

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИОННЫХ ДЕТЕРГЕНТОВ ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ
БЕЛКОВ ИЗ СЕМЯН СОРГО**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Селивановой Марии Николаевны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук

А.А. Галицкая

Научный консультант:

Ст. научн. сотр., док. биол. наук



Л.А. Дыкман

Зав. кафедрой:

профессор, док. биол. наук

С.А. Коннова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Во всем мире сорго (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) является пятой по значимости зерновой культурой. Это растение с углеродным циклом C4, обладающее высокой эффективностью фотосинтеза и продуктивностью. Данная культура широко культивируется более чем в 100 странах мира. Сорго хорошо известно своей высокой устойчивостью и широкой адаптивностью к многочисленным биотическим и абиотическим факторам стресса. Популярность этой культуры обусловлена ее разнообразным использованием в качестве пищи для человека, корма для скота, источника биотоплива и фуража в виду большего содержания белка, а также высокой доходностью и устойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды по сравнению со многими другими зерновыми культурами и хорошей продуктивностью в условиях нехватки воды и температурных ограничений. Совокупность этих преимуществ позволяет рассматривать зерновое сорго как перспективный объект для селекционных работ и биотехнологических исследований в целях повышения продуктивности и питательной ценности данной культуры, особенно в нынешних условиях глобального потепления.

Высокое содержание полисахаридов и белка в семенах сорго сочетается с их низкой пищевой ценностью ввиду устойчивости к ферментативной деградации – основного процесса пищеварения. Решение данной проблемы откроет новые горизонты использования зернового сорго в сельскохозяйственном производстве. Исследование компонентного состава различных фракций запасных белков семян сорго с использованием современных высокоэффективных методов и подходов открывают возможность детального исследования причин низкой перевариваемости белков, что позволит найти пути ее преодоления.

Цели и задачи исследования. Цель данной работы заключается в исследовании экстрагируемости запасных белков сорго под воздействием ионных детергентов алифатической и стероидной природы.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Дать оценку эффективности экстракции и количественного осаждения запасных белков семян сорго с использованием детергентов различной природы.
2. Сравнить пептидные спектры, полученные из семян сорго, с использованием различных детергентов.
3. Оценить различия пептидных спектров разных линий сорго с использованием разработанной методики экстракции и осаждения белков.

Структура бакалаврской работы: работа представлена на 55 страницах. Состоит из списка сокращений, введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Литературный обзор написан с использованием 32 источников, в нём рассмотрены следующие вопросы: общая характеристика сорго и его запасных белков, экстракция белков из растительного сырья, особенности экстракции кафиринов – основных запасных белков сорго, описание механизмов взаимодействия белков с ионными детергентами (алифатическими и стероидными) в низких концентрациях.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Основными объектами работы являлась мука из семян различных генетических линий сорго, полученных из отдела биотехнологии ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Востока». Далее в разделе описаны основные методы, использованные в работе: приготовление буферов для экстракции, подготовка образцов белка из экстрактов семян, электрофоретический анализ белкового спектра в полиакриламидном геле (ПААГЭ), визуализация

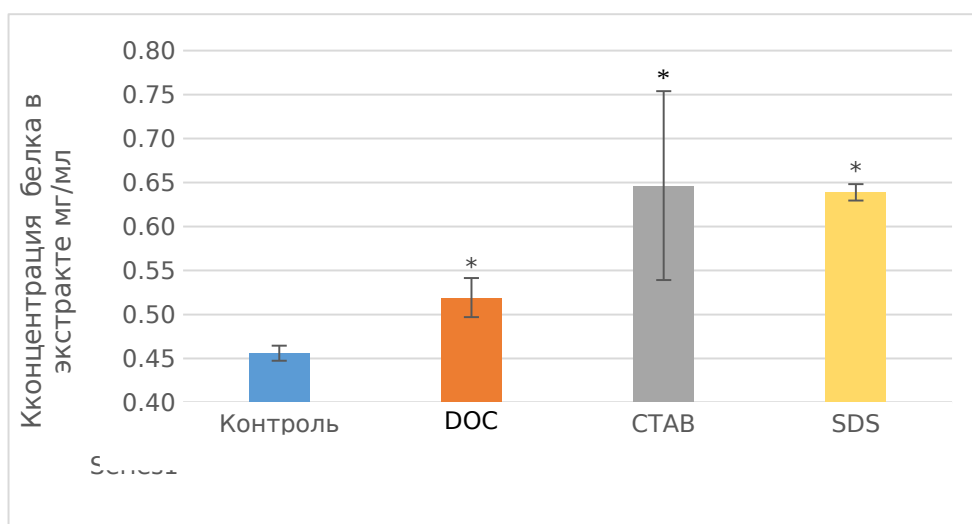
пептидных спектров с использованием ионов серебра, определение концентрации белка в экстрактах бицинхониновым методом.

Результаты и обсуждение. В работе в качестве исходного материала для экстракции запасных белков использовали целые семена растений сорго сорта Аванс и его трансформированных линий. Перед экстракцией навески семян по 5 граммов измельчали на мельнице в течении 2 мин до исчезновения в составе муки ощутимых частиц и гранул. Для стабилизации условий в процессе экстракции, а именно концентрация и pH буфера, и исключения влияния эндогенного минерального состава и метаболитов муки, использовали высокие соотношения образца и объема буфера (1/150) и повышенные концентрации буферных систем.

После экстракции проводили осаждение нерастворенного остатка растительного материала центрифугированием в течение 3 мин при 12 100 g.

Для исследования были выбраны следующие ионные детергенты: SDS, СТАВ, DOC. Контрольным экстрагентом был буфер - 50мМ TRIS HCl pH=6,9. В предварительных экспериментах использовали детергенты DOC, СТАВ и SDS в концентрации 0,1%, растворенные в контрольном буфере. После экстракции и осаждения нерастворенного осадка, проводили измерение концентрации белка в полученных экстрактах, как указано в материалах и методах.

На рисунке 1 показано, что в присутствии выбранных детергентов увеличивается количество экстрагируемых белков. Приведены средние значения трех измерений.



Контроль – буфер 50мМ TrisHCl pH= 6,9; DOC – 0,1% в буфере;

CTAB – 0,1% в буфере; SDS – 0,1% в буфере.

* - Отличия от контроля достоверны для $p < 0,05$

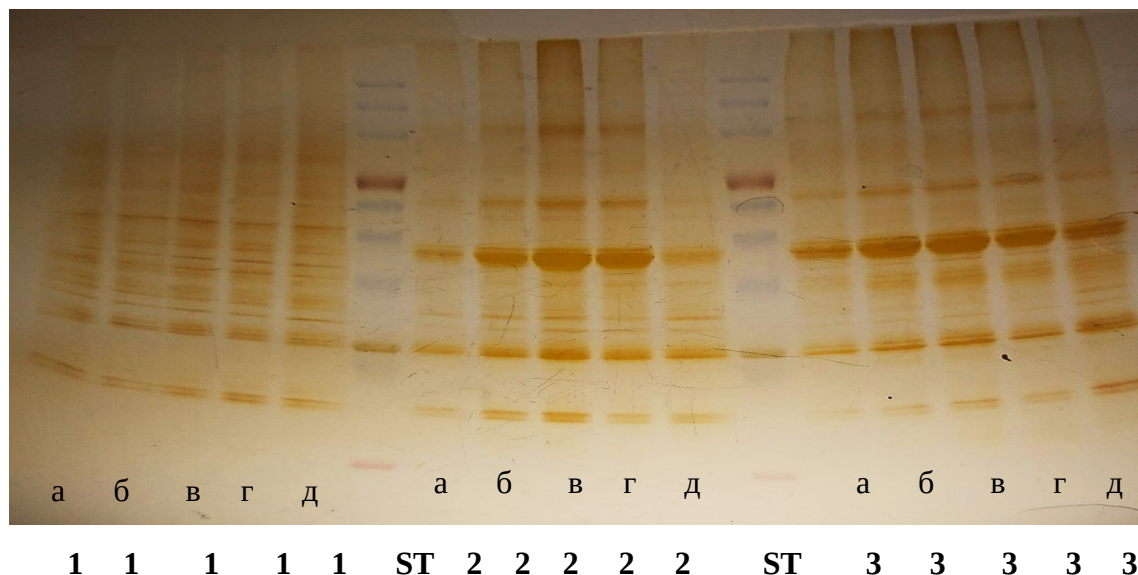
Рисунок 1 - Концентрация белков в исследуемых экстрактах муки семян сорго.

Полученные данные показывают, что детергенты увеличивают количество экстрагируемых белков. Наибольший эффект вызывают наиболее гидрофобные детергенты - CTAB и SDS, тогда как DOC вызывает лишь незначительное увеличение растворимости белков. Нами было отмечено, что в процессе экстракции наблюдается снижение pH буфера, предположительно ввиду экстракции кислых метаболитов растения.

В исходном виде экстракты непригодны для электрофоретического анализа белков. Полисахариды, а также минеральные ионы и органические кислоты значительно ухудшают и делают невозможным эффективное разделение белков. В работе использовали метод, основанный на селективной копреципитации белков в присутствии низких концентраций DOC с высоким количественным выходом. Он применим также для осаждения белков в низких концентрациях до 5-10 нг/мл. В работе удалось успешно применить его для количественного выделения белков из экстрактов муки семян сорго, содержащих значительные количества SDS и особенно CTAB.

Анализ результатов электрофоретического анализа образцов показывает, что эффективность экстракции и спектр полипептидов позволяют разделить

образцы на 2 группы, каждая из которых имеет характерные наборы белков, что хорошо видно на рисунке 2. Первая группа — это образцы, экстрагированные буфером и 0,2% DOC. Она состоит из большого количества полипептидов с приблизительно равным их содержанием. Вторая группа - это образцы, экстрагированные буфером и 0,2% CTAB и SDS, состоит из ограниченного количества пептидов с выраженным доминированием нескольких групп. Состав минорных по количеству компонентов в этих образцах различается в зависимости от детергента. Ввиду высокой гомологии состава полипептидов первой группы последующие экстракции проводили по схеме 0,2% DOC-0,2% CTAB-0,2%, SDS-2%.



1 – Образцы, экстрагированные 0,2% DOC в 90 мМ TrisHCl pH=6,9

2 – Образцы, экстрагированные 0,2% CTAB в 90 мМ TrisHCl pH=6,9

3 – Образцы, экстрагированные 0,2% SDS в 90 мМ TrisHCl pH=6,9

ST – Стандарты молекулярного веса в кДа: 180, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 13, 10.

Генетические линии сорго

а – исходный сорт Аванс,

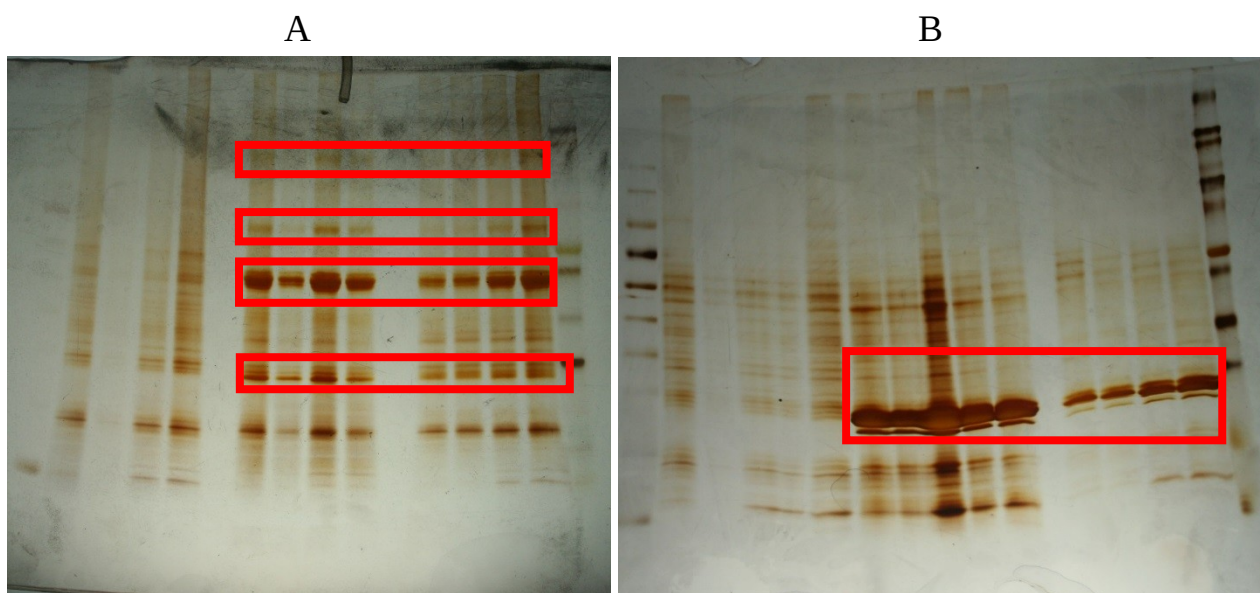
б, в, г, д – производные генетические линии с измененным синтезом запасных белков.

Рисунок 2 - Результат электрофоретического разделения белков муки семян сорго различных селекционных линий сорта Аванс, экстрагированных детергентами

Данные электрофоретического анализа позволяют выявить изменения в экстрагируемости запасных белков семян сорго под воздействием различных ионных детергентов. Установлено, что в образцах полученных генетических линий экстрагируется значительно больше белков кафириновой группы по сравнению с исходным сортом. Важно отметить, что изменения затрагивают и отдельные сопутствующие белки некафириновой группы, что выражается в появлении новых полипептидов в диапазоне молекулярных масс 10 – 25 кДа. Данные отличия наиболее четко выявляются при экстракции в присутствии 0,2% СТАВ.

На следующем этапе работы было проведено исследование субъединичного строения белков, экстрагированных различными детергентами. Для этого разделение образцов проводилось в отсутствие и в присутствии восстановителя S-S связей - DTT – дитиотрейтола, результаты приведены на рисунках 3 А и 3 В.

Сопоставление полученных результатов показывает, что детергенты экстрагируют различные типы белков. Так DOC сольбилизирует в основном односубъединичные белки. СТАВ и SDS эффективно экстрагируют как мономерные формы, так и олигомерные комплексы запасных белков, составляющие доминирующие группы в образцах. Важно отметить, что после восстановления S-S связей в спектрах образцов, экстрагированных СТАВ и SDS, проявляются полипептиды аналогичные белкам выделяемых DOC.



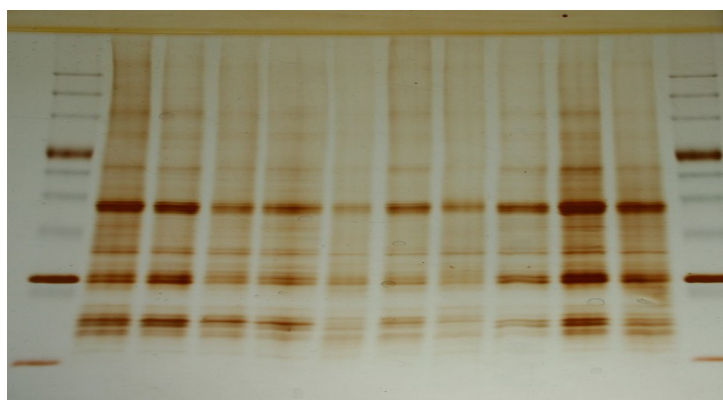
1 2 2 2 2 3 3 3 3 4 4 4 4 1 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 4 4 4 4 1

1 – Стандарты молекулярного веса в кДа: 180, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 13, 10.
 2– Образцы, экстрагированные 0,2% DOC.
 3– Образцы, экстрагированные 0,2% CTAB.
 4– Образцы, экстрагированные 0,2% SDS.
 А – разделение без DTT, В – разделение с DTT

Рисунок 3 - Результат электрофоретического разделения белков муки семян сорго различных генетических линий сорго сорта Аванс, экстрагированных детергентами.

Полученные данные демонстрируют, что использование ионных детергентов алифатической природы позволяет эффективно выделять мономерные и олигомерные формы кафиринов. Основной экстрагируемой формой запасных белков в семенах сорго является димер. Использование данных детергентов позволяет проводить экстракцию в водной среде и эффективно выделять легко доступную фракцию кафиринов, которая в первую очередь определяет питательную ценность муки сорго.

Высокая чувствительность и селективность предложенного метода анализа в сочетании с количественным методом переосаждения белков при пробоподготовке позволило провести сравнительный анализ состава запасных белков семян различных генетических линий сорго. Результаты представлены на рисунке 3.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

1, 12 – Стандарты молекулярного веса в кДа: 200, 140, 110, 75, 55, 42, 30, 23, 18, 10;

2 – Исходный сорт Аванс;

3-11 – Различные генетические линии сорго.

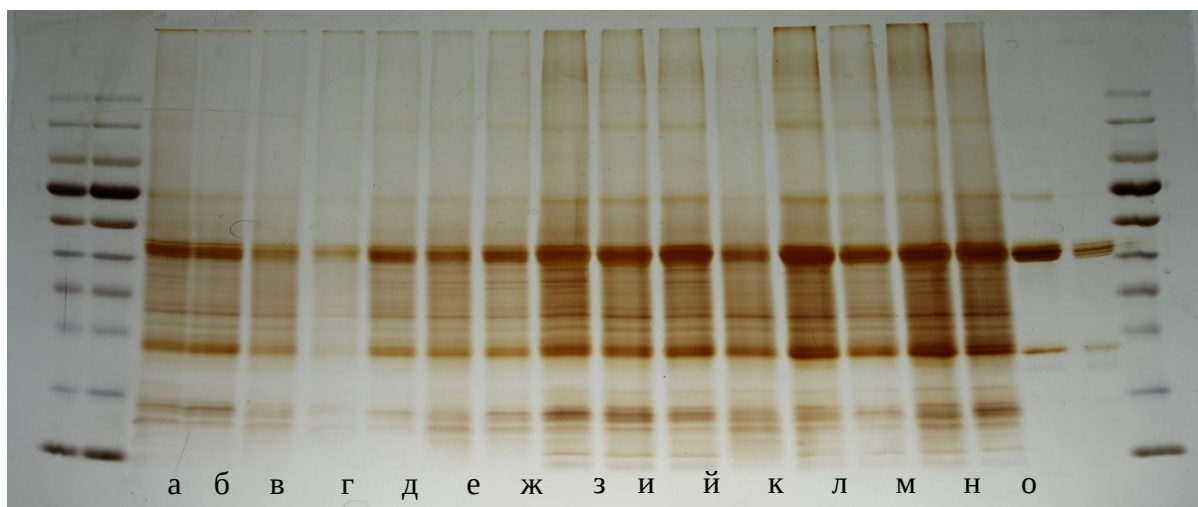
Рисунок 3 - Электрофорез белков муки семян сорго разных генетических линий, экстрагированных 0,2М ТрисHCL pH 8,8 и 0,2% СТАВ.

Особенность данного метода экстракции представляет собой использование высоко молярного (200мМ) Трис-буфера, что обеспечивает высокую буферную ёмкость экстракта для преодоления закисления органическими кислотами, содержащимися в муке семян. Использование высокого pH 8,8 обеспечивает повышенный выход белка в процессе экстракции в сравнении с нейтральным pH 6,8. Кафирины составляют доминирующую часть белков экстракта. Они представлены в основном димерной формой белков.

Важно отметить, что в исследованных генетических линиях, подвергнутых редактированию, содержание кафиринов и групп низкомолекулярных белков некафириновой группы в большинстве случаев снижается. Отдельные пептиды этой группы подвергаются полной элиминации.

Успешное применение модифицированной в ходе работы методики позволило выявить количественные и качественные различия в составе белков семян у различных генетических линий сорго. На следующем этапе работы был проведен сравнительный анализ состава белков у данных линий растений. Основное внимание было уделено количественной оценке содержания

запасных белков, легко экстрагируемых детергентом СТАВ. Результаты электрофоретического анализа приведены на рисунке 4.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

1– Стандарты молекулярного веса в кДа: 200, 140, 110, 75, 55, 42, 30, 23, 18, 10.
 2 - – Исходный сорт Аванс. 3-16 – Редактированные генетические линии сорго.
 17-18 – Белки исходного сорта Аванс и редактированной линии экстрагированные трет-бутанолом. 19 – Стандарты молекулярного веса в кДа: 200, 140, 110, 75, 55, 42, 30, 23, 18, 10.

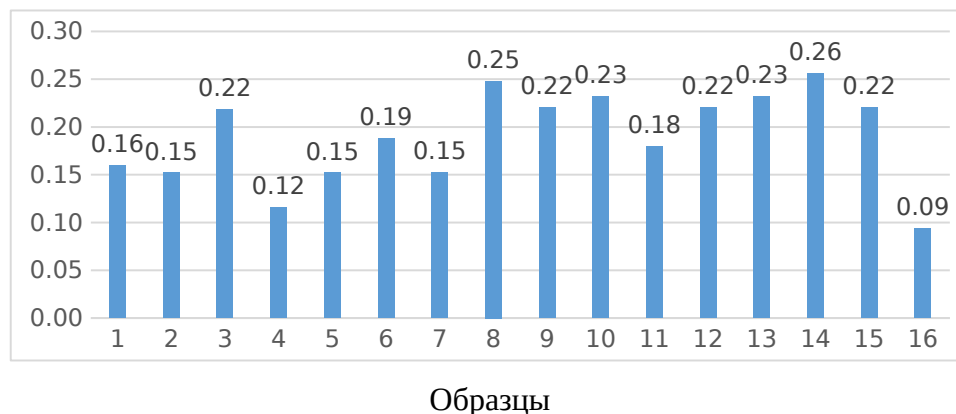
Генетические линии сорго

а – исходный сорт Аванс, б-о – Линии, полученные методом генетического редактирования

Рисунок 9 - Электрофорез белков муки семян сорго разных генетических линий, полученных методом генетического редактирования, экстрагированных 0,2М ТрисHCl (pH 8,8) и содержащем 0,1% СТАВ.

Сравнительный анализ состава запасных белков семян сорго, полученных с использованием различных ДНК технологий показал, что все образцы генетических линий имеют отличия от исходного сорта. При этом генетически редактированные образцы линий характеризуются более высоким уровнем содержания запасных белков. Важно отметить, что наиболее выраженное увеличение затрагивает именно димерную форму кафиринов. На рисунке 4 также представлены образцы кафиринов, выделенные в соответствии стандартной методике по экстракции трет-бутанолом. Данные образцы содержат мономерную и димерную формы кафиринов, причем димерная форма доминирует аналогично препаратам, которые были экстрагированы водным Трис буфером, содержащим 0,1% СТАВ.

Для получения количественных данных о содержании легко растворимой группы запасных белков в семенах генетических линий сорго, был использован бицинхониновый метод определения концентрации белка в экстрактах тех же образцов, которые использовались для электрофоретического анализа. Данные приведены на рисунке 5.



1 – Исходный сорт Аванс.

2-15 – Генетически редактированные линии.

16 – Белки исходного сорта Аванс, повторно экстрагированные трет-бутанолом.

Рисунок 10 — Концентрация белка в экстрактах различных генетических линий сорго сорта Аванс.

Сопоставление данных содержания белка в экстрактах и анализа компонентного состава белков показывает высокую корреляцию содержания мономерной и димерной форм кафиринов с общим содержанием белков. Можно сделать заключение, что именно содержание кафиринов определяет общее содержание белка в экстрактах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что использованные ионные детергенты различаются по экстрагирующей эффективности в отношении запасных белков семян сорго. DOC солюбилизирует сопутствующие белки, но практически не экстрагирует запасные белки кафирины.

Наибольшая эффективность экстракции белков наблюдается при использовании СТАВ, который солюбилизирует максимальное количество и кафиринов, и белков других групп. SDS селективно экстрагирует кафирины, что позволяет выявить различия их содержания в муке разных селекционных

линий. Сопоставление электрофоретических спектров демонстрирует, что основная часть белков группы кафиринов экстрагируются в форме олигомеров: в виде двух, и в меньшей степени трех субъединиц. На рисунке 7 В – S-S связи димеров и тримеров разрушены DTT, и они представлены в виде мономеров).

Установлено, что DOC и СТАВ эффективно экстрагируют единый набор сопутствующих белков некафириновой группы. Фракция сопутствующих белков, в отличие от кафиринов, селективно экстрагируется DOC в мономерной форме.

Результаты исследования демонстрируют значимую роль межмолекулярного взаимодействия и межсубъединичных S-S связей в процессе упаковки белков кафиринов различных классов в семенах сорго. Выявленные различия в экстракции запасных белков различных классов в семенах сорго могут отражать изменение структуры белковых телец эндосперма у растений различных генетических линий.

Обобщение полученных данных по влиянию ионных детергентов позволяет предположить, что в структуре белковых тел (алеироновых зерен) запасные белки существуют в виде различных комплексов с разными типами упаковки. Использование ионных детергентов в низких концентрациях позволяет селективно экстрагировать и выделить легко доступную и растворимую часть комплексов, состоящую из мономеров, димеров и олигомеров. Выявленные в процессе исследования различные типы упаковки запасных белков имеют важное значение для понимания механизмов неполной перевариваемости запасных белков семян сорго. А также большое селекционное значение, открывая перспективный путь для направленного повышения питательной ценности зерна сорго.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что наибольшая селективность экстракции белков кафириновой группы обеспечивается при использовании SDS. Наибольшее количество белков выделяется при экстракции СТАВ. DOC обеспечивает экстракцию белков некафириновой группы.

2. Выявлено, что использование СТАВ и SDS в низких концентрациях позволяют экстрагировать кафирины в виде олигомерных белков, состоящих из двух, и в меньшей степени, трех субъединиц. При этом сопутствующие белки экстрагируются в мономерной форме.

3. Показано, что использование СТАВ в качестве дополнительного экстрагента позволяет оценить различия в пептидных спектрах линий сорго и выявить линии с увеличенным содержанием запасных белков. Наиболее выраженное увеличение наблюдали для димерной формы кафиринов.