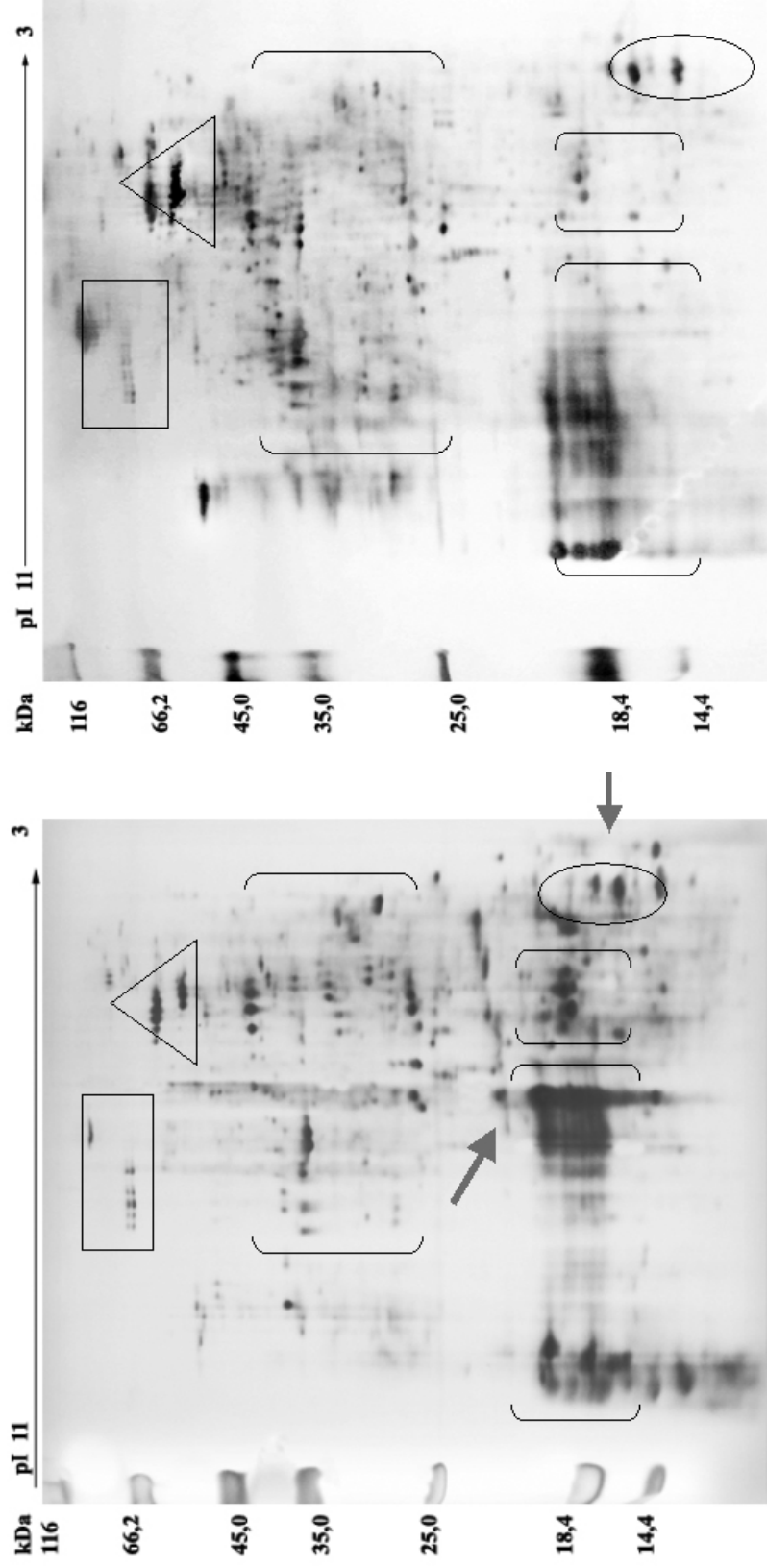
По полученным данным можно сделать несколько выводов:

– Предложенная процедура фракционирования клеточных белков может служить первым этапом успешного проведения протеомного анализа растительной клетки.

Примененный метод ступенчатого фракционирования белков с ультрацентрифугированием, использованием детергентов, ингибиторов протеиназ и обработкой ДНК-зой позволяет получить высокоочищенные стабильные препараты трех фракций – белки цитозоля; мембраносвязанные белки; ДНК-связанные белки;

– Одномерное разделение полученных белковых фракций выявило ряд качественных отличий между контрольными и опытными (семена по сле микроволновой обработки) группами, в основном, во фракции растворимых и ДНК-связанных белков;

– Проведенное двумерное разделение компонентов фракции ДНК-связанных белков позволило выявить 3 основные зоны, по которым наблюдаются высокая степень полиморфизма данной фракции между контрольными и опытными растениями;



А

Б

Рис. 2. Двумерный электрофорез белковой фракции III контрольных (А) и опытных (Б) проростков ржи сорта «Вера-сень». Белки разделены на стрипах pI 3-11. Второе направление осуществлено в ПААГ пластинах 12%. Гели окрашены серебром. Фигурами обозначены полиморфные зоны

– Анализ двумерных спектров выявил полиморфизм между контрольными и опытными вариантами в отношении двух мажорных полипептидов. Полипептид в области ~26kDa, pI 7 был выявлен только у опытных растений; полипептид ~14,4 kDa pI 3,5 – только у контрольного варианта при данных условиях электрофореза.

Продолжение протеомных исследований растительных тканей предполагается в следующих направлениях: идентификация выявленных полиморфных полипептидов трипсинолизом, с последующей идентификацией его LS-MALDI спектров; анализ пост-трансляционных модификаций белков, в частности выявление фосфорилированных и гликозилированных белков на двумерных гелях. Данная информация позволит получить более детальные данные о молекулярных механизмах эпигнетического контроля генома при различных видах воздействия на растения.

Литература

1. Santoni V., Rouquié D., Doumas P., Mansion M., Boutry M., Degand H., Dupree P., Packman L., Sherrier J., Prime T., Bauw G., Posada E., Rouzé P., Dehais P., Sahnoun I., Barlier I., Rossignol M. Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane // *The Plant Journal*, 1998, -Vol. 16, No. 5, -P. 633–641.
2. Bae M. S., Ju Cho E., Choi E.-Y., K. P. Ohkmae. Analysis of the Arabidopsis nuclear proteome and its response to cold stress// *The Plant Journal*, 2003. –Vol. 36 (5), -P. 652–663.
3. Tanaka N., Fujita M., Handa H., Murayama S., Uemura M., Kawamura Y., Mitsui T., Mikami S., Tozawa Y., Yoshinaga T. and Komatsu S. Proteomics of the rice cell: systematic identification of the protein populations in subcellular compartments // *Molecular Genetics and Genomics*, 2004. –Vol. 271, No. 5, –P. 566-576.
4. Lilley K. S., and Dupree P. Methods of quantitative proteomics and their application to plant organelle characterization // *Journal of Experimental Botany*, 2006. –Vol. 57, No. 7. –P. 1493-1499.
5. Rose S., Bashir S., Giovannoni J., Jahn M., Saravanan R. Tacking the plant proteome: practical approaches, hurdles, and experimental tools// *The plant Journal*, 2004. –Vol. 39, -P. 715–733.
6. Способ предпосевной обработки семян овощных или зерновых культур: пат. 5580 Респ. Беларусь, С16 А 01С 1/00/ Карпович В.А., Родионова В.Н. – № а 19991128; заявл. 24.10.88; опубл. 2003.12.91// Афіцыйны бюл. Нацыо цэнтр інтэлектуально уласнасцію -2003.
7. Giavalisco P., Nordhoff E., Lehrach H., Gobom J., Klose J. Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis // *Electrophoresis*. 2003, -V. 24, -P. 207-216.
8. Laemmli U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // *Nature*, 1970. -Vol. 227, -P. 680–685.

Summary

Method of fractionation and ultracentrifugation adopted for 72–hours seedling of *Secale cereale* the allows obtaining specimens of soluble (cytosolic), membrane-associated and DNA-binding proteins, of quality high enough for its separation by means of 2-D electrophoresis. High level of the polymorphism of the DNA-binding protein fraction between control and microwave-irradiation treated plants was shown.