

С. Н. Куликов, Р. М. Хайруллин, Р. З. Хайруллин

ПОЛИМЕРНЫЕ ХИТИНОВЫЕ МАТРИЦЫ КАК ЛИГАНДЫ ДЛЯ ПЕРОКСИДАЗ*Ключевые слова: хитин, хитозан, полимерный лиганд, пероксидазная активность.*

Показана возможность использования хитиновых и хитозановых полимерных матриц, сорбированных на микропланшетах, для специфического связывания растительных ферментов – пероксидаз и оценки их ферментативной активности. Разработанный подход позволяет использовать данный способ для оценки эффективности активации иммунного ответа растений, на примере пероксидаз, при использовании различных элиситоров, а также в патогенезе растений.

Keywords: chitin, chitosan, polymeric ligand, peroxidase activity.

The possible usage of chitin and chitosan polymer matrix, adsorbed on the microplates specific binding plant enzyme - peroxidases and assessing their enzymatic activity was demonstrated. The approach suggested allows the method to estimate the effective activation of immune response in plants for example peroxidases, using different elicitors and in plant pathogenesis process.

Введение

Основные патогены растений – грибы, часто содержат в своих клеточных стенках хитин. В связи с этим растения выработали механизм распознавания хитиновых молекул, как маркера присутствия грибного патогена, который способен индуцировать в растениях образование сигнальных и защитных веществ [1, 2], то есть выступать в роли элиситора. Поэтому метод индуцирования неспецифической устойчивости у растений с помощью хитиновых (и хитозановых) элиситоров является одним из перспективных способов защиты сельскохозяйственных культур от грибных, бактериальных и вирусных болезней.

Взаимодействие хитинового полимера с растительным организмом происходит в основном через специфические хитиновые рецепторы, обнаруженные у различных видов растений, и, локализованные в цитоплазматической мембране [3]. Взаимодействие хитина со специфическими рецепторами растительных клеток приводит к активации защитных механизмов растений – образованию фитоалексинов, отложению лигнина, выработке активных форм кислорода. Однако, в последнее время появились данные свидетельствующие о возможности специфического взаимодействия хитиновых молекул с другими белками растений – оксидоредуктазами [4]. Эти ферменты регулируют уровень активных форм кислорода, поддерживая их содержание в растительных клетках на относительно безопасном уровне. При этом данные белки представлены разнообразием изоформ, функциональная активность которых во многом остаётся не изученной.

В связи с этим задачей настоящей работы являлась разработка простого способа детекции пероксидазной активности растительных ферментов, способных специфически связываться с полимерными хитиновыми матрицами, выступающих в качестве специфических лигандов.

Экспериментальная часть

В работе использовали крабовый хитин – поли-N-ацетилглюкозамин [5]. Для получения коллоидного (аморфного) хитина к 1 гр тонко размолотого образца вещества добавляли 10 мл 85%-ой фосфорной кислоты и оставляли на 48 ч при 4°C. Затем полученную смесь разбавляли в 300 мл дистиллированной воды. Образовавшийся осадок коллоидного хитина отмывали до pH 5,5.

Высокомолекулярный крабовый хитозан со средневязкостной молекулярной массой (M_v) 400 кДа и степенью дезацетилирования 85% (ЗАО «Биопрогресс», Московская Область). Ламиарин, карбоксиметилцеллюлоза, глюкоза, N-ацетилглюкозамин и глюкозамин производства Sigma-Aldrich.

Растительные экстракты, содержащие пероксидазы, получали из проростков корней пшеницы (род *Triticum* L.) и корневища хрена деревенского (*Armoracia rusticana* L.). Для этого 1 г растительно материала растирали в ступке в присутствии жидкого азота. К гомогенату добавляли 0,05M Na-фосфатный буфер с pH 7,0 содержащий смесь ингибиторов протеиназ (Sigma). Полученный гомогенат подвергали центрифугированию при 14000g и температуре 4°C. В полученном экстракте, отделённом центрифугированием от нерастворимых компонентов, определяли количество белка по методу Брэдфорда.

Пероксидазную активность ферментов в экстракте, специфически сорбирующихся на хитине, определяли в микропланшетах с сорбированными на них полимерными матрицами. Для этого полистироловые микропланшеты предварительно подвергали ультрафиолетовому облучению (лампа 100 Вт) в течение 2 мин. В лунки планшета вносили по 100 мкл коллоидного хитина (хитозана, ламиарина, карбоксиметилцеллюлозы или их мономеров) в концентрации 1 мг/мл. Оставляли планшет на 24 ч при 4°C. Далее отмывали несвязавшийся хитин фосфатным буфером. Вносили в лунки по 200 мкл фосфатного буфера, содержащего 0,1% бычьего сывороточного альбумина (БСА). Оставляли планшет на 24 ч при

4°C. Отмывали несвязавшийся БСА фосфатным буфером, содержащим 0,1% Твин-20, затем просто буфером.

В приготовленные таким образом планшеты с сорбированными на них углеводными матрицами вносили растительные экстракты, разведённые в фосфатном буфере. Инкубировали в течение 30 мин при 30°C. Затем промывали лунки фосфатным буфером, содержащим 0,1% Твин-20, затем тем же буфером без детергента. Вносили в лунки субстрат пероксидазы, содержащий о-фенилендиамин. Пероксидазную активность оценивали по развитию окраски измеряемую на спектрофотометре «Сапфир 9305» при длине волны 492 нм в расчёте на количество белка (мг).

Результаты и их обсуждение

Было установлено, что использование углеводных матриц позволяет детектировать пероксидазную активность в растительных экстрактах (табл 1).

Таблица 1 – Определение пероксидазной активности в растительных экстрактах с использованием различных углеводных матриц

Углеводная матрица	Активность пероксидазы, усл. ед.	
	<i>Triticum</i>	<i>A. rusticana</i>
Хитин	105±22	145±25
Хитозан	45±12	49±18
Ламиарин	0	0
Карбоксиметил-целлюлоза	0	0
Ацетилглюкозамин	0	0
Глюкозамин	0	0
Глюкоза	0	0

Однако не все углеводы могут быть использованы для детекции пероксидаз – как видно из таблицы 1 только при использовании в качестве полимерной матрицы хитина и хитозана было отмечено наличие ферментативной активности. Отсутствие пероксидазной активности при использовании других углеводов – ламиарина и карбоксиметилцеллюлозы – свидетельствует о специфичности сорбции растительных пероксидаз к хитиновому и хитозановому полимерам. Для специфического взаимодействия ферментов с углеводными матрицами по всей видимости играет важную роль их полимерная структура, поскольку не было отмечено сорбции пероксидаз на углеводные мономеры используемых веществ.

Наибольшей сорбцией в отношении пероксидаз как пшеницы, так и хрена, обладала хитиновая матрица, которая представляет собой незаряженный полиаминосахард. Как было отмечено в более ранних работах, именно к хитину обнаруживали специфическое сродство пероксидазы, выделенные из различных видов растений [4].

Хитин вообще является компонентом

клеточных стенок основных растительных патогенов – грибов. Молекулы хитина взаимодействуют также со специфическими рецепторами в цитоплазматической мембране растительных клеток [1]. Таким образом растения получают химический сигнал о близости грибного патогена. В присутствии хитина в растениях индуцируется образование сигнальных и защитных веществ. Важнейшими из них являются активные формы кислорода, которые являются как медиаторами в сигнальных каскадах растительного организма, так и непосредственно вовлечены в антипатогенный процесс в отношении посторонних микроорганизмов, а также опосредованно, например через усиление лигнификации растительных тканей [6]. Для контролирования процессов образования и утилизации избытка активных форм кислорода в растениях существует целый ряд ферментов, среди которых есть и пероксидазы. В связи с вышесказанным, вероятно, могла выработаться способность данных ферментов к непосредственному взаимодействию со структурами, которые содержат хитиновые компоненты, без вовлечения более длительного, опосредованного образованием сигнальных молекул, иммунного ответа.

В нашей работе была показана также способность пероксидаз сорбироваться на хитозановой полимерной матрице (табл 1). Используемый в эксперименте хитозан представляет собой полиаминосахарид, содержащий большое количество свободных аминогрупп и только 15% моносахаридных звеньев с аминогруппами, которые ацетилированы как и в хитиновом полимере. Возможно, именно наличие ацетилированных (по сути - хитиновых) участков хитозанового полимера обеспечивает сорбцию пероксидаз к матрице. Нельзя исключать также возможность специфической сорбции ферментов и на участки хитозана со свободными аминогруппами, а также неспецифического взаимодействия за счёт электростатических связей.

Таким образом, проведённые исследования показали возможность использования хитиновых и хитозановых полимерных матриц, сорбированных на микропланшетах, для специфического связывания растительных ферментов – пероксидаз и оценки их ферментативной активности. Разработанный подход позволяет использовать данный способ для оценки эффективности активации иммунного ответа растений, на примере пероксидаз, при использовании различных элиситоров, а также в патогенезе растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке регионального гранта Российского фонда фундаментальных исследований №12-04-97039 р_поволжье_a.

Литература

- Куликов, С.Н. Роль структуры в биологической активности хитозана / С.Н. Куликов, Ю.А. Тюрин, Д.А.

- Долбин, Р.З. Хайруллин // Вестник Казанского технологического университета, - 2007. - №6. - С. 10-14.
2. Куликов, С.Н. Роль структуры в элиситорной активности хитозана / С.Н. Куликов, В.П. Варламов Учёные записки КГУ. Серия Естественные науки. – 2008. - Т. 150. - Кн. 2. - С.43-58.
 3. Okada, M. High-affinity binding proteins for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membranes from wheat, barley and carrot cells: conserved presence and correlation with the responsiveness to the elicitor / M. Okada, M. Matsumura, Y. Ito, N. Shibuya. Plant Cell Physiol. - 2002. - V. 43. - № 5. - P. 505-512.
 4. Максимов, И.В. Поиск хитин-специфических пероксидаз в растениях / И.В. Максимов, Е.А. Черепанова, Р.М. Хайруллин. Вестник Башкирского университета. – 2001. - № 2. – С. 95-98.
 5. Хайруллин, Р.З. Зависимость растворимости хитозана от молекулярной массы и значения pH среды / Р.З. Хайруллин, С.Н. Куликов, В.Е. Тихонов, Е.А. Степнова, С.А. Лопатин, В.П. Варламов // Вестник Казанского технологического университета, - 2010. - №7. - С. 148-152
 6. Cherepanova, E.A. The change of peroxidase activity in the co cultures of wheat calluses and bunt pathogens under the influence of chitooligosaccharides / E.A. Cherepanova, I.V. Maksimov, O.B. Surina, Z.R., Jusupova. Acta Physiol. Plantarum. – 2004. – V. 26. – P. 267.

© С. Н. Куликов – канд. биол. наук, с.н.с. лаб. иммунологии и разработки аллергенов Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, kuliks@yandex.ru; Р. М. Хайруллин – н.с. лаб. иунологии и разработки аллергенов Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, harenat@yandex.ru; Р. З. Хайруллин – ст. препод. каф. промышленной безопасности КНИТУ, khairullinrz@gmail.com.