

Введение Основные патогены растений – грибы, часто содержат в своих клеточных стенках хитин. В связи с этим растения выработали механизм распознавания хитиновых молекул, как маркёра 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_u) 400 кДа и степенью деацетилирования 85% (ЗАО «Биопрогресс», Московская Область). Ламинарин, 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, ламинарина, 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-фенилендиамина. 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 A. rusticana</i> Хитин	105±22
Хитозан	145±25
Хитозан	45±12
Ламинарин	0
Карбоксиметил-целлюлоза	0
Ацетилглюкозамин	0
Глюкозамин	0
Глюкоза	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 – ламинарина 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.