

УДК 575.117.2; 581.48:577.217.5

ПРОТЕОМНЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО ЭКСПРЕССИРОВАННЫХ ДНК-СВЯЗАННЫХ БЕЛКОВ ПРОРОСТКОВ *SECALE CEREALE*

Е.В. СПИРИДОВИЧ, Н.Б. ВЛАСОВА, В.Н. РЕШЕТНИКОВ

ГНУ “Центральный ботанический сад Национальной академии наук
Беларуси”

Минск 220012, ул. Сурганова, 2В

e-mail: nastasia_vlasova@nm.ru

Проведено исследование фракции ДНК–связывающих белков ржи сорта “Верасень”, методом 2-D электрофореза с последующим гидролизом трипсином дифференциально экспрессируемых белковых пятен и MS MALDI TOF TOF детекцией. Получены данные, подтверждающие влияние микроволновой обработки семян на экспрессию ДНК-связывающих белков, включая БТШ-70.

Ключевые слова: микроволновое излучение, фракция ДНК-связанных белков, 2-D электрофорез, MALDI-TOF-TOF масс-спектрометрия, БТШ-70.

Введение. Геномика провела инвентаризацию информационного материала клетки [1, 2]. Итогом молекулярно-генетического направления работ следует считать полную расшифровку геномов четырех видов высших растений (арабидопсис, рис, люцерна и тополь) и выдвигание на первый план задачи завершения секвенирования геномов ряда других важнейших видов сельскохозяйственных растений (кукуруза, виноград, томаты, пшеница, ячмень) [3-5]. Если геном одинаков для всех клеток организма, то каждый орган, ткань и клетка имеют собственную протеомную карту, которая изменяется под различными воздействиями. Это направление протеомного анализа – функциональная (клеточно-картируемая) протеомика – изучает полиморфизм между различными белковыми популяциями. С помощью двумерного электрофореза (2D ЭФ) и масс-спектрометрии (МС) возможно проведение сравнительного анализа изменений в качественном белковом составе растений под влиянием различных факторов. Методический подход в этой области довольно универсален, однако существуют особенности в связи со специфичностью растительных объектов. Осложняет исследования в этой области тот факт, что на сегодняшний

день не велики данные об отсеквенированных и аннотированных геномах растений [6].

Обсуждается изменение в одной из групп белков (ДНК-связанных) проростков ржи, выявленное комплексом методов: двумерным электрофорезом с последующим триптическим гидролизом некоторых дифференциально экспрессированных белковых пятен и идентификацией их MALDI-TOF-TOF масс-спектрометрией. Получены данные о влиянии микроволновой обработки семян на изменение протеома и экспрессию ДНК-связанных белков, в том числе БТШ-70. Результаты могут стать полезными при создании теоретических основ индукции прорастания семян микроволновым излучением, а также повышения адаптации растений к неблагоприятным факторам внешней среды. Использованный подход может применяться для изучения различных воздействий на протеом растений.

Материалы и методы

В работе использовали семена ржи сорта Верасень, обработанные на установке ВЧЭР (высокочастотное электромагнитное поле), по методике [7]. Ступенчатое фракционирование белков проводили методом ультрацентрифугирования по схеме, предложенной Giavalisco [8, 9]. Определение содержания белка в образце вели с использованием набора реагентов "2-D Quant Kit" (производство GE Healthcare, США). Фракции ДНК-связанных белков контрольных и опытных образцов разделяли 2D ЭФ по [9]. Электронные изображения двумерных электрофоретических спектров получали с использованием сканера Epson и далее анализировали с помощью специализированного программного обеспечения

PDQuest 2-D Analysis Software, Version 8.0.1, Bio-Rad Laboratories.

Триптический гидролиз белка в полиакриламидном геле проводили следующим образом: вырезали кусочек геля размером 1 мм³, который дважды промывали путем инкубации в 100 мкл 40 % раствора ацетонитрила в 0,1 М NH₄HCO₃ в течение 40 мин при 37 °С. После удаления раствора для дегидратации геля добавляли по 100 мкл ацетонитрила. Удалив ацетонитрил и высушив кусочек геля, прибавляли к нему 3 мкл раствора модифицированного трипсина (Promega) в 0,05 М NH₄HCO₃ с концентрацией 10 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 12 ч при 37 °С, затем к раствору добавляли 7 мкл 0,5 % трифторуксусной кислоты (ТФУ) в воде и тщательно перемешивали. Надгелевый раствор использовали для получения MALDI-масс-спектров.

Подготовка образцов для масс-спектрометрии: на мишени смешивали по 0,5 мкл раствора образца и раствора 2,5-дигидроксибензойной кислоты (Aldrich, 10 мг·мл⁻¹ в 20 % ацетонитриле в воде с 0,5 % ТФУ) и полученную смесь высушивали на воздухе.

Масс-спектры были получены на tandemном MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенном УФ лазером (Nd). Масс-спектры получены в режиме положительных ионов с использованием рефлекторона; точность измеренных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0,007 %.

Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Поиск по "пептидному фингерпринту" проводился в базе данных NCBI (подбаза – растения) с указанной точностью с

учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом.

Анализ изображений двумерных гелей с помощью специализированного программного обеспечения PDQuest 2-D Analysis Software, триптический гидролиз белка, получение MALDI-масс-спектров и идентификацию белков проводили на базе лаборатории протеомного анализа ФГУ НИИ физико-химической медицины (г. Москва, Россия).

Результаты и обсуждение

В связи с высокой гетерогенностью белков проростков ржи по составу, физико-химическим свойствам и функциям, исследование протеома проводили по фракциям – легко растворимая (цитозольная), мембраносвязанная фракция НК-связанных белков. Они были получены в резуль-

тате комплексного использования поэтапного ультрацентрифугирования и экстракции белков определенными буферными растворами с добавлением детергентов и хаотропов. Интерес представляла III фракция – ДНК-связанных белков, представленная белками хроматина. 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 рис. 1. Гели дают “картинку” высокого разрешения, с четкими дискретными пятнами.

Каждый белок был откалиброван соответственно молекулярной массы и рI. Сочетая автоматическое сканирование и компьютерно-целевой анализ

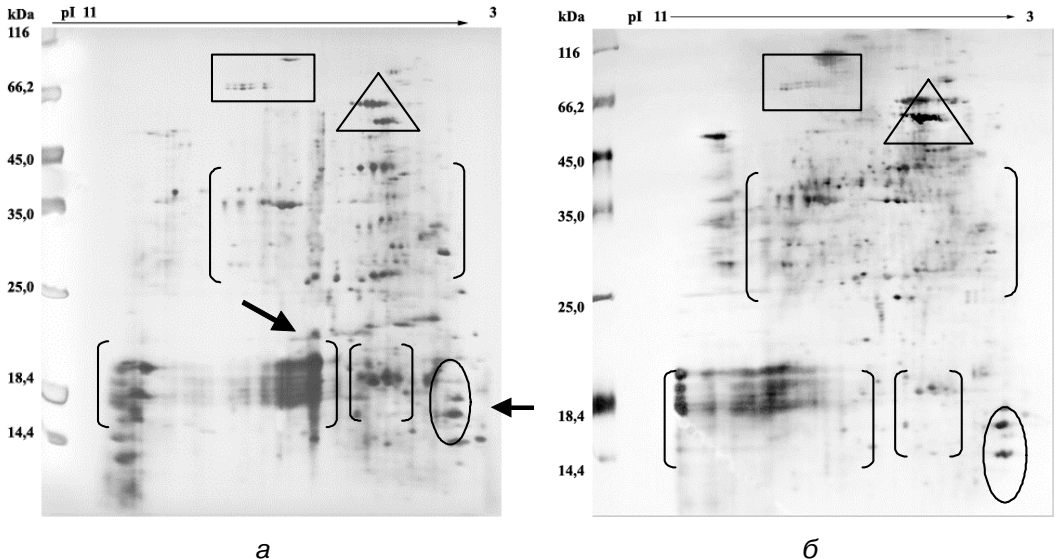


Рис. 1. Двумерный электрофорез белковой фракции III контрольных (а) и опытных (б) проростков ржи сорта “Верасень”. Белки разделены на стрипах рI 3-11. Второе направление осуществлено в ПААГ пластинах 12%. Гели окрашены серебром. Скобками обозначены полиморфные зоны, фигурами – конститутивные

• **Белковое пятно №3** – опытные растения; ~ 70 kDa, ~4,6 рІ.

В настоящее время масс-спектрометрия (MALDI-TOF/TOF или нано-жидкостная хроматография [LC]-ESI-MS/MS) является одним из возможных способов идентификации неотсеквенированных и на основе гомологии [6].

Обозначенные пятна №1, 2 и 3 были подвергнуты триптическому анализу и MALDI-TOF-TOF масс-спектрометрии, как указано выше. В результате были получены MALDI-TOF-TOF масс-спектры для пятен №1, 2 и 3, которые представлены на рис. 3 и 4, соответственно.

Полученные MALDI-TOF-TOF масс-спектры пятен №1 и №2 содержали

аналогичные мажорные и минорные пики для этих пятен, что, с большой долей вероятности, позволяет предположить, что проанализированные полипептиды являются субъединицами одного и того же белка. Интересным и, тем не менее, не выясненным остается вопрос, почему одна субъединица данного белка экспрессирована у контрольных растений, а другая – только у растений, семена которых подверглись микроволновой обработке.

К сожалению, до настоящего времени геном *Secale cereale* не отсеквенирован полностью и не аннотирован в мировой базе данных. Таким обра-

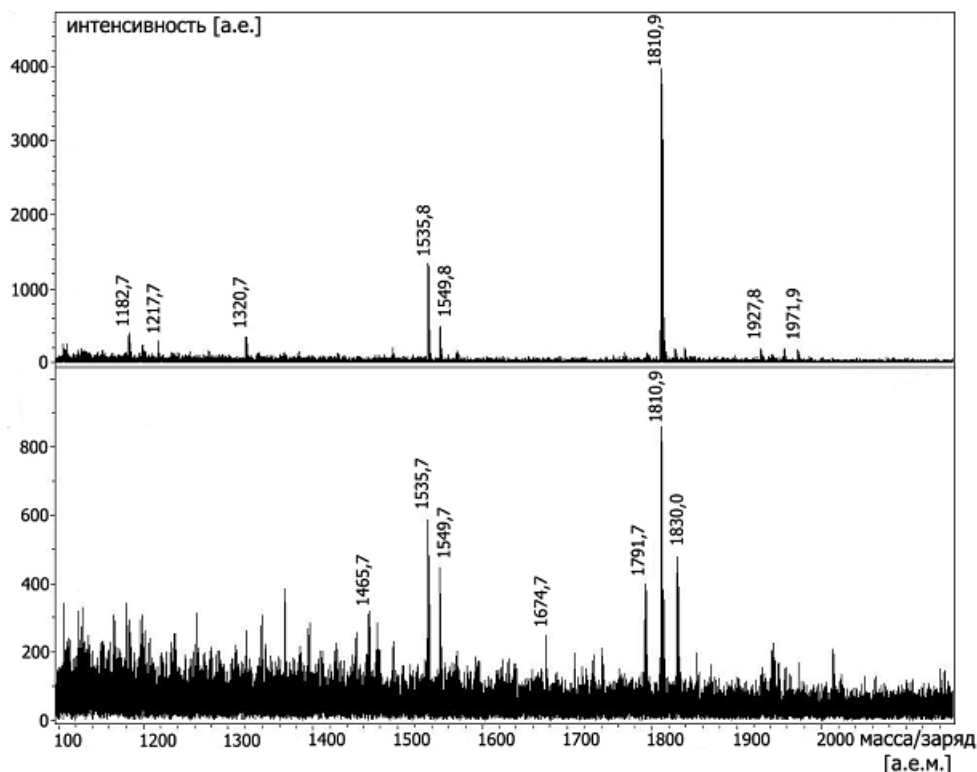


Рис. 3. MALDI-TOF-TOF масс-спектры для пятен № 1 (а) и № 2 (б); интенсивность измеряется в абсолютных единицах (а.е.), а соотношение масса/заряд характеризует массу белковых фрагментов в атомных единицах массы (а.е.м.)

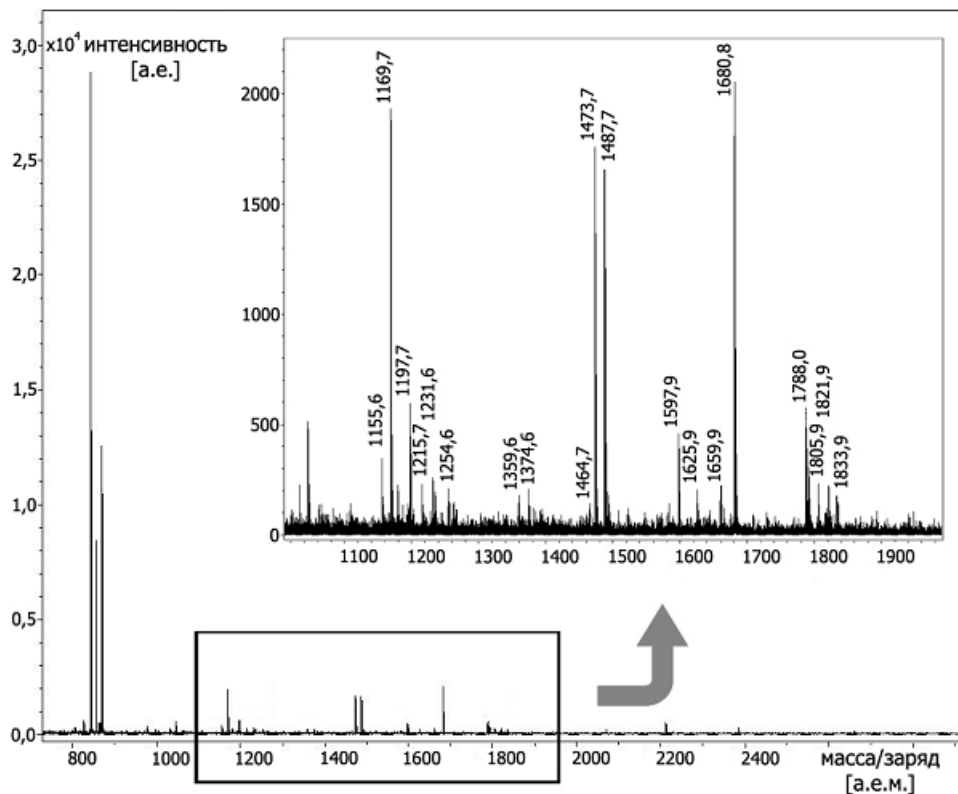


Рис. 4. MALDI-TOF-TOF масс-спектр для пятна №3: а — полный спектр; б — развернутая область спектра

зом, поиск по пептидному фингерпринту пятен №1 и №2 не позволили нам идентифицировать данные полипептиды по базе данных Mascot (Plant) (данные не приводятся). Полученные данные, тем не менее, представляют собой интерес с точки зрения очерчивания круга белков, что может облегчить дальнейшую целевую идентификацию данных полипептидов другими методами молекулярной биологии и биохимии, такими как RT-PCR или Вестерн – блот анализа.

С другой стороны, поиск по пептидному фингерпринту на основе MALDI-TOF-TOF спектров пятна №3 в базе псби позволил получить более обнадеживающие результаты, несмотря на

то, что среди аннотированных полипептидов также не обнаружены те, которые принадлежат непосредственно *Secale cereale*. Девятнадцать из тридцати, обнаруживших гомологию с поданными спектрами полипептидов являются белками теплового шока 70 (Heat shock cognate 70 kDa protein, БТШ 70) различных видов растений, включая *Medicago truncatula*, *Medicago sativa*, *Oryza sativa* (japonica cultivar-group), *Lilium longiflorum*, *Arabidopsis thaliana*, *Vigna radiate*, *Cucumis sativus*, *Triticum aestivum*, *Spinacia oleracea*, *Lycopersicon esculentum* и др. Был выявлен довольно высокий процент гомологии, который достигает 62–89% (см. табл. 1).

Таблица 1. Результаты идентификации MALDI -TOF-TOF масс-спектров для пятна №3 по базе данных псби

№ П.п.	№ доступа	Масса	Сходство, %	Описание
1.	gi 92868673	22803	88	Orn/DAP/Arg decarboxylase 2; Heat shock protein Hsp70 [<i>Medicago truncatula</i>]
2.	gi 108711797	71267	80	Heat shock cognate 70 kDa protein 2, putative, expressed [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]
3.	gi 15232682	71103	80	ATP binding [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
4.	gi 762844	71470	78	Hsc70 [<i>Lycopersicon esculentum</i>]
5.	gi 92891109	70951	68	DnaK family protein [<i>Medicago truncatula</i>]
6.	gi 56554972	70952	68	heat shock protein 70 [<i>Medicago sativa</i>]
7.	gi 431144	71610	68	HSP70 [<i>Lilium longiflorum</i>]
8.	gi 108707472	71589	67	Heat shock cognate 70 kDa protein, putative, expressed [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]
9.	gi 15230534	71057	67	HSP70; ATP binding [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
10.	gi 45331281	70972	65	70 kDa heat shock cognate protein 1 [<i>Vigna radiata</i>]
11.	gi 6911551	71444	65	heat shock protein 70 [<i>Cucumis sativus</i>]
12.	gi 2827002	70986	65	HSP70 [<i>Triticum aestivum</i>]
13.	gi 87241037	71046	65	Heat shock protein Hsp70 [<i>Medicago truncatula</i>]
14.	gi 45331283	71184	65	70 kDa heat shock cognate protein 2 [<i>Vigna radiata</i>]
15.	gi 41584275	71202	64	heat shock cognate protein 70 [<i>Thellungiella halophila</i>]
16.	gi 34908140	70907	64	putative HSP70 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]
17.	gi 15241847	71342	63	ATP binding [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
18.	gi 108707463	71056	63	Heat shock cognate 70 kDa protein, putative, expressed [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]
19.	gi 15219109	70870	62	HSP70B; ATP binding [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
20.	gi 21338	71686	62	70 kDa heat shock protein [<i>Spinacia oleracea</i>]
21.	gi 162665432	71043	100	predicted protein [<i>Physcomitrella patens</i> subsp. patens]
22.	gi 125546233	46875	97	hypothetical protein Osl_013605 [<i>Oryza sativa</i> (indica cultivar-group)]
23.	gi 15232682	71103	89	heat shock cognate 70 kDa protein 3 (HSC70-3) (HSP70-3) [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
24.	gi 115456247	71267	86	Os03g0821100 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]
25.	gi 762844	71470	86	Hsc70 [<i>Lycopersicon esculentum</i>]
26.	gi 125543311	47415	80	hypothetical protein Osl_010683 [<i>Oryza sativa</i> (indica cultivar-group)]
27.	gi 56554972	70952	74	heat shock protein 70 [<i>Medicago sativa</i>]
28.	gi 162662524	70817	74	predicted protein [<i>Physcomitrella patens</i> subsp. patens]
29.	gi 162680921	70931	74	predicted protein [<i>Physcomitrella patens</i> subsp. patens]
30.	gi 162697021	70903	74	predicted protein [<i>Physcomitrella patens</i> subsp. patens]

БТШ 70 является довольно изученным белком для разных групп растений, который индуцируется в организме растения в ответ на воздействие ряда стрессовых факторов, является важным компонентом клетки в регуляции укладки белков. По литературным данным показана высокая гомология БТШ 70 у разных групп растений. На основе данных 2-D электрофореза была рассчитана молекулярная масса полипептида (пятно №3) – 70 kDa. Таким образом, полученные данные трипсинолиза и идентификации MALDI-TOF-TOF масс-спектра для пятна №3 с высокой долей вероятности позволяют предположить, что дифференциально экспрессированный полипептид у опытных растений ржи сорта “Верасень” с M_r 70kDa и $pI \sim 4,6$, действительно является белком теплового шока 70 ржи.

Предпринятая схема исследований на сегодняшний день является широко принятой для протеомных исследований и идентификации дифференциально экспрессированных белков. Проведенные исследования ДНК-связанной группы белков контрольных и подвергшихся микроволновой обработке растений (семян) ржи сорта “Верасень” методом двумерного электрофореза, последующего триптического гидролиза дифференциально экспрессированных белковых пятен и идентификации MALDI-TOF-TOF масс-спектров, подтвердили влияние микроволновой обработки семян на экспрессию ДНК-связанных белков, в том числе БТШ 70, который обладает N-терминальным АТФ-азным доменом. Требуется проведение дополнительных исследований на уровне кДНК методом RT-PCR со специфическими праймерами и Western-блоттингом со специфическими антителами, которые по-

зволят достоверно подтвердить данное предположение.

Выводы

Микроволновая обработка семян ржи приводит к изменению характера экспрессии фракции ДНК-связывающих белков, что может быть определено методом 2-D электрофореза. С помощью последующего протеолиза дифференциально экспрессируемых белковых пятен трипсином и MALDI TOF TOF масс-спектрометрии было показано, что микроволновая обработка индуцирует, в частности, экспрессию БТШ-70.

Список литературы

1. *Fridman E., Pichersky E.* Metabolomics, genomics, proteomics, and the identification of enzymes and their substrates and products // *Current Opinion in Plant Biology.* – 2005. – Vol. 8 (3) – P. 242–248.
2. *Tohge T., Nishiyama Y., Yokota Hirai M., et al.* Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of Arabidopsis plants over-expressing an MYB transcription factor// *The Plant Journal.* – 2005. – Vol. 42 (2). – P. 218–235.
3. *Arabidopsis Genomics Initiative (AGI).* Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana // *Nature.* – 2000. – Vol. 408. – P. 796–815.
4. *Goff S. A., et al* A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica) // *Science.* – 2002. – Vol. 296, №. 5565. – P. 92–100.
5. *Jansson S., Douglas C. J.* Populus: A Model System for Plant Biology // *Annual Review of Plant Biology.* – 2007. – Vol. 58. – P. 435–458.
6. *Sommerer N., et al.* Peptide Mass Fingerprinting. // *Plant Proteomic.* Ed. Thiellement H. – Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. – 2007. – P. 217–234.

7. Городецкая Е.А. Влияние плазменно-радиоволновой обработки на агрономические качества семян // Теоретические и прикладные аспекты интродукции растений как перспективного направления развития науки и народного хозяйства: материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 75-летию со дня образования ЦБС НАН Беларуси, Минск, 12–15 июня 2007 г. / ЦБС НАН Беларуси; под ред. В.Н. Решетникова. – Минск, 2007. – С.143–145
8. Thelen J. J., Peck S. C. Quantitative Proteomics in Plants: Choices in Abundance // *The Plant Cell*. – 2007. – Vol. 19. – P. 3339–3346.
9. Giavalisco P., Nordhoff E., Lehrach H., Gobom J., Klose J. Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis // *Electrophoresis*. – 2003. – Vol. 24. – P. 207–216.
10. Спиридович Е.В., Власова А.Б., Решетников В.Н. 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 // Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений: Сб. науч. Тр. III Междунар. научной конференции, ЦБС НАН Беларуси, 14–16 мая 2008 г., Минск. – С. 61–66.

*Представлена Л.Л. Лукаш
Поступила 8.10.2008*

**ПРОТЕОМНИЙ ПІДХІД
ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ДИФЕРЕНЦІАЛЬНО
ЕКСПРЕСОВАНИХ ДНК-ЗВ'ЯЗУВАЛЬНИХ
БІЛКІВ ПРОРОСТКІВ SECALE CEREALE**

*Е.В. Спиридович, Н.Б. Власова,
В.Н. Решетников*

ДНУ “Центральний ботанічний сад Національної академії наук Білорусі”
Мінськ 220012, вул. Сурганова, 2В
e-mail: nastasia_vlasova@nm.ru

Проведено дослідження фракції ДНК-зв'язувальних білків жита сорту “Верасень”, методом 2-D електрофорезу з наступним гідролізом трипсином диференціально експресованих білкових плям і MS MALDI TOF TOF детекцією. Отримано дані, що підтверджують вплив мікрохвильової обробки насіння на експресію ДНК-зв'язувальних білків, включаючи БТШ-70.

Ключові слова: *мікрохвильове випромінювання, фракція ДНК-зв'язувальних білків, 2-D електрофорез, MALDI-TOF-TOF мас-спектрометрія, БТШ-70.*

**PROTEOMIC APPROACH FOR
IDENTIFICATION OF DIFFERENTIALLY
EXPRESSING DNA-BINDING PROTEINS OF
SECALE CEREALE SEEDLINGS**

*E. V. Spiridovich, N. B. Vlasova,
V. N. Reshetnikov*

Central Botanical Garden of the NAS of
Belarus
Belarus, 220012, Minsk, Surganova str., 2B
e-mail: nastasia_vlasova@nm.ru

A study of DNA-binding protein fraction of rye cultivar “Verasen” by means of 2-D electrophoresis with subsequent trypsin hydrolysis of differentially expressed protein spots and MALDI TOF detection was undertaken. Data, showing the influence of microwave-irradiation treatment of seeds on the DNA-binding protein expression, including HSP-70, were obtained.

Key words: *Microwave radiation, fraction of DNA-binding proteins, 2-D electrophoresis, MALDI-TOF-TOF mass spectrometry*