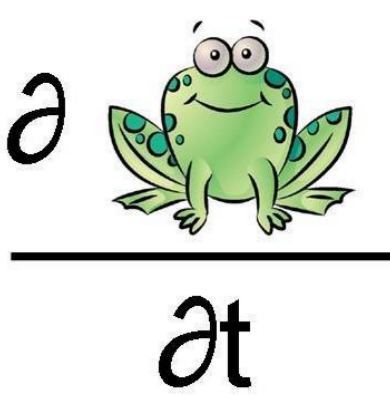


Выделение и исследование новых ингибиторов трипсина из корней *Brassica rapa*: анализ их роли в антибиозных взаимодействиях с микроорганизмами



В. Дмитриев¹, А. Кольцова², А. Пивнюк³, М. Рожнова⁴, М. Эверетт⁵

¹ – МАОУ гимназия №56 г.Томск; ² – МБОУ Лицей №165 им. 65-летия «ГАЗ», Нижний Новгород; ³ – МГУ им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, Москва; ⁴ – МБОУ Ломовская СОШ, п. Ломовка, Нижегородская обл.; ⁵ – МОУ СОШ №82 им. Ф.И. Дубовицкого, г. Черноголовка

Введение

Протеазы – класс ферментов, способных разрушать пептидные связи белков. Трипсин – наиболее доступный представитель этого класса, из-за чего широко используется в биохимических исследованиях. В процессе эволюции растения выработали защитные механизмы, позволяющие им противостоять патогенным микроорганизмам. Одним из важнейших компонентов этих механизмов являются ингибиторы протеаз, подавляющие рост и размножение вредителей. Так же они могут быть использованы для сельскохозяйственных и биомедицинских целей. В качестве объекта настоящего исследования была выбрана традиционная российская культура – *Brassica rapa* (репа), которая ранее не была исследована на предмет выработки ингибиторов сериновых протеиназ.

Результаты

Выделение белка.

Для контроля процедуры выделения были использованы клубни картофеля. Известно, что картофель содержит ингибиторы трипсина, стабильные в диапазоне pH 2-12 и при нагревании до 100 С.

Была получена смесь белков, общая концентрация была оценена методом Брэдфорда и составила 1 мг/мл для репы и 0.5 мг/мл для картофеля. Фотографии гелей представлены на рис.1. Для репы на геле получено 20 полос в диапазоне от 6 до 180 кДа. Для картофеля было найдено 9 полос. Мажорная полоса для репы находится на уровне 26кДа, для картофеля – 19кДа.

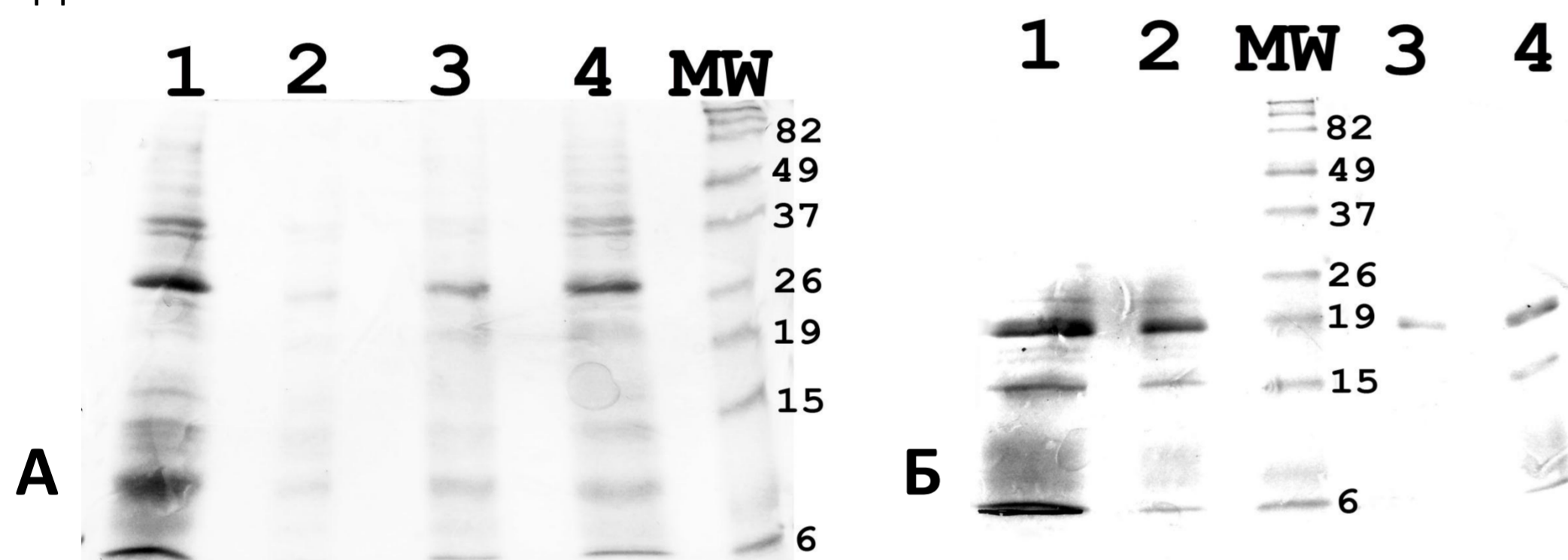


Рис.1 Фотографии гелей для репы (А) и картофеля (Б).

А. 1. 40 мкл исследуемого белка; 2.5 мкл белка 3. 10 мкл белка; 4. 20 мкл белка.
Б. 1. 40 мкл белка; 2. 20мкл белка; 3. 5 мкл белка 4. 10 мкл белка;

Результаты

Исследование ингибирования трипсина

Выделенная смесь белков проявляла ингибирующую активность по отношению к трипсину – скорость образования продукта снижалась с увеличением концентрации исследуемых белков (рис.2). Концентрация ингибитора, при которой скорость работы 10нМ трипсина снижалась в 2 раза (IC_{50}) была 1.2 мг/мл для обоих растений. Добавление BSA концентрацией 1 мг/мл в качестве отрицательного контроля не приводило к уменьшению скорости работы трипсина.

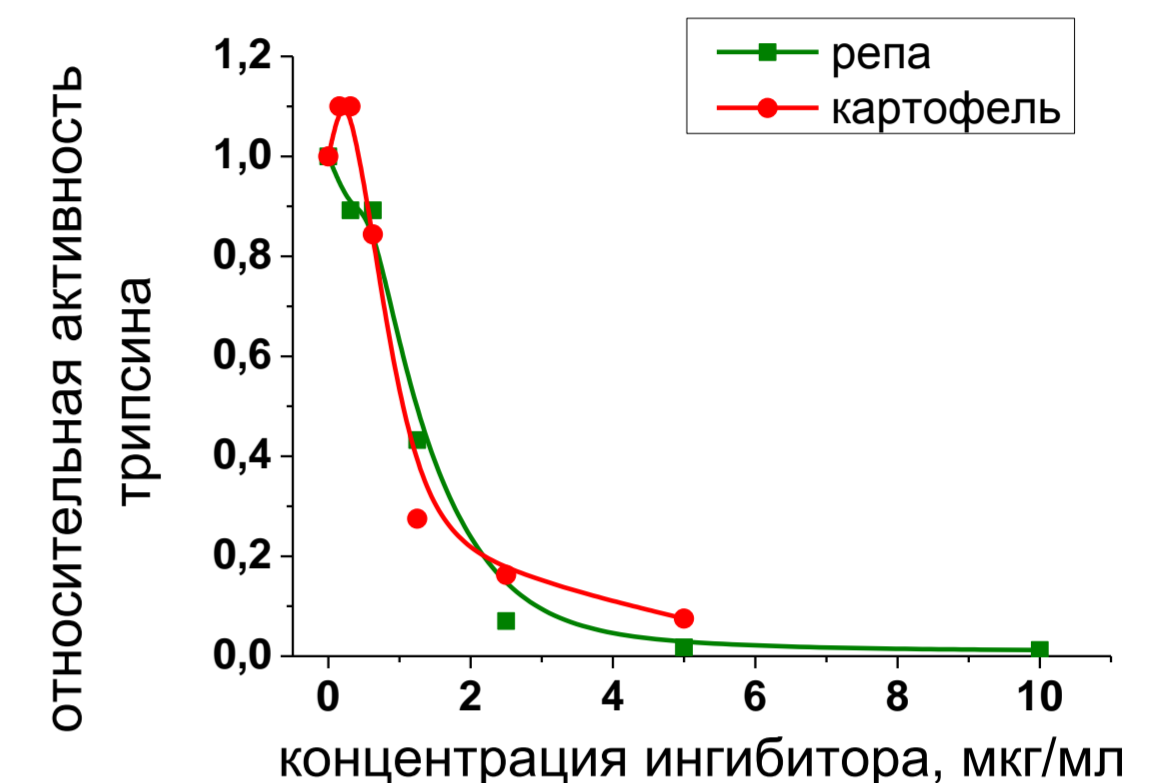


Рис.2 Зависимость относительной активности трипсина от концентрации ингибитора. Скорости наработки продукты были поделены на скорость в отсутствие ингибитора. Концентрация трипсина 10нМ

Исследование влияния на микроорганизмы

Эксперимент по определению чувствительности микроорганизмов к препаратам белка показал, что 5 µг препарата белка, выделенного из *Brassica rapa*, не подавляет рост *A. flavus* и *E. coli* (рис. 3). В качестве положительного контроля в эксперименте с *A. flavus* было использовано 50нг клотримазола, который подавил рост *A. flavus*; отрицательный контроль (питательная среда LB) на рост не влияет. В качестве положительного контроля в эксперименте с *E. coli* было использовано 0,25 mg ампициллина, который подавил рост *E. coli*; отрицательный контроль (питательная среда LB) на рост не влияет.

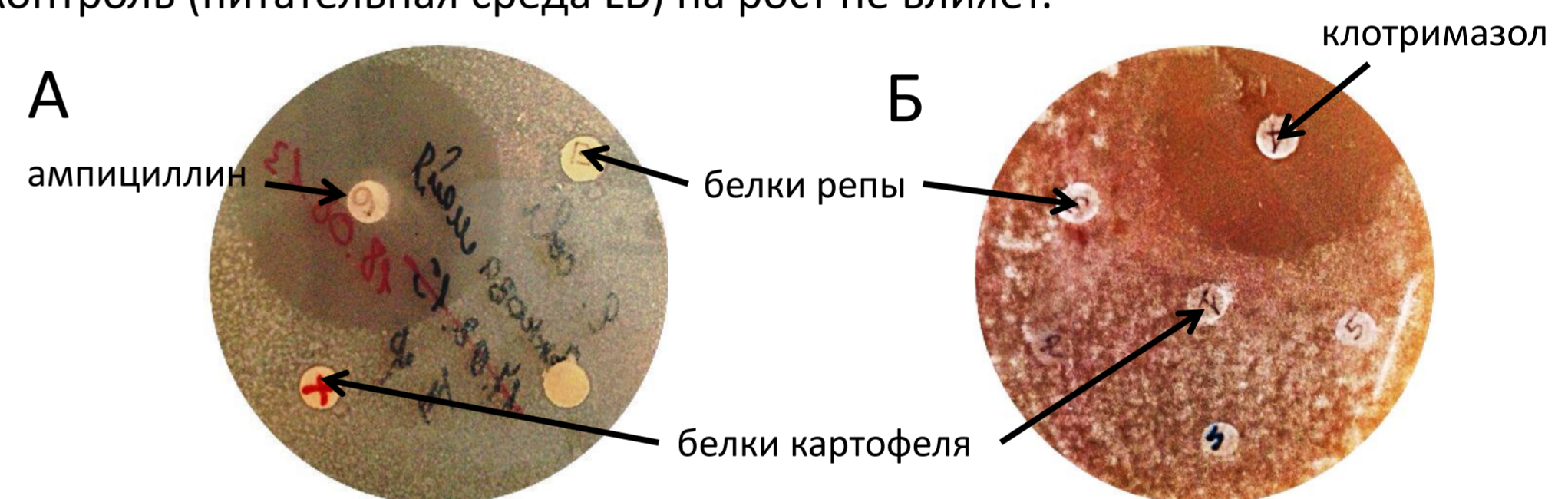


Рис.3 Влияние белков репы и картофеля на рост *E.coli* (А) и *A.flavus* (Б)

Математическая модель взаимодействия бактерий и *Brassica rapa*

$$[I] = \alpha [N]$$

$$[P] = \beta [B]$$

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{k_1[P][N]}{K_m + [N] + \frac{K_m}{K_i}[I]}$$

$$\frac{dB}{dt} = 1000k_1 \frac{[P][N]}{K_m + [N] + \frac{K_m}{K_i}[I]} - D[B]$$

I – ингибитор

P – протеаза

N – *Brassica rapa*

B – *E. coli*

K_m – константа Михаэлиса равна

150 мкМ и получена экспериментально

K_i – константа ингибирования

равна 1 мкг/мл и получена экспериментально

D – константа скорости гибели бактерий

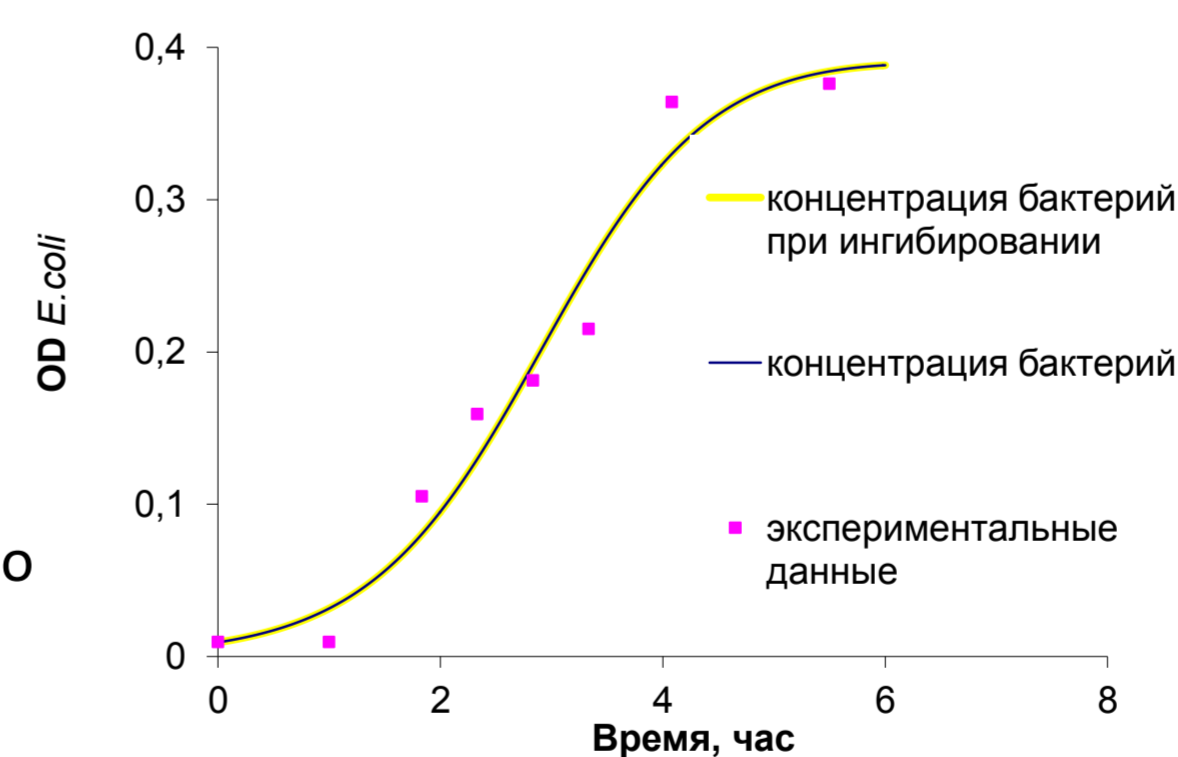


Рис. 4 Экспериментальная и теоретическая динамика роста *E. coli* в присутствии ингибитора

Выводы

1. Обнаружен новый ингибитор трипсина из корня *Brassica rapa*. С помощью грубой очистки получена смесь белков общей концентрации 1 мг/мл.
2. Обнаруженный ингибитор обладает ингибирующей активностью по отношению к трипсину в чистой системе.
Константа ингибирования (K_i) равна 1 мкг/мл
3. Ингибирующая активность не проявляется по отношению к *Escherichia coli* и *Aspergillus flavus*
4. Была построена математическая модель, описывающая экспериментальную кинетику роста *E. coli*.

Материалы и методы

Исследуемый образец *Brassica rapa* был любезно предоставлен частным хозяйством пос. Липицы; образец *Solanum tuberosum* был приобретен на рынке г. Пущино.

Методы:

- 1) Выделение белка. Образцы гомогенизировали, инкубировали в двойном объеме 0,1% р-ре NaCl, предварительно доведя pH до 3-4, и осаждали дебрис центрифугированием при 8000g (15 мин). Далее был отобран супернатант и произведена его термокоагуляция (95°, 2 мин), после чего коагулировавшие белки осаждали центрифугированием (3000g, 5 мин). Концентрирование и замену буфера на Tris (50mM, pH=7,5) проводили с помощью фильтров 3kDa Amicon Ultra Ultracel (Millipore).
- 2) Измерение общего количества белка производилось по колориметрическому методу Брэдфорда (Брэдфорд-реагент BioRad)
- 3) Денатурирующий гель-электрофорез проводили в 12% ПААГ по Лэмли. Окрашивание геля проводили в Coomassie Brilliant Blue R-250.
- 4) Исследование ингибирующей активности препарата белка проводилось по изменению скорости расщепления хромогенного субстрата Tos-Gly-Pro-Arg-pNA в 50 mM Tris (pH=7,5) трипсином. Измерение оптической плотности проводили на длине волны $\lambda=405$ nm на микропланшетном спектрофотометре Tecan Sunrise.
- 5) Культивирование *Escherichia coli* проводилось на жидкой и агаризованной питательной среде LB; *Aspergillus flavus* культивировали на агаризованной среде Чапека.