

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 57, номер 2, 2021

---

---

Способы повышения чувствительности иммунохроматографических тест-систем с колориметрической детекцией (обзор)	
<i>В. Г. Панфёров, И. В. Сафенкова, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев</i>	107
Оптимизация биосинтеза (S)-3-гидроксимасляной кислоты из глюкозы по обращенному пути β-окисления жирных кислот рекомбинатными штаммами <i>Escherichia coli</i>	
<i>А. Ю. Гулевич, А. Ю. Скороходова, В. Г. Дебабов</i>	117
Иммунодоминантные белки покоящихся форм <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
<i>К. А. Трутнева, В. Г. Авдиенко, Г. Р. Дёмина, М. О. Шлеева, М. С. Шумков, Е. Г. Салина, А. С. Капрельяни</i>	127
Свойства внеклеточной протеиназы микромицета <i>Aspergillus ustus</i> 1, обладающей высокой активностью при гидролизе фибриллярных белков	
<i>Е. А. Попова, В. Г. Крейер, С. К. Комаревцев, С. В. Шабунин, А. А. Осмоловский</i>	138
Выделение, очистка и характеристика лектина <i>Fusarium solani</i> 4	
<i>Рин. С. Мухаммадиев, Риш. С. Мухаммадиев, Е. В. Скворцов, Л. Р. Валиуллин, А. П. Глинушкин, Т. В. Багаева</i>	145
Патогенные свойства и липидный состав мицелия в процессе роста глубинной культуры гриба <i>Stagonospora cirsii</i> ВИЗР 1.41	
<i>Г. М. Фролова, Е. Р. Котлова, С. В. Сокорнова, С. В. Сенник, А. Л. Шаварда, А. Д. Мишарев, А. О. Берестецкий</i>	152
Каталитические и молекулярные аспекты функционирования изоформ глутаматдегидрогеназы в кукурузе <i>Zea mays</i> L.	
<i>А. Т. Епринцев, Г. Б. Анохина, П. С. Оя, Я. И. Дедов</i>	163
Реакция растений <i>Nicotiana tabacum</i> , трансформированных геном холиноксидазы ( <i>codA</i> ), на действие пероксида водорода	
<i>И. Г. Широких, С. Ю. Огородникова, Я. И. Назарова, О. Н. Шуплецова</i>	172
Изменения в составе жирных кислот липидов печени и головного мозга мышей при приеме нанولیпидных комплексов	
<i>Н. П. Пальмина, Т. А. Мишарина, Н. И. Крикунова, А. С. Антипова, Е. И. Мартиросова, М. Г. Семёнова</i>	179
Перспективы использования <i>Gluconacetobacter sucrofermentas</i> ВКПМ В-11267 в биотопливных элементах	
<i>С. Е. Тарасов, Ю. В. Плеханова, А. Г. Быков, А. С. Казаков, М. В. Вишневская, Ю. М. Парунова, П. М. Готовцев, А. Н. Решетиллов</i>	187
Использование математических методов с целью оценки безопасности сельскохозяйственных культур	
<i>Е. В. Коротков, И. В. Яковлева, А. М. Камионская</i>	196

---

## Юбилей

Поздравляем профессора Николая Сергеевича Егорова со 100-летним юбилеем 206

---

---

# CONTENTS

---

---

Vol. 57, No. 2, 2021

---

---

Approaches for Increasing Sensitivity of Immunochromatographic Test-Systems with Colorimetric Detection (Review) <i>V. G. Panferov, I. V. Safenkova, A. V. Zherdev, and B. B. Dzantiev</i>	107
Optimization of Biosynthesis of ( <i>S</i> )-3-Hydroxybutyric Acid from Glucose Through Inverted Fatty acid $\beta$ -Oxidation Pathway by Recombinant <i>Escherichia coli</i> Strains <i>A. Yu. Gulevich, A. Yu. Skorokhodova, and V. G. Debabov</i>	117
Immunoreactive Proteins of Dormant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Cells <i>K. A. Trutneva, V. G. Avdienko, G. R. Demina, M. O. Shleeva, M. S. Shumkov, E. G. Salina, and A. S. Kaprelyants</i>	127
Properties of a Highly Active Extracellular Proteins for Fibrillary Proteins Produced by Micromycete <i>Aspergillus ustus</i> 1 <i>E. A. Popova, V. G. Kreyer, S. K. Komarevtsev, S. V. Shabunin, and A. A. Osmolovskiy</i>	138
Isolation, Purification and Characterization of a Lectin from Fungus <i>Fusarium solani</i> 4 <i>R. S. Mukhammadiev, R. S. Mukhammadiev, E. V. Skvortsov, L. R. Valiullin, A. P. Glinushkin, and T. V. Bagaeva</i>	145
Pathogenicity and Lipid Composition of Mycelium of the Fungus, <i>Stagonospora cirsi</i> VIZR 1.41 in the Process of Submerged Liquid Cultivation <i>G. M. Frolova, E. R. Kotlova, S. V. Sokornova, S. V. Senik, A. L. Shavarda, A. D. Misharev, and A. O. Berestetskiy</i>	152
Catalytic and Molecular Aspects of Functioning of Glutamate Dehydrogenase Isoform in Corn <i>Zea mays</i> L. <i>A. T. Eprintsev, G. B. Anokhina, P. S. Oya, and Ya. I. Dedov</i>	163
Reaction to the Action of Hydrogen Peroxide in Plants of <i>Nicotiana tabacum</i> Transformed by the Gene of Cholinoxidase ( <i>codA</i> ) <i>I. G. Shirokikh, S. Yu. Ogorodnikova, Ya. I. Nazarova, and O. N. Shupletsova</i>	172
Changes in Liver and Brain Free Fatty Acid Profile of Mouse When Receiving Nanolipid Complexes <i>N. P. Palmina, T. A. Misharina, N. I. Krikunova, A. S. Antipova, E. I. Martirosova, and M. G. Semenova</i>	179
Perspective of Using <i>Gluconacetobacter sucrofermentas</i> VKPM B-11267 in Biofuel Cells <i>S. E. Tarasov, Yu. V. Plekhanova, A. G. Bykov, A. S. Kazakov, M. V. Vishnevskaya, Yu. M. Parunova, P. M. Gotovtsev, and A. N. Reshetilov</i>	187
Use of Mathematical Methods for the Biosafety Assessment of Agricultural Crops <i>E. V. Korotkov, I. V. Yakovleva, and A. M. Kamionskaya</i>	196

---

---

## Anniversaries

Congratulations to Professor Nikolai Sergeevich Egorov on his 100th birthday	206
--	-----

---

---

УДК 57.083.3

## СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ С КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ (ОБЗОР)

© 2021 г. В. Г. Панфёров<sup>1</sup>, И. В. Сафенкова<sup>1</sup>, А. В. Жердев<sup>1</sup>, Б. Б. Дзантиев<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр  
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 10.09.2020 г.

После доработки 20.10.2020 г.

Принята к публикации 02.11.2020 г.

Методы иммунохроматографического анализа (ИХА), активно используемые в последние годы в медицинской диагностике и контроле качества и безопасности потребительской продукции вследствие быстрого и методически простого тестирования, обычно уступают по чувствительности другим аналитическим методам. В обзоре рассмотрены современные методические решения по обеспечению высокочувствительного ИХА, основанного на использовании наночастиц-маркеров и колориметрической детекции. Охарактеризованы основные направления таких разработок для снижения предела обнаружения: усиление детектируемого сигнала, который генерируется одной наночастицей, и формирование в ходе анализа иммунных комплексов, меченных агрегатами из большого числа наночастиц. Рассматриваются преимущества и ограничения разных подходов. Показано, что их применение обеспечивает снижение предела детекции при иммунохроматографическом анализе на 1–3 порядка, что делает данный метод конкурентоспособным по сравнению с инструментальными методами анализа.

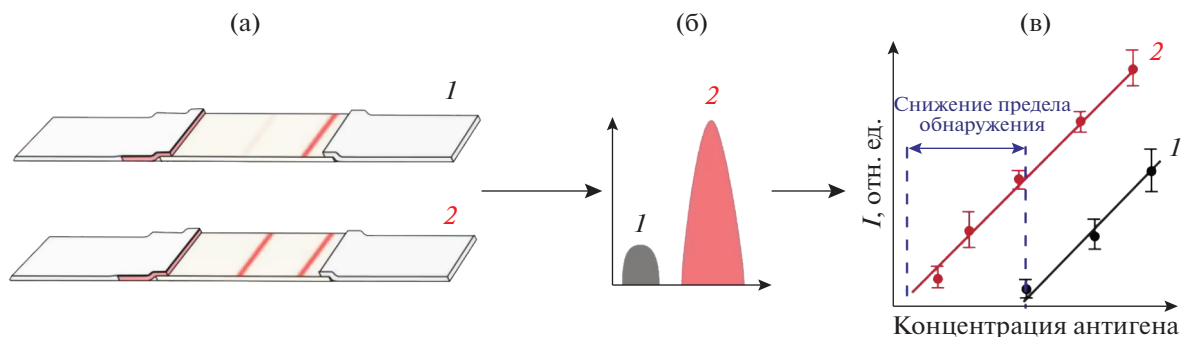
**Ключевые слова:** иммунохроматография, функционализированные наночастицы, амплификация сигнала, предел обнаружения

**DOI:** 10.31857/S0555109921020112

Имунохроматографический анализ (ИХА) совмещает высокоспецифичное взаимодействие антиген – антитело и аффинное отделение образующихся иммунных комплексов при движении жидкости вдоль пористых мембран [1]. Для реализации ИХА используют тест-полоски, представляющие собой мультимембранный композит с перекрывающимися мембранами и нанесенными на них реагентами, вдоль которого за счет капиллярных сил мигрирует жидкая проба. Это движение обеспечивает реализацию аналитических реакций и формирование зон с мечеными иммунными комплексами, связывание в которых оценивается по оптическому или иному сигналу метки и отражает содержание аналита в пробе. Благодаря простоте проведения анализа, подготовки проб, интерпретации результатов и возможности внелабораторного использования ИХА активно используется в различных областях – медицине, ветеринарии, контроле качества и безопасности пищевых продуктов, а также в сельском хозяйстве [1, 2]. Несмотря на все достоинства ИХА, высокие значения предела обнаружения

(ПрО) часто не позволяют выявлять низкие концентрации целевых аналитов в соответствии с практическими требованиями, что ограничивает применение этого метода [3].

В последние годы предложен ряд подходов к снижению ПрО ИХА [4–7]. Однако важно, чтобы достижение этой цели не сопровождалось существенным усложнением анализа и его сопряжением со сложным и дорогим приборным обеспечением. С учетом этого в настоящем обзоре рассмотрены и сравнительно охарактеризованы тест-системы для проведения ИХА, реализующие наиболее простую регистрацию окрашивания на тест-полоске. Если достаточен качественный результат анализа, регистрация проводится невооруженным глазом по наличию/отсутствию окрашенной зоны. При необходимости количественных результатов применяются портативные оптические детекторы, камеры и смартфоны, позволяющие определять интенсивность оптического сигнала. Использование этих недорогих и массово производимых детекторов сохраняет простоту тестирования и не лимитирует массовое применение ИХА [8].



**Рис. 1.** Снижение предела обнаружения в “сэндвич”-формате ИХА за счет увеличения интенсивности колориметрического сигнала в тестовой зоне: а – внешний вид тест-полосок до (1) и после усиления колориметрического сигнала (2); б – увеличение сигнала в тестовой зоне; в – зависимость интенсивности колориметрического сигнала ( $I$ , отн. ед.) от концентрации антигена до (1) и после усиления (2).

В данном обзоре систематизированы подходы к снижению ПрО ИХА с колориметрической детекцией на основании факторов, влияющих на интенсивность регистрируемого сигнала.

**Подходы к снижению предела обнаружения ИХА.** Эффективное взаимодействие в ИХА обеспечивается корректным выбором соотношения реагентов, мембранной комплектации тест-систем, дополнительными обработками мембран и режимом иммобилизации реагентов на мембранах или наночастицах-маркерах. Все эти факторы важны для высокочувствительного анализа, но обычно они корректно подбираются в рамках стандартных процедур мультипараметрической оптимизации [9].

Однако возможности таких оптимизаций часто недостаточны для достижения низкого ПрО, и требуются более радикальные решения по изменению схемы образования детектируемых меченных комплексов. Большой оптический сигнал, приходящийся на единичное связывание антиген-антитело на мембране тест-полоски, позволяет достигнуть визуально наблюдаемого окрашивания зоны при более низких концентрациях анализита, то есть снизить ПрО (рис. 1).

Предложенные способы увеличения интенсивности колориметрического сигнала в ИХА могут быть разделены на две группы, основанные на:

- изменении физико-химических свойств (состава, размера, формы, коэффициента молярной экстинкции и др.) наночастиц-маркеров;
- увеличении количества метки в зоне регистрации.

Для того, чтобы оценка возможностей разных способов снижения ПрО была достоверной, необходимо применить их к нескольким системам ИХА и определить, во сколько раз снизятся ПрО по сравнению с традиционной методикой проведения анализа. К сожалению, сопоставления с такими наиболее широко используемыми в ИХА маркерами, как сферические наночастицы золота

(НЧЗ) диаметром от 30 до 40 нм, обычно осуществляются для единственного анализита и далеко не во всех публикациях. В результате достижение такого же выигрыша в ПрО при проведении ИХА с другими иммунореагентами не гарантируется. Поэтому далее не будут приводиться конкретные значения ПрО, а результаты сравнения новых разработок с традиционным ИХА будут суммированы в конце обзора.

**Влияние физико-химических свойств маркера.** Хотя в коммерчески доступных иммунохроматографических тест-системах разнообразие маркеров ограничивается НЧЗ и окрашенными латексными частицами [7], в литературе описано применение в ИХА многих наночастиц-маркеров [10]. Среди них наиболее широко используются НЧЗ различной формы и размера, латексные, углеродные и магнитные наночастицы, квантовые точки и антистоксовые люминофоры. Преимущества предлагаемых альтернатив во многих случаях связаны со снижением ПрО не только для флуоресцентных или магнитных маркеров, требующих дополнительного приборного обеспечения [11], но и для колориметрии, например, при использовании углеродных наночастиц. Оценка возможностей новых наночастиц-маркеров требует учета их физико-химических свойств. В работе [9] предложено рассматривать “паспорта” кандидатных наночастиц, чтобы на основании оценки их оптических, сорбционных и других характеристик можно было сделать априорные выводы о перспективах их применения в ИХА. Однако данный обзор будет ограничен рассмотрением воздействий на наночастицы-маркеры, приводящих к изменению ПрО, а последствия замены одних наночастиц на другие обсуждаться не будут.

**Наночастицы золота.** Благодаря простым протоколам синтеза и получения комплексов с биомолекулами, а также уникальным оптическим свойствам НЧЗ являются самым распространенным маркером, как в коммерческих тест-системах

мах, так и в научных разработках [12–15]. Основные параметры НЧЗ, определяющие эффективность колориметрической детекции, – их размер и форма [16, 17]. Увеличение размера сферических НЧЗ сопровождается ростом коэффициента молярной экстинкции, что позволяет достичь большей интенсивности окрашивания при равном количестве частиц. Так, для НЧЗ с диаметрами 40, 60 и 80 нм коэффициент молярной экстинкции возрастает в 9, 35 и 87 раз соответственно по сравнению с наночастицами с диаметром 20 нм [18]. Использование более крупных НЧЗ успешно обеспечивало снижение ПрО ИХА для различных аналитов [19–21]. Согласно оценке, проведенной в работе [22], количество НЧЗ, регистрируемых визуально на тест-полоске, определяется их количеством на единицу площади и размером. Для активно используемой в ИХА рабочей нитроцеллюлозной мембраны с размером пор 10 мкм оно составляет от  $6.5 \times 10^7$  частиц/мм<sup>2</sup> для НЧЗ с диаметром 16 нм – до  $1.4 \times 10^5$  частиц/мм<sup>2</sup> для НЧЗ с диаметром 115 нм. Однако применение в ИХА НЧЗ диаметром более 50 нм ограничено их агрегационной нестабильностью и затрудненной миграцией в пористых мембранах [19, 23]. Методические решения, увеличивающие стабильность крупных НЧЗ, позволяют преодолевать это ограничение, но представляют ноу-хау таких коммерческих производителей, как Nanocomposix (США), Nanohybrids (США), BVI Solutions (Великобритания) и др. Возможности двухстадийного синтеза крупных НЧЗ, пригодных для применения в ИХА, показаны в недавней работе [24].

Для использования крупных НЧЗ в качестве маркера предложен подход, названный “золотым” усилением. По окончании анализа на НЧЗ восстанавливаются соли золота, что приводит к формированию крупных частиц [25, 26]. При таком подходе исключается необходимость движения крупных частиц по порам мембран, поскольку наращивание частиц до диаметра более 1 мкм (рис. 2) происходит после завершения движения жидкости по тест-полоске и иммунохимических взаимодействий. Показано, что НЧЗ становятся центрами восстановления солей золота в присутствии гидросиламина, пероксида водорода, бромид цетилтриметиламмония и аскорбиновой кислоты [27–34].

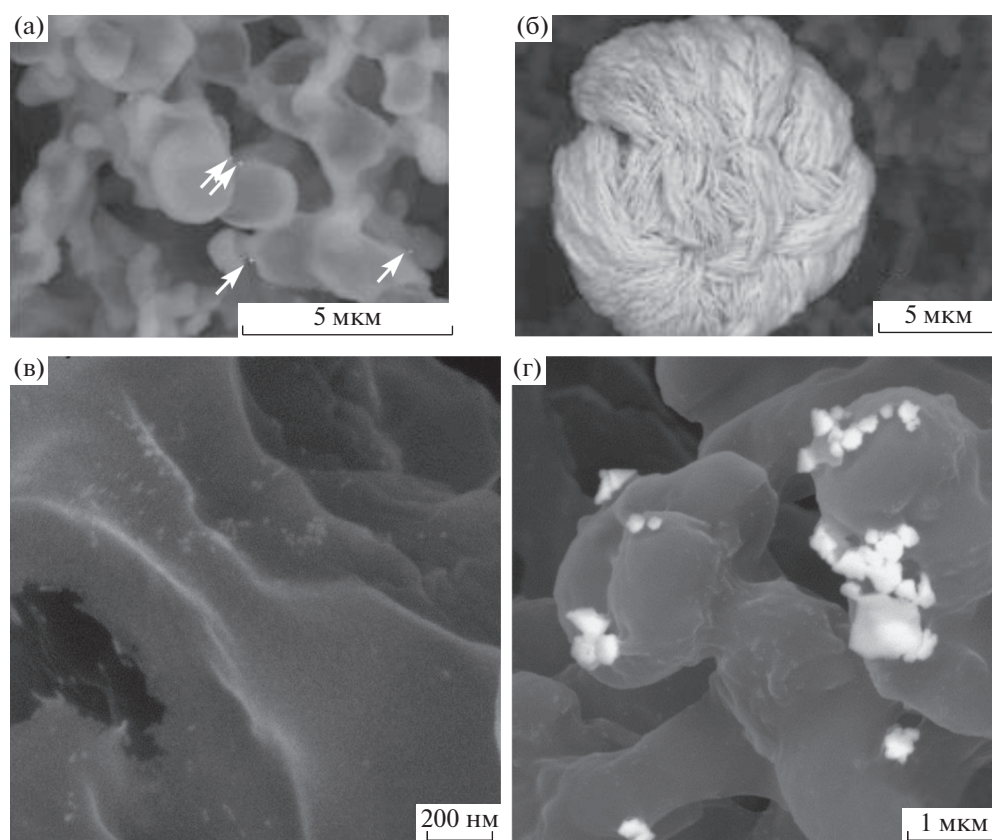
Методы “серебряного” и “медного” усиления, основанные на восстановлении солей серебра и меди на затравочных НЧЗ, сходны по механизму. Крупные агрегаты серебра, формирующиеся вокруг НЧЗ, создают темноокрашенную концентрированную зону на светлом фоне нитроцеллюлозной мембраны [35, 36]. В работе [37] описана более сложная методика ИХА, включающая восстановление солей серебра и платины на НЧЗ в тестовой зоне и последующую детекцию их ката-

лазной активности в растворе. Для проведения “медного” усиления в работах [38, 39] использовался раствор, содержащий хлорид меди(II), разветвленный полиэтиленимин и аскорбиновую кислоту. Аминогруппы в составе полиэтиленимина способны связывать ионы  $\text{Cu}^{2+}$  [40]. Формирующиеся комплексы восстанавливались аскорбиновой кислотой с образованием частиц ядро–оболочка только в присутствии затравочных НЧЗ. Использование данного подхода позволило снизить ПрО двух антигенов *Mycobacterium tuberculosis*, CFP-10 и Ag85B, примерно в 8 раз по сравнению с НЧЗ [38, 39].

Выбор между вариантами усиления определяется удобством их практического применения, в частности, минимальным числом стадий и дополнительных реагентов. “Серебряное” усиление характеризуется значительным увеличением интенсивности окрашивания и занимает мало времени (от 3 до 10 мин). К недостаткам метода относятся низкая стабильность исходных реагентов [41], а также необходимость удаления хлорид- и фосфат-ионов (компонентов тестируемых проб) из-за образования ими малорастворимых солей серебра. Предложенная в работе [42] предварительная пропитка стекловолоконных мембран солью серебра исключает необходимость включать в комплектацию набора для ИХА дополнительный жидкий реагент. “Золотое” усиление позволяет работать с такими достаточно стабильными реагентами, как соли золота, и восстановителями, пероксидом водорода и гидросиламином [25, 33, 34].

Интенсивность колориметрического сигнала на тест-полоске также зависит от формы НЧЗ. Так, в ИХА могут применяться несферические НЧЗ (нанозвезды, наностержни, наноцветы, нанопопкорн и др.), которые обладают большим коэффициентом молярной экстинкции по сравнению со сферическими мелкодисперсными частицами [17, 43]. Оптические свойства нанозвезд золота определяются их размером и формой (количеством граней). В работе [17] показано, что при увеличении диаметра нанозвезд золота с 21 до 55 нм максимальный коэффициент молярной экстинкции увеличивается с  $5.7 \times 10^8$  до  $26.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Установлено, что для наностержней золота зависимость коэффициента молярной экстинкции от объема близка к линейной ( $R^2 = 0.78042$ ) [44]. При увеличении отношения длины наностержня к диаметру возрастают коэффициент молярной экстинкции и длина волны максимума поглощения. Для мультиплексного детектирования нескольких соединений с помощью одной тест-полоски успешно применяются цветовые различия НЧЗ разной формы [45–47].

Конъюгаты НЧЗ разного размера и формы с антителами отличаются не только оптическими свойствами маркера, но и аффинностью иммун-



**Рис. 2.** Изменение размера и морфологии НЧЗ при “серебряном” (а, б) и “золотом” (в, г) усилении: микрофотографии мембран с частицами до усиления (а, в) и после усиления (б, г). Рисунки (а, б) из работы [119] приведены с любезного разрешения издательства Elsevier. Рисунки (в, г) из работы [120] приведены с любезного разрешения издательства Springer Nature.

ного взаимодействия. Большое число антител на одной наночастице увеличивает вероятность формирования поливалентных комплексов с мультивалентными антигенами, характеризующихся большими константами ассоциации [48, 49]. Экспериментально показано изменение аффинности конъюгатов НЧЗ с антителами в зависимости от размера частиц и поверхностной плотности иммобилизованных антител [49–51]. Следует отметить также, что вследствие малой продолжительности взаимодействий в ИХА, составляющей несколько мин, доля иммунных комплексов, успевающих за это время диссоциировать, крайне невелика. Поэтому отличия в свойствах разных конъюгатов наночастиц с антителами, проявляемые в ИХА, определяются, прежде всего, кинетическими константами ассоциации.

**Магнитные частицы (МЧ).** МЧ представляют собой частицы различной формы и размера (от десятков нм до нескольких мкм), обладающие магнитными свойствами. МЧ состоят из железа, никеля, кобальта или их оксидов, стабилизированных молекулами, адсорбированными на по-

верхности, или включением в полимерные матрицы [52]. Приложение внешнего магнитного поля позволяет отделить МЧ с образованными на их поверхности иммунными комплексами. Данное свойство было использовано в различных форматах иммуноанализа для концентрирования антигена и удаления компонентов матрикса [53]. Эти два эффекта могут применяться и в рамках одного анализа. Так, в работе [54] показано, что при десятикратном магнитном концентрировании *Escherichia coli* из пищевых матриксов ПрО снижается в 100 раз благодаря удалению компонентов пробы.

МЧ могут детектироваться не только визуально [55, 56], но и с использованием магнетометров [57]. Такой подход позволяет существенно снизить неспецифический сигнал в биологических пробах [58] и выявить малые количества маркера, а также достичь низких ПрО [59, 60].

Ключевой характеристикой, определяющей применение МЧ в ИХА, является их размер. В работе [61] показано, что использование в качестве маркера в ИХА крупных МЧ (около 1 мкм) ограничено из-за плохой их миграции по мембране и высокого неспецифического связывания, тогда как

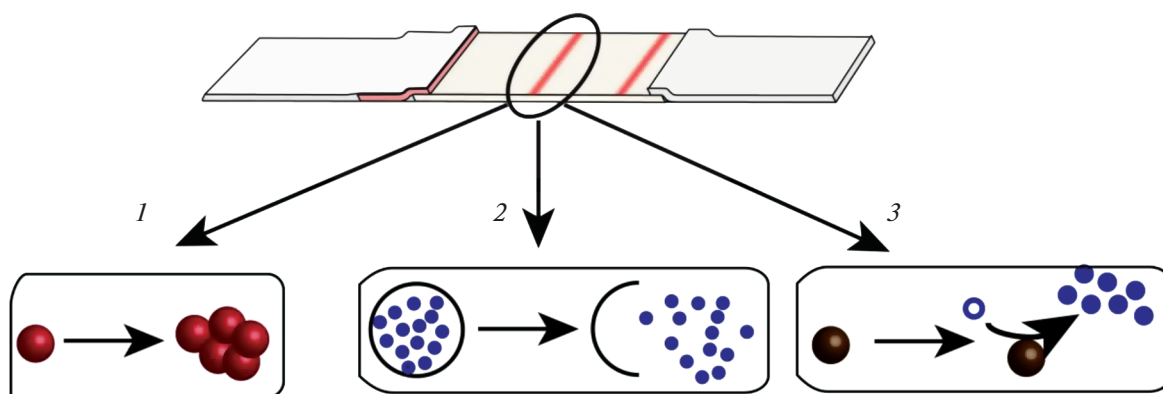


Рис. 3. Схематическое изображение подходов для увеличения количества метки в регистрируемой зоне путем агрегации маркера (1), высвобождения метки из частиц носителей (2), накопления окрашенной метки-продукта в катализируемой наночастицами реакции (3).

МЧ меньшего диаметра (100–200 нм) могут быть успешно использованы. В работе [56] исследовали влияние размера МЧ на интенсивность окрашивания тестовой зоны при проведении ИХА афлатоксина М1. Наибольшие сигналы были достигнуты для частиц с диаметром 180 нм, а их снижение для крупных (500 нм) и мелких (80 нм) МЧ объясняли плохой подвижностью. В работе [62] показано влияние размеров МЧ (от 5 до 23 нм) и их агрегатов после функционализации на чувствительность их индуктивной детекции на тест-полоске. Показано, что наилучший результат достигается для МЧ с размером 12 нм, а агрегация частиц, не препятствующая миграции по мембране, позволяет снизить ПрО.

Модификация МЧ позволяет использовать их как для сепарации, так и высокочувствительной оптической детекции [63]. Например, модификация МЧ квантовыми точками приводила к значительному снижению ПрО вследствие интенсивного флуоресцентного сигнала [64, 65].

**Увеличение количества метки в зоне регистрации сигнала.** Повышение количества маркера в составе иммунных комплексов увеличивает регистрируемый сигнал и, как следствие, снижает ПрО. Обеспечить это повышение можно тремя основными способами (рис. 3), связанными с:

- включением в состав иммунного комплекса больших количеств маркера (сборка агрегатов наночастиц);
- использованием частиц-носителей, содержащих большое количество маркера;
- каталитической конверсией наночастицами субстрата в детектируемый продукт (также рассматриваемый в таком случае как маркер).

**Включение в состав комплекса больших количеств маркера (сборка агрегатов).** Формирование агрегатов наночастиц в тестовой зоне увеличивает интенсивность окрашивания. Как отмечалось

выше, использование крупных частиц-маркеров в ИХА затруднено. Сборка агрегатов из небольших частиц позволяет преодолеть это ограничение. Связывание частиц могут обеспечивать высокоаффинные взаимодействия биотин – стрептавидин [66], антитело – антигенное антитело [67] и антитело – антиген [68]. Эффективность данного подхода зависит от свойств матрикса, аффинности реагентов и характеристик частиц (размера, концентрации, плотности иммобилизации реагентов на поверхности и др.). В работе [69] показана возможность варьировать размер агрегатов МЧ (около 400 нм), функционализированных биотинилированными антителами, и конъюгатов НЧЗ – стрептавидин (около 20 нм), изменяя соотношение концентраций частиц и время их инкубации.

Преимуществом данного подхода является простота реализации. Взаимодействующие маркеры, как правило, находятся на тест-полоске в высушенном виде. При проведении анализа происходит их регидратация и инициируются все последующие взаимодействия. Однако в ряде случаев воспроизводимость агрегационных процессов не высока. Кроме того, ламинарная миграция жидкости по тест-полоске препятствует эффективному смешиванию реагентов. Перспективна последовательная сборка иммунных комплексов в зоне связывания, активно используемая в микрофлюидике. Такую сборку может обеспечивать пространственное разделение потоков реагентов [70], различие в скоростях движения реагентов вследствие модификации мембраны [71] или изменение геометрии потоков [72].

**Частицы-носители, включающие большое количество метки.** Рост оптического сигнала обеспечивает также использование крупных частиц-носителей, например, липосом, высвобождающих большое количество детектируемой метки [73]. Так, одна липосома диаметром  $208 \pm 42$  нм вме-

**Таблица 1.** Сравнение подходов к снижению пределов обнаружения ИХА

Подход к снижению ПрО	Аналит	Снижение ПрО*, n раз	Ссылка
Изменение диаметра НЧЗ с 52 до 33.4 нм	Х вирус картофеля	3	[20]
Изменение диаметра НЧЗ с 20 до 35 нм	<i>E. coli</i> O157:H7	10	[19]
Восстановление солей золота на поверхности НЧЗ	<i>E. coli</i> O157:H7	6	[106]
	<i>Salmonella typhimurium</i>	7	[106]
	<i>E. coli</i> O157:H7	8	[107]
	Вирус птичьего гриппа	100	[27]
	Вирус болезни Ньюкастла	100	[27]
	<i>Salmonella enteridis</i>	100	[34]
Восстановление солей серебра на поверхности НЧЗ	Абрин-а	100	[42]
	Фумонизин В1	2.5	[108]
	Дезоксиниваленол	2	[108]
	Кадмий	4	[109]
	Х вирус картофеля	10	[110]
	Антигены <i>Helicobacter pylori</i>	10	[111]
	Простат-специфический антиген	3	[41]
Использование наночастиц золота	Прокальцитонин	5	[112]
	Афлатоксин В1	10	[113]
	<i>E. coli</i> O157:H7	100	[114]
Агрегация МЧ и НЧЗ	Х вирус картофеля	33	[69]
Агрегация двух конъюгатов НЧЗ	<i>E. coli</i> O157:H7	100	[67]
	Тропонин I	100	[115]
	Вирус гриппа А	8	[116]
Агрегация трех конъюгатов НЧЗ	Прокальцитонин	30	[66]
Пероксидазные свойства наночастиц железа	Вирус Эбола	100	[85]
Каталитические свойства конъюгатов наночастиц с ПХ	Прогестерон	30	[117]
	<i>E. coli</i> O157:H7	1000	[118]
Каталитические свойства конъюгатов наночастиц с ЩФ	Х вирус картофеля	27	[104]

\* Снижение ПрО по сравнению с традиционным ИХА на основе сферических НЧЗ диаметром от 30 до 40 нм.

щает около  $3.8 \times 10^5$  молекул флуоресцентного красителя сульфородамина В [74]. В работе [75] показано, что при использовании липосом с инкапсулированным сульфородамином в качестве маркера для ИХА *Salmonella typhimurium* ПрО снижается на пять порядков по сравнению с коммерческими тест-системами с НЧЗ.

Применение липосом в ИХА ограничено их невысокой стабильностью в разных средах. Так, разрушение липосом фосфолипазами (содержащимися в пробах) или некоторыми органическими растворителями (экстрагентами) вызывает не-

специфичное окрашивание мембраны. Однако подход, основанный на высвобождении метки, перспективен и может быть реализован с использованием таких более стабильных частиц, как наноконтейнеры [76], альгинатные частицы и др.

**Конверсия наночастицами субстрата в детектируемый продукт.** Третий подход для усиления оптического сигнала основан на использовании маркеров с каталитической активностью. Образование детектируемого продукта обеспечивает либо непосредственно наночастица (нанозим) [77], либо конъюгированный с ней фермент [78].



В настоящее время известны нанозимы с пероксидазо-, оксидазо-, каталазо- и супероксиддисмутазо- и гидролазо-подобными активностями [77]. Нанозимы активно применяются в различных аналитических системах [79]. Их каталитическая активность определяется, прежде всего, площадью свободной поверхности. Показано увеличение каталитической активности нанозимов при снижении размера частиц [80–82]. Нанозимы с разветвленной поверхностью обладают большей каталитической активностью по сравнению со сферическими частицами [83, 84]. Для ИХА особый интерес представляют окрашенные нанозимы, наночастицы оксида железа [85], платины [86], биметаллические частицы Au-Pt [87, 88] и Pt-Pd [89], частицы Берлинской лазури [90] и др.

Нанозимы могут быть использованы в качестве колориметрической (собственная окраска) [91] и каталитически активной метки (как правило, с пероксидазной активностью) [92, 93]. Снижение ПрО при использовании каталитических свойств основано на конверсии субстрата в детектируемый продукт. Амплификация сигнала достигается в результате формирования единичной частицей нанозима множества молекул регистрируемого продукта. Использование каталитических свойств нанозима позволяет снизить ПрО на 2–3 порядка по сравнению с колориметрической меткой [84, 93, 94]. Применение нанозимов для снижения ПрО ИХА ограничивает неконтролируемая адсорбция на их поверхности компонентов проб [85], снижающая каталитическую активность. Такой же эффект наблюдается при функционализации поверхности нанозимов [95].

Другой вариант каталитически активной метки – ферменты, присоединенные к наночастицам [96]. В качестве таких реагентов в ИФА наиболее широко используются пероксидаза из корней хрена (ПХ) и щелочная фосфатаза (ЩФ). Использование ПХ позволило снизить ПрО ИХА на 2–3 порядка по сравнению с неамплифицированным анализом [97–99]. Однако применение этого маркера ограничено эндогенной пероксидазной активностью проб. Пероксидазы и небелковые компоненты с пероксидазо-подобной активностью, присутствующие в большинстве биопроб, приводят к накоплению окрашенного продукта ферментативной реакции даже при отсутствии антигена в пробе. ЩФ имеет меньшее распространение и активность в биопробах по сравнению с ПХ и поэтому успешно используется в качестве метки для ИХА [70, 100–103]. Применение ЩФ в ИХА обеспечило 27-кратное снижение ПрО [104] и 46-кратное – в дот-иммуноанализе с использованием бумажных носителей [105].

Для эффективного применения каталитического подхода необходимо минимизировать фон, создаваемый неспецифически связанным марке-

ром, а также естественными ферментами, присутствующими в пробе. Для этого может использоваться магнитное концентрирование и отмывка тест-полосок.

**Общая сравнительная оценка.** Снижение ПрО, наряду с повышением информативности результатов тестирования и мультиплексностью, является перспективным направлением развития ИХА. В табл. 1 представлены преимущества различных использовавшихся подходов. Наиболее интересны универсальные методические решения, которые могут быть применены для широкого спектра аналитов. Системы ИХА, включающие дополнительные стадии, имеют ограниченные перспективы практического использования. Предпочтительна реализация “сухой” системы, то есть тест-полоски, содержащей все реагенты. Представляет интерес также применение портативных средств регистрации оптического сигнала, позволяющее оперативно определять концентрацию аналита и снижать ПрО благодаря не зависящей от человека оценке связывания маркера.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-04108).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V.* // Trends Anal. Chem. 2014. V. 55. P. 81–93.
2. *Li Y.-F., Sun Y.-M., Beier R.C., Lei H.-T., Gee S., Hammock B.D., Wang H., Wang Z., Sun X., Shen Y.-D., Yang J.-Y., Xu Z.-L.* // Trends Anal. Chem. 2017. V. 88. P. 25–40.
3. *Ye H., Xia X.* // J. Mater. Chem. 2018. V. 6. № 44. P. 7102–7111.
4. *Liu L., Yang D., Liu G.* // Biosens. Bioelectron. 2019. V. 136. P. 60–75.
5. *Mahmoudi T., de la Guardia M., Shirdel B., Mokhtarzadeh A., Baradaran B.* // Trends Anal. Chem. 2019. V. 116. P. 13–30.
6. *Bishop J.D., Hsieh H.V., Gasperino D.J., Weigl B.H.* // Lab. Chip. 2019. V. 19. № 15. P. 2486–2499.
7. *Zhou Y., Ding L., Wu Y., Huang X., Lai W., Xiong Y.* // Trends Anal. Chem. 2019. V. 112. P. 147–160.
8. *Urusov A.E., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* // Biosensors. 2019. V. 9. № 3. Article 89. <https://doi.org/10.3390/bios9030089>
9. *Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* Rapid Test – Advances in Design, Format and Diagnostic Applications. Chapter 2. Rijeka: InTech, 2018. P. 9–43.
10. *Goryacheva I.Y., Lenain P., De Saeger S.* // Trends Anal. Chem. 2013. V. 46. P. 30–43.
11. *Gong X., Cai J., Zhang B., Zhao Q., Piao J., Peng W., Gao W., Zhou D., Zhao M., Chang J.* // J. Mater. Chem. 2017. V. 5. № 26. P. 5079–5091.
12. *Wong R., Tse H.* Lateral Flow Immunoassay Totowa: Humana Press, 2009. 223 p.

13. Jans H., Huo Q. // Chem. Soc. Rev. 2012. V. 41. № 7. P. 2849–2866.
14. Dykman L., Khlebtsov N. // Chem. Soc. Rev. 2012. V. 41. № 6. P. 2256–2282.
15. Krajczewski J., Kołtątaj K., Kudelski A. // RSC Adv. 2017. V. 7. № 28. P. 17559–17576.
16. Liu X., Atwater M., Wang J., Huo Q. // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2017. V. 58. № 1. P. 3–7.
17. De Puig H., Tam J.O., Yen C.-W., Gehrke L., Hamad-Schifferli K. // J. Phys. Chem. C. 2015. V. 119. № 30. P. 17408–17415.
18. Dolimyi A.I. // Colloid J. 2017. V. 79. № 5. P. 611–620.
19. Cui X., Huang Y., Wang J., Zhang L., Rong Y., Lai W., Chen T. // RSC Adv. 2015. V. 5. № 56. P. 45092–45097.
20. Safenkova I., Zherdev A., Dzantiev B. // Anal. Bioanal. Chem. 2012. V. 403. № 6. P. 1595–1605.
21. Chen X., Leng Y., Hao L., Duan H., Yuan J., Zhang W., Huang X., Xiong Y. // Theranostics. 2020. V. 10. № 8. P. 3737–3748.
22. Khlebtsov B.N., Tumskiy R.S., Burov A.M., Pylaev T.E., Khlebtsov N.G. // ACS Appl. Nano Mater. 2019. V. 2. № 8. P. 5020–5028.
23. Posthuma-Trumpie G.A., Korf J., van Amerongen A. // Anal. Bioanal. Chem. 2009. V. 393. № 2. P. 569–582.
24. Byzova N.A., Zherdev A.V., Khlebtsov B.N., Burov A.M., Khlebtsov N.G., Dzantiev B.B. // Sensors. 2020. V. 20. № 12. Article 3608.  
<https://doi.org/10.3390/s20123608>
25. Dias J.T., Svedberg G., Nystrand M., Andersson-Svahn H., Gantelius J. // Sci. Rep. 2017. V. 7. Article 6837.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-07030-0>
26. Zayats M., Baron R., Popov I., Willner I. // Nano Lett. 2005. V. 5. № 1. P. 21–25.
27. Li J., Zou M., Chen Y., Xue Q., Zhang F., Li B., Wang Y., Qi X., Yang Y. // Anal. Chim. Acta. 2013. V. 782. P. 54–58.
28. Liu X., Xu H., Xia H., Wang D. // Langmuir. 2012. V. 28. № 38. P. 13720–13726.
29. Ahmed S.R., Oh S., Baba R., Zhou H., Hwang S., Lee J., Park E.Y. // Nanoscale Res. Lett. 2016. V. 11. Article 65.  
<https://doi.org/10.1186/s11671-016-1290-3>
30. Lan M., Guo Y., Zhao Y., Liu Y., Gui W., Zhu G. // Anal. Chim. Acta. 2016. V. 938. P. 146–155.
31. Wang X., Niessner R., Knopp D. // Analyst. 2015. V. 140. № 5. P. 1453–1458.
32. Zhang Z., Wang H., Chen Z., Wang X., Choo J., Chen L. // Biosens. Bioelectron. 2018. V. 114. P. 52–65.
33. Newman J.D.S., Blanchard G.J. // Langmuir. 2006. V. 22. № 13. P. 5882–5887.
34. Bu T., Huang Q., Yan L., Huang L., Zhang M., Yang Q., Yang B., Wang J., Zhang D. // Food Control. 2018. V. 84. P. 536–543.
35. Gupta S., Huda S., Kilpatrick P.K., Velev O.D. // Anal. Chem. 2007. V. 79. № 10. P. 3810–3820.
36. Liu R., Zhang Y., Zhang S., Qiu W., Gao Y. // Appl. Spectrosc. Rev. 2014. V. 49. № 2. P. 121–138.
37. Huang D., Lin B., Song Y., Guan Z., Cheng J., Zhu Z., Yang C.J. // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2019. V. 11. № 22. P. 1800–1806.
38. Phan L.M.T., Kim E.B., Cheon S.A., Shim T.S., Hwa K.J., Park T.J. // Sens. Actuat. B Chem. 2020. V. 317. Article 128220.  
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128220>
39. Phan L.M.T., Rafique R., Baek S.H., Nguyen T.P., Park K.Y., Kim E.B., Kim J.G., Park J.P., Kailasa S.K., Kim H.-J., Chung C., Shim T.S., Park T.J. // Biosens. Bioelectron. 2018. V. 121. P. 111–117.
40. Kislenko V.N., Oliynyk L.P. // J. Polymer Sci. A Polymer Chem. 2002. V. 40. № 7. P. 914–922.
41. Rodríguez M.O., Covián L.B., García A.C., Blanco-López M.C. // Talanta. 2016. V. 148. P. 272–278.
42. Yang W., Li X., Liu G., Zhang B., Zhang Y., Kong T., Tang J., Li D., Wang Z. // Biosens. Bioelectron. 2011. V. 26. № 8. P. 3710–3713.
43. Nehl C.L., Liao H., Hafner J.H. // Nano Lett. 2006. V. 6. № 4. P. 683–688.
44. Near R.D., Hayden S.C., Hunter R.E., Thackston D., El-Sayed M.A. // J. Phys. Chem. C. 2013. V. 117. № 45. P. 23950–23955.
45. Anfossi L., Di Nardo F., Russo A., Cavalera S., Giovannoli C., Spano G., Baumgartner S., Lauter K., Baggiani C. // Anal. Bioanal. Chem. 2019. V. 411. № 9. P. 1905–1913.
46. Di Nardo F., Alladio E., Baggiani C., Cavalera S., Giovannoli C., Spano G., Anfossi L. // Talanta. 2019. V. 192. P. 288–294.
47. Di Nardo F., Baggiani C., Giovannoli C., Spano G., Anfossi L. // Microchim. Acta. 2017. V. 184. № 5. P. 288–294.
48. Mani V., Wasalathanthri D.P., Joshi A.A., Kumar C.V., Rusling J.F. // Anal. Chem. 2012. V. 84. № 23. P. 10485–10491.
49. Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // J. Immunol. Methods. 2010. V. 357. № 1–2. P. 17–25.
50. Saha B., Evers T.H., Prins M.W.J. // Anal. Chem. 2014. V. 86. № 16. P. 8158–8166.
51. Byzova N.A., Safenkova I.V., Slutskaya E.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // Bioconjug. Chem. 2017. V. 28. № 11. P. 2737–2746.
52. Xianyu Y., Wang Q., Chen Y. // Trends Anal. Chem. 2018. V. 106. P. 213–224.
53. Urusov A.E., Petrakova A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // Nanotechnol. Russ. 2017. V. 12. № 9–10. P. 471–479. (Урусов А.Е., Петракова А.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. // Росс. нанотехнол. 2017. Т. 12. № 9–10. С. 3–11.)
54. Li Q., Qi H., Zhong Z., Zhou H.-X., Deng C.-Y., Zhu H., Li J.-F., Wang X.-L. // Intern. J. Nanomed. 2011. № 6. P. 3033–3039.
55. Liu F., Zhang H., Wu Z., Dong H., Zhou L., Yang D., Ge Y., Jia C., Liu H., Jin Q., Zhao J., Zhang Q., Mao H. // Talanta. 2016. V. 161. P. 205–210.
56. Liu D., Huang Y., Wang S., Liu K., Chen M., Xiong Y., Yang W., Lai W. // Food Control. 2015. V. 51. P. 218–224.
57. Moyano A., Serrano-Pertierra E., Salvador M., Martínez-García J., Rivas M., Blanco-López M.C. //

- Diagnostics. 2020. V. 10. № 5. Article 288.  
<https://doi.org/10.3390/diagnostics10050288>
58. Gas F., Baus B., Queré J., Chapelle A., Dreanno C. // *Talanta*. 2016. V. 147. P. 581–589.
59. Guteneva N.V., Znoyko S.L., Orlov A.V., Nikitin M.P., Nikitin P.I. // *Microchim. Acta*. 2019. V. 186. № 9. Article 621.  
<https://doi.org/10.1007/s00604-019-3726-9>
60. Bragina V.A., Znoyko S.L., Orlov A.V., Pushkarev A.V., Nikitin M.P., Nikitin P.I. // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. № 15. P. 9852–9857.
61. Yan J., Liu Y., Wang Y., Xu X., Lu Y., Pan Y., Guo F., Shi D. // *Sens. Actuat. B Chem.* 2014. V. 197. P. 129–136.
62. Salvador M., Gallo-Cordova Á., Moyano A., Martínez-García J.C., Blanco-López M.C., Morales M.P., Rivas M. // *Analyst*. 2020. V. 145. № 17. P. 5905–5914.
63. Huang Z., Hu S., Xiong Y., Wei H., Xu H., Duan H., Lai W. // *Trends Anal. Chem.* 2019. V. 114. P. 151–170.
64. Wang C., Xiao R., Wang S., Yang X., Bai Z., Li X., Rong Z., Shen B., Wang S. // *Biosens. Bioelectron.* 2019. V. 146. Article 111754.  
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111754>
65. Guo L., Shao Y., Duan H., Ma W., Leng Y., Huang X., Xiong Y. // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. № 7. P. 4727–4734.
66. Taranova N.A., Urusov A.E., Sadykhov E.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Microchim. Acta*. 2017. V. 184. № 10. P. 4189–4195.
67. Chen M., Yu Z., Liu D., Peng T., Liu K., Wang S., Xiong Y., Wei H., Xu H., Lai W. // *Anal. Chim. Acta*. 2015. V. 876. P. 71–76.
68. Zhong Y., Chen Y., Yao L., Zhao D., Zheng L., Liu G., Ye Y., Chen W. // *Microchim. Acta*. 2016. V. 183. № 6. P. 1989–1994.
69. Razo S.C., Panferov V.G., Safenkova I.V., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Anal. Chim. Acta*. 2018. V. 1007. P. 50–60.
70. Preechakasedkit P., Siangproh W., Khongchareonporn N., Ngamrojanavanich N., Chailapakul O. // *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 102. P. 27–32.
71. Lutz B., Liang T., Fu E., Ramachandran S., Kauffman P., Yager P. // *Lab Chip*. 2013. V. 13. № 14. P. 2840–2847.
72. Parolo C., Medina-Sánchez M., de la Escosura-Muñiz A., Merkoçi A. // *Lab. Chip*. 2013. V. 13. № 3. P. 386–390.
73. Edwards K.A., Baeumner A.J. // *Talanta*. 2006. V. 68. № 5. P. 1421–1431.
74. Edwards K.A., Baeumner A.J. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. V. 386. № 5. P. 1335–1343.
75. Shukla S., Leem H., Kim M. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 401. № 8. P. 2581–2590.
76. Hofmann C., Duerkop A., Baeumner A.J. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2019. V. 58. № 37. P. 12840–12860.
77. Wu J., Wang X., Wang Q., Lou Z., Li S., Zhu Y., Qin L., Wei H. // *Chem. Soc. Rev.* 2019. V. 48. № 4. P. 1004–1076.
78. Gao X., Xu L.-P., Wu T., Wen Y., Ma X., Zhang X. // *Talanta*. 2016. V. 146. P. 648–654.
79. Huang Y., Ren J., Qu X. // *Chem. Rev.* 2019. V. 119. № 6. P. 4357–4412.
80. Peng F.F., Zhang Y., Gu N. // *Chinese Chem. Lett.* 2008. V. 19. № 6. P. 730–733.
81. Asati M.A., Santra D.S., Kaittanis M.C., Nath D.S., Perez P.J.M. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009. V. 48. № 13. P. 2308–2312.
82. Komkova M.A., Karyakina E.E., Karyakin A.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 2018. V. 140. № 36. P. 11302–11307.
83. Wu J., Qin K., Yuan D., Tan J., Qin L., Zhang X., Wei H. // *ACS Appl. Mater. Interf.* 2018. V. 10. № 15. P. 12954–12959.
84. Gao Z., Ye H., Tang D., Tao J., Habibi S., Minerick A., Tang D., Xia X. // *Nano Lett.* 2017. V. 17. № 9. P. 5572–5579.
85. Duan D., Fan K., Zhang D., Tan S., Liang M., Liu Y., Zhang J., Zhang P., Liu W., Qiu X., Kobinger G.P., Fu G.G., Yan X. // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 74. P. 134–141.
86. Lin S., Zheng D., Li A., Chi Y. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2019. V. 411. № 18. P. 4063–4071.
87. Loynachan C.N., Thomas M.R., Gray E.R., Richards D.A., Kim J., Miller B.S., Brookes J.C., Agarwal S., Chudasama V., McKendry R.A., Stevens M.M. // *ACS Nano*. 2018. V. 12. № 1. P. 279–288.
88. Shim K., Lee W.C.; Heo Y.U.; Shahabuddin M., Park M.S., Hossain M.S.A., Kim J.H. // *Sci. Rep.* 2018. V. 9. № 1. Article 894.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-36759-5>
89. Zhao Y., Yang M., Fu Q., Ouyang H., Wen W., Song Y., Zhu C., Lin Y., Du D. // *Anal. Chem.* 2018. V. 90. № 12. P. 7391–7398.
90. Zhao B., Huang Q., Dou L., Bu T., Chen K., Yang Q., Yan L., Wang J., Zhang D. // *Sens. Actuat. B Chem.* 2018. V. 275. P. 223–229.
91. He Q., Yang H., Chen Y., Shen D., Cui X., Zhanga C., Xiao H., Eremin S.A., Fang Y., Zhao S. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2020. V. 187. Article 113317.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113317>
92. Song W., Zhao B., Wang C., Ozaki Y., Lu X. // *J. Mater. Chem. B*. 2019. V. 7. № 6. P. 850–875.
93. Panferov V.G., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Microchim. Acta*. 2020. V. 187. № 5. Article 268.  
<https://doi.org/10.1007/s00604-020-04253-3>
94. Jiang T., Song Y., Wei T., Li H., Du D., Zhu M., Lin Y. // *Biosens. Bioelectron.* 2016. V. 77. P. 687–694.
95. Gao L., Zhuang J., Nie L., Zhang J., Zhang Y., Gu N., Wang T., Feng J., Yang D., Perrett S., Yan X. // *Nat. Nanotechnol.* 2007. V. 2. № 9. P. 577–583.
96. Zu I.R.F., Ginsberg V.K., Houts T., Rabble J., Merrick H., Ullman E.F., Fischer M.M., Chung Slzto C., Stiso S.N., Utman D.J. // *Clin. Chem.* 1985. V. 31. № 7. P. 1144–1150.
97. Cho I.-H., Irudayaraj J. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 405. № 10. P. 3313–3319.
98. Ren W., Cho I.-H., Zhoua Z., Irudayaraj J. // *Chem. Commun.* 2016. V. 52. P. 4930–4933.
99. Kim H.-S., Oh B.-K. // *BioChip J.* 2014. V. 8. № 1. P. 1–7.

100. Santivañez S.J., Rodriguez M.L., Rodriguez S., Sako Y., Nkouawa A., Kobayashi Y., Sotomayor A.L., Peralta J.E., Valcarcel M., Gonzalez A.E., Garcia H.H., Ito A. // *J. Clin. Microbiol.* 2015. V. 53. № 12. P. 3859–3863.
101. Endo F., Tabata T., Sadato D., Kawamura M., Ando N., Oboki K., Ukaji M., Kobayashi K., Kobayashi Y., Ikeda T., Shibasaki F. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 2. Article e0171314.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171314>
102. Ono T., Kawamura M., Arao S., Nariuchi H. // *J. Immunol. Methods.* 2003. V. 272. № 1–2. P. 211–218.
103. Akter S., Kustila T., Leivo J., Muralitharan G., Vehniäinen M., Lamminmäki U. // *Biosensors.* 2019. V. 9. № 2. Article 79.  
<https://doi.org/10.3390/bios9020079>
104. Panferov V.G., Safenkova I.V., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Microchim. Acta.* 2018. V. 185. № 1. Article № 25.  
<https://doi.org/10.1007/s00604-017-2595-3>
105. Lathwal S., Sikes H.D. // *Lab. Chip.* 2016. V. 16. № 8. P. 1374–1382.
106. Shin J.H., Hong J., Go H., Park J., Kong M., Ryu S., Kim K.-P., Roh E., Park J.-K. // *J. Agric. Food Chem.* 2018. V. 66. № 1. P. 290–297.
107. Wang J., Chen M., Sheng Z., Liu D., Wu S., Lai W.-H. // *RSC Adv.* 2015. V. 5. № 76. P. 62300–62305.
108. Yu Q., Li H., Li C., Zhang S., Shen J., Wang Z. // *Food Control.* 2015. V. 54. P. 347–352.
109. Xing C., Kuang H., Hao C., Liu L., Wang L., Xu C. // *Food Agric. Immunol.* 2014. V. 25. № 2. P. 287–300.
110. Drygin Y.F., Blintsov A.N., Grigorenko V.G., Andreeva I.P., Osipov A.P., Varitzev Y.A., Uskov A.I., Kravchenko D.V., Atabekov J.G. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. V. 93. № 1. P. 179–189.
111. Byzova N.A., Zherdev A.V., Sveshnikov P.G., Sadykhov E.G., Dzantiev B.B. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2015. V. 51. № 5. P. 608–617. (Бызова Н.А., Жердев А.В., Свешников П.Г., Садыхов Э.Г., Дзантиев Б.Б. // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 5. С. 520–530.)
112. Serebrennikova K.V., Samsonova J.V., Osipov A.P., Senapati D., Kuznetsov D.V. // *Nano Hybrids Compos.* 2017. V. 13. P. 47–53.
113. Ji Y., Ren M., Li Y., Huang Z., Shu M., Yang H., Xiong Y., Xu Y. // *Talanta.* 2015. V. 142. P. 206–212.
114. Zhang L., Huang Y., Wang J., Rong Y., Lai W., Zhang J., Chen T. // *Langmuir.* 2015. V. 31. № 19. P. 5537–5544.
115. Choi D.H., Lee S.K., Oh Y.K., Bae B.W., Lee S.D., Kim S., Shin Y.-B., Kim M.-G. // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 25. № 8. P. 1999–2002.
116. Wiriyachaiporn N., Maneerakorn W., Apiwat C., Dharakul T. // *Microchim. Acta.* 2015. V. 182. № 1–2. P. 85–93.
117. Samsonova J.V., Safronova V.A., Osipov A.P. // *Talanta.* 2015. V. 132. P. 685–689.
118. Cho I.-H., Bhunia A., Irudayaraj J. // *Int. J. Food Microbiol.* 2015. V. 206. P. 60–66.
119. Wada A., Sakoda Y., Oyamada T., Kida H. // *J. Virol. Methods.* 2011. V. 178. № 1–2. P. 82–86.
120. Panferov V.G., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Microchim. Acta.* 2018. V. 185. № 11. Article 506.  
<https://doi.org/10.1007/s00604-018-3052-7>

## Approaches for Increasing Sensitivity of Immunochromatographic Test-Systems with Colorimetric Detection (Review)

V. G. Panferov<sup>a</sup>, I. V. Safenkova<sup>a</sup>, A. V. Zherdev<sup>a</sup>, and B. B. Dzantiev<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

\**e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru*

Recently, immunochromatographic assay (ICA) methods have found a wide range of uses in medical diagnostic, quality control, and consumer safety products because of their rapidity and methodological simplicity of testing; however, ICAs are usually less sensitive than other analytical methods. In this review, we survey modern methodological solutions for ensuring high sensitivity of ICAs based on the use of nanoparticle markers and colorimetric detection and characterize the main direction of such works focusing on lowering the detection limit amplification of the detectable signal generated by a single nanoparticle and forming, during the assay, immune complexes labeled with aggregates consisting of a large number of nanoparticles. The advantages and limitations of different approaches are discussed. We show that their use provides a decrease in the detection limit of ICA by 1–3 orders of magnitude, which makes this method quite competitive compared with instrumental methods of analysis.

**Keywords:** immunochromatography, functionalized nanoparticles, signal amplification, limit of detection

УДК 577.121

## ОПТИМИЗАЦИЯ БИОСИНТЕЗА (S)-3-ГИДРОКСИМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ГЛЮКОЗЫ ПО ОБРАЩЕННОМУ ПУТИ β-ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ РЕКОМБИНАТНЫМИ ШТАММАМИ *Escherichia coli*

© 2021 г. А. Ю. Гулевич<sup>1</sup>, \*, А. Ю. Скороходова<sup>1</sup>, В. Г. Дебабов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”  
Российской академии наук, Москва, 117312 Россия

\*e-mail: andrey.gulevich@gmail.com

Поступила в редакцию 01.10.2020 г.

После доработки 26.10.2020 г.

Принята к публикации 02.11.2020 г.

Исследован микроаэробный синтез 3-гидроксимасляной кислоты штаммом *Escherichia coli* BOX3.1 Δ4 P<sub>L</sub>-*atoB* P<sub>L</sub>-*tesB* (MG1655 *lacI*<sup>Q</sup>, Δ*ackA-pta*, Δ*poxB*, Δ*ldhA*, Δ*adhE*, Δ*fadE*, P<sub>L</sub>-SD<sub>phi10</sub>-*atoB*, P<sub>trc-ideal-4</sub>-SD<sub>phi10</sub>-*fadB*, P<sub>L</sub>-SD<sub>phi10</sub>-*tesB*), ранее направленно сконструированным для биосинтеза целевого соединения из глюкозы по обращенному пути β-окисления жирных кислот. Достигнут выход целевого продукта 0.12 моль/моль. Инактивация в штамме гена неспецифичной тиоэстеразы YciA приводила к росту выхода 3-гидроксимасляной кислоты до 0.15 моль/моль. Для оптимизации биосинтеза продукта был сконструирован штамм MGΔ4 P<sub>L</sub>-*tesB* (MG1655 Δ*ackA-pta*, Δ*poxB*, Δ*ldhA*, Δ*adhE*, P<sub>L</sub>-SD<sub>phi10</sub>-*tesB*), в котором была дополнительно обеспечена экспрессия генов, кодирующих ключевые ферменты β-окисления жирных кислот в составе плазмиды pMW118m-*atoB-fadB*. Уровень микроаэробного синтеза 3-гидроксимасляной кислоты из глюкозы штаммом MGΔ4 P<sub>L</sub>-*tesB* (pMW118m-*atoB-fadB*) в тестовых условиях достигал 0.35 моль/моль. Инактивация в штамме гена неспецифичной тиоэстеразы YciA приводила к незначительному снижению побочной продукции ацетата. Последующая инактивация в штамме гена неспецифичной тиоэстеразы YdiI практически не влияла на уровень синтеза побочных продуктов. Контролируемые условия культивирования сконструированного штамма MGΔ4 P<sub>L</sub>-*tesB* Δ*yciA* (pMW118m-*atoB-fadB*) в биореакторе позволили достичь выхода 3-гидроксимасляной кислоты из глюкозы, составляющего 0.75 моль/моль.

**Ключевые слова:** 3-гидроксимасляная кислота, β-окисление жирных кислот, метаболическая инженерия, *Escherichia coli*

DOI: 10.31857/S0555109921020045

Полезные свойства многих промышленно значимых и физиологически активных веществ, обладающих высокой добавленной стоимостью, определяются наличием в составе соответствующих молекул хиральных центров, обуславливающих существование оптических изомеров химически идентичных соединений. Получение оптически чистых энантиомеров в рамках стереоселективного органического синтеза зачастую является нетривиальной задачей, требующей использования дорогостоящих катализаторов, жестких физических условий и агрессивных растворителей. Использование в качестве стартового материала удобных хиральных синтонов значительно упрощает задачу эффективного синтеза целевого продукта.

В частности, энантиомеры 3-гидроксимасляной кислоты (3-ГМК) могут служить в качестве удобного стартового материала для получения таких значимых оптически активных соединений,

как лекарственные препараты, феромоны, косметические средства, душистые вещества и агрохимикаты [1–4]. В норме стереоизомеры 3-ГМК не секретируются известными микроорганизмами при утилизации сахаров. Тем не менее, их микробиологический синтез из дешевого возобновляемого сырья может служить экономически оправданной альтернативой энерго- и ресурсозатратному [5] химическому способу получения соответствующих соединений при использовании направленно сконструированных высокоэффективных микробных штаммов-продуцентов. Действительно, в последние годы была продемонстрирована принципиальная возможность рациональной инженерии такой традиционной для промышленной биотехнологии бактерии как *Escherichia coli* для биосинтеза из глюкозы как (R)- [6, 7], так и (S)-3-ГМК [7, 8].

Соответствующий биохимический путь, ведущий к формированию целевого соединения, пред-

ставляет собой последовательность реакций, включающих начальную конденсацию двух молекул предшественника, ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА, дальнейшее восстановление ацетоацетил-КоА в 3-гидроксибутирил-КоА и финальный гидролиз тиоэфирной связи последнего с образованием 3-ГМК. Данные реакции катализируются ацетил-КоА-С-ацетилтрансферазой (КФ 2.3.1.9), НАДФН-зависимой (*R*)-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназой (КФ 1.1.1.36) либо НАДН-зависимой (*S*)-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназой (КФ 1.1.1.35), и тиоэстеразой (КФ 3.1.2.20). Таким образом, основные реакции образования ключевого хирального интермедиата, 3-гидроксибутирил-КоА, могут рассматриваться как аналогичные таковым биосинтеза 3-гидроксибутирата, в первую очередь у ралстоний, в случае (*R*)-стереоизомера и биосинтеза 1-бутанола у клостридий в случае (*S*)-стереоизомера. Этим объясняется выбор определенных гетерологических ферментов, использованных для достижения синтеза того или иного стереоизомера 3-ГМК в рекомбинантных штаммах, (*R*)-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназы PhaB из *Ralstonia eutropha* [6, 7] и (*S*)-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназы Hbd из *Clostridium acetobutylicum* [7, 8]. Вместе с тем, клостридиальные реакции биосинтеза 1-бутанола с биохимической точки зрения подобны обращенным реакциям цикла  $\beta$ -окисления жирных кислот (БОЖК), биохимического пути существующего у множества микроорганизмов. Экспериментально, функциональная обратимость БОЖК была показана в ряде исследований, демонстрирующих продукцию по данному пути рекомбинантными штаммами *E. coli* из глюкозы или глицирина различных алифатических карбоновых кислот с различной длиной цепи, а также спиртов [9–12]. Следовательно, (*S*)-3-ГМК может быть синтезирована *E. coli* из глюкозы в результате частичного однократного обращения БОЖК при оверэкспрессии подходящей тиоэстеразы без необходимости использования каких-либо чужеродных генов.

Действительно, ранее был сконструирован штамм VOX3.1  $\Delta 4 P_L\text{-}atoB P_L\text{-}tesB$ , производный от штамма *E. coli* дикого типа MG1655, способный к энантиоселективному биосинтезу из глюкозы (*S*)-3-ГМК по обращенному БОЖК [13]. В данном штамме нативные AtoC и FadR-зависимые регуляторные области генов *atoB* и *fadB*, кодирующих ацетил-КоА С-ацетилтрансферазу и бифункциональную (*S*)-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназу/еноил-КоА-гидратазу (КФ 1.1.1.35/КФ 4.2.1.17), были заменены искусственными регуляторными элементами, включающими эффективный сайт связывания рибосом гена  $\phi 10$  из фага T7, а также промоторы  $P_L$  фага лямбда и  $P_{irc\text{-}ideal\text{-}4}$  [14], соответственно. Кроме того, в штамме были инактивированы, за счет делеций генов *ackA-pta*, *poxB*, *ldhA* и *adhE*, основные пути смешанно-кислотного бро-

жения, конкурирующие с обращенным БОЖК за восстановленные эквиваленты и ключевые метаболиты-предшественники, пируват и ацетил-КоА. Множественные раунды обращения БОЖК в штамме были предотвращены вследствие делеции гена *fadE*, кодирующего ацил-КоА дегидрогеназу (КФ 1.3.99.3), а формирование 3-ГМК из прямого КоА-предшественника было обеспечено в результате оверэкспрессии гена тиоэстеразы II, *tesB*.

Тем не менее, несмотря на способность штамма VOX3.1  $\Delta 4 P_L\text{-}atoB P_L\text{-}tesB$  синтезировать (*S*)-3-ГМК стереоселективно с относительно высоким выходом, достигающим в определенных условиях 66% от теоретического максимума, наблюдаемая секреция штаммом уксусной кислоты в качестве основного побочного продукта утилизации глюкозы предполагала возможность дальнейшей метаболической инженерии штамма либо его реконструированных аналогов для оптимизации синтеза целевого вещества.

Цель работы – оптимизация биосинтеза (*S*)-3-гидроксиасляной кислоты из глюкозы по обращенному пути  $\beta$ -окисления жирных кислот рекомбинантными штаммами *Escherichia coli*.

## МЕТОДИКА

**Реактивы.** В работе использовали рестриктазы, ДНК полимеразу Taq, T4 ДНК лигазу (“Thermo Scientific”, Литва), высокоточную ДНК полимеразу Phusion (“Thermo Scientific”, Финляндия), набор для сборки по Гибсону HiFi Builder и высокоточную ДНК полимеразу Q5 (“New England Biolabs”, США) и набор для сайт-направленного мутагенеза QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (“Agilent Technologies”, США). ПЦР-продукты очищали электрофорезом в агарозном геле и выделяли с помощью QIAquick Gel Extraction Kit (“Qiagen”, США). Олигонуклеотиды (“Евроген”, Россия) представлены в табл. 1. Компоненты питательных сред, соли и другие реактивы были произведены фирмами “Panreac” (Испания) и “Sigma” (США).

**Бактериальные штаммы, плазмиды и среды.** Штамм *E. coli* K-12 MG1655 (ВКПМ В-6195), ранее сконструированный штамм *E. coli* MG4 [15], являющийся производным штамма MG1655 лишенным путей смешанно-кислотного брожения, и ранее сконструированный штамм *E. coli* VOX3.1  $\Delta 4 P_L\text{-}atoB P_L\text{-}tesB$  [13], с измененной регуляцией экспрессии генов, кодирующих ферменты аэробного  $\beta$ -окисления жирных кислот и тиоэстеразу II, также лишенный путей смешанно-кислотного брожения, были использованы в качестве исходных для конструирования всех полученных в работе штаммов. Использованные в работе бактериальные штаммы и плазмиды представлены в табл. 2. Для культивирования бактерий применя-

**Таблица 1.** Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

№	Последовательность
P1	5'-catgtctacaacacataacgtccctcagggcgatctcgctcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P2	5'-ttactcaacaggtgaaggcgaggtttcttcaggtgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P3	5'-aatgatattggaacggaaatcaccttggagcactcgctcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P4	5'-tcacaaaatggcggctgtaaatcgtagcgaacagctgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P5	5'-cgtgaaggtgtcagtgcttc-3'
P6	5'-gtgacggcatggtcactacagc-3'
P7	5'-gatattcctgccgtagccagg-3'
P8	5'-caagttgagtagacatagcatcctcg-3'
P9	5'-ctatttctccagaattgccatgatttttc-3'
P10	5'-gctcagcgtgtaggtatctcagttc-3'
P11	5'-aatcatggcaattctggaagaataggcggccggcttctgaaattctgaaatgagctgttgacattgtgagcgtcacaattat-3'
P12	5'-gcaaaggtaccctcaggtatgtagcactcctgtgaaattgtatccgctcacaattccacacattataattgtgagcgtcacaatgtc-3'
P13	5'-gtcgacatcctcaggggtacctttgcctggcggcagtagcg-3'
P14	5'-cgaactgagatacctacagcgtgagcgcagatgcaagattgtagaaacgcaaaaaggc-3'
P15	5'-gaatcaaaagctgccgacaacac-3'
P16	5'-gcttgagcgaacgacctac-3'
P17	5'-attagtcgacatggctagatctaaaaattgtgtcatcgtcagttc-3'
P18	5'-attaggtacctcagcctccttaggatccattcaaccgttcaatcaccatcg-3'
P19	5'-attagtcgacatggctagatcctttacaaggcgacaccctgta-3'
P20	5'-tccatgatgatggtgatgatgagccgttttcaggtcgccaacc-3'
P21	5'-attaggtacctcagcctccttaggatccatgatgatggtgatgatg-3'
P22	5'-ctggaacagcaatcagacctaaaagggtcgtc-3'
P23	5'-gcagcagcccttttaggtctgattgctgttccag-3'
P24	5'-gtttaatcgctggaagacctgccggtgccaccattg-3'
P25	5'-caatggtcggcaccggcaggtcttccaggcgattaaac-3'

ли полноценные среды LB, SOB, SOC и минимальную среду M9 [16], при необходимости в них добавляли ампициллин (100 мкг/мл) или хлорамфеникол (30 мкг/мл).

**Конструирование штаммов.** Инактивацию генов *usiA* и *ydiI* в хромосоме *E. coli* осуществляли с использованием методики, описанной ранее [17].

Линейные фрагменты ДНК для инактивации целевых генов, содержащие маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*), получали при помощи ПЦР с использованием пар праймеров P1 и P2, P3 и P4, и плазмиды pMW118-(*λattL*-Cm-*λattR*) [18] в качестве матрицы. Полученные фрагменты ДНК были индивидуально интегрированы в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плазмиду-помощник pKD46. Факт соответствия предполагаемых и полученных экспериментально структур хромосом отобранных штаммов, с индивидуально инаktivированными генами *usiA* и *ydiI*, подтверждали ПЦР-анализом с помощью пар локус-специфичных праймеров P5 и P6, P7 и P8.

Штаммы BOX3.1 Δ4 P<sub>L</sub>-*atoB* P<sub>L</sub>-*tesB* Δ*yciA*, MGΔ4 P<sub>L</sub>-*tesB*, MGΔ4 P<sub>L</sub>-*tesB* Δ*yciA* и MGΔ4 P<sub>L</sub>-*tesB* Δ*yciA* Δ*ydiI* были получены при введении индивидуальных модификаций в хромосомы целевых штаммов с помощью P1-зависимых трансдукций [16]. В случае штамма MGΔ4 P<sub>L</sub>-*tesB* использовали ранее полученный препарат трансдуцирующего фага, несущего соответствующую генетическую модификацию [13]. Удаление маркера, фланкированного *att*-сайтами фага лямбда, из хромосом целевых штаммов, проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [19]. Трансформацию штаммов плазмидами осуществляли по стандартной методике.

**Конструирование плазмид.** Плазмида pMW118m, производная низкокопийного вектора pMW118, содержащая генетическую конструкцию *NorI*-P<sub>trc-ideal-2</sub>-SD<sub>lacZ</sub>-*SalI*-*XhoI*-*KpnI*-T<sub>trmB</sub>-*SphI*, была получена методом сборки по Гибсону. Необходимые линейные фрагменты ДНК, обладающие требуемыми областями фланговой гомологии, были получены ПЦР с использованием пар специфичных прай-

Таблица 2. Штаммы и плазмиды

Объект	Генотип	Ссылка
<b>Штамм</b>		
MG1655	Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
DH5alpha	F <sup>-</sup> , Δ( <i>argF-lac</i> )169, φ80d <i>lacZ</i> 58(M15), <i>phoA8</i> , <i>glnX44</i> (AS), λ <sup>-</sup> , <i>deoR481</i> , <i>rfbC1</i> , <i>gyrA96</i> (NalR), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thiE1</i> , <i>hsdR17</i>	CGSC#: 14231
BOX3.1 Δ4 P <sub>L</sub> - <i>atoB</i> P <sub>L</sub> - <i>tesB</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> <sup>Q</sup> , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>fadE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>phi10</sub> - <i>atoB</i> , P <sub>irc-ideal-4</sub> -SD <sub>phi10</sub> - <i>fadB</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>phi10</sub> - <i>tesB</i>	[13]
BOX3.1 Δ4 P <sub>L</sub> - <i>atoB</i> P <sub>L</sub> - <i>tesB</i> Δ <i>yciA</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> <sup>Q</sup> , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>fadE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>phi10</sub> - <i>atoB</i> , P <sub>irc-ideal-4</sub> -SD <sub>phi10</sub> - <i>fadB</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>phi10</sub> - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i>	Данная работа
MGΔ4	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i>	[15]
MGΔ4 P <sub>L</sub> - <i>tesB</i>	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>phi10</sub> - <i>tesB</i>	Данная работа
MGΔ4 P <sub>L</sub> - <i>tesB</i> Δ <i>yciA</i>	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>phi10</sub> - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i>	Данная работа
MGΔ4 P <sub>L</sub> - <i>tesB</i> Δ <i>yciA</i> Δ <i>ydiI</i>	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>phi10</sub> - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i> , Δ <i>ydiI</i>	Данная работа
<b>Плазмида</b>		
pMW118-(λ <i>attL</i> -Cm-λ <i>attR</i> )	pSC101, <i>bla</i> , <i>cat</i> , λ <i>attL-cat-attR</i>	[18]
pKD46	pINT-ts, <i>bla</i> , P <sub>araB</sub> -λ <i>gam-bet-exo</i>	[17]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, <i>bla</i> , P <sub>R</sub> -λ <i>xis-int</i> , cIts857	[19]
pMW118	pSC101, <i>bla</i>	GenBank AB005475
pMW118m	pMW118, <i>NotI</i> -P <sub>irc-ideal-2</sub> -SD <sub>lacZ</sub> - <i>SalI-XhoI-KpnI-T<sub>rrnB</sub>-SphI</i>	Данная работа
pMW118m- <i>atoB-fadB</i>	pMW118, P <sub>irc-ideal-2</sub> -SD <sub>lacZ</sub> - <i>atoB-fadB-T<sub>rrnB</sub></i>	Данная работа

меров. Линеаризованный вектор pMW118mod получали в результате ПЦР с плазмидой pMW118, использованной в качестве матрицы, и комплементарными ее целевым областям праймерами P9 и P10. Фрагмент ДНК, содержащий 5'-концевую область гомологии с фланговым участком линеаризованного вектора pMW118mod, сайт узнавания *NotI*, промотор P<sub>irc-ideal-2</sub> (O<sub>lac-ideal</sub>-P<sub>irc</sub>/O<sub>lac-ideal</sub>) [14], SD гена *lacZ*, сайты узнавания *SalI*, *XhoI*, *KpnI* и короткую 3'-концевую область гомологии с 5'-концевым участком терминатора *rrnB* оперона, был получен с помощью ПЦР с праймерами P11 и P12, обладающими областями взаимной комплементарности. Фрагмент ДНК, включающий сайты узнавания *SalI*, *XhoI*, *KpnI*, терминатор *rrnB* оперона *E. coli*, сайт узнавания *SphI* и последовательность, гомологичную фланговому участку линеаризованного вектора pMW118mod, получали в результате ПЦР с использованием праймеров P13 и P14 и хромосомной ДНК *E. coli* в качестве матрицы.

ПЦР фрагменты очищали и добавляли к реакционной смеси набора NEB HiFi Builder, содержащей экзонуклеазу, высокоточную ДНК-полимеразу и ДНК-лигазу. Для отбора целевых ковалентно-

замкнутых плазмидных ДНК, полученной реакционной смесью трансформировали клетки *E. coli* DH5alpha, с последующей селекцией трансформантов на среде, содержащей ампициллин. Соответствие запланированных и экспериментально полученных структур искусственного генетического элемента *NotI*-P<sub>irc-ideal-2</sub>-SD<sub>lacZ</sub>-*SalI-XhoI-KpnI-T<sub>rrnB</sub>-SphI* в серии плазмид, выделенных из отобранных Ap<sup>R</sup>-трансформантов, подтверждали секвенированием с использованием праймеров P15, P16.

Гены *atoB* и *fadB* первоначально были клонированы в составе вектора pUC18. С этой целью кодирующие области соответствующих генов были амплифицированы с помощью ПЦР с использованием пар праймеров P17, P18, в случае гена *atoB*, а также P19, P20, и затем P19, P21, в случае гена *fadB*, и хромосомной ДНК штамма *E. coli* MG1655 в качестве матрицы. Дизайн праймеров предполагал, что в результате подобной амплификации кодирующие области генов будут дополнительно содержать на флангах сайты узнавания *BglII* и *VamHI*, расположенные, соответственно, непосредственно после старт- и непосредственно перед стоп-кодоном, а также сайты узнавания *SalI*,



расположенные на 5'-концах и сайты узнавания *XhoI* и *KpnI*, расположенные на 3'-концах ампликонов. Полученные фрагменты ДНК были, впоследствии, клонированы в составе вектора pUC18 по сайтам *Sall* и *KpnI* и секвенированы. Природные сайты узнавания *BglII*, расположенные в кодирующей области гена *fadB*, были далее элиминированы в результате двухэтапного сайт-направленного мутагенеза с использованием QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit ("Agilent Technologies", США). Для этого плазида с клонированным геном *fadB* была амплифицирована в ходе ПЦР с использованием локус-специфичных праймеров P22 и P23, обработана рестриктазой *DpnI*, и подвержена второму раунду ПЦР с праймерами P24 и P25. После трансформации полученной реакционной смесью клеток штамма *E. coli* DH5alpha, последующей селекции Ap<sup>R</sup> клонов и выделения из них кольцевых плазмидных ДНК, последние были секвенированы и отобрана плазида, содержащая корректную последовательность гена *fadB*. В дальнейшем гены *atoB* и *fadB* были переклонированы из соответствующих pUC-производных плазмид в состав плазмиды pMW118m-*atoB-fadB* под контроль промотора P<sub>trc-ideal-2</sub> и SD<sub>lacZ</sub> с использованием рестрикционных сайтов *AatII*, *Sall* и *XhoI*.

**Культивирование штаммов.** Рекомбинантные штаммы выращивали в течение ночи в среде M9, содержащей 2 г/л глюкозы, при 37°C. Для первичного микроаэробного культивирования по 5 мл полученных ночных культур разбавляли в 10 раз, добавляя 45 мл среды M9, содержащей 10 г/л глюкозы и 10 г/л дрожжевого экстракта. Полученные культуры инкубировали в колбах объемом 750 мл, закрытых невентилируемыми пробками на роторной качалке при 250 об./мин в течение 8 ч при 37°C. Насыщение среды кислородом оценивали в контрольных колбах с соответствующими культурами при инкубации в присутствии резазурина. Для индукции экспрессии генов, находящихся под контролем LacI-зависимых промоторов P<sub>trc-ideal-2</sub> и P<sub>trc-ideal-4</sub>, спустя 3 ч от начала инкубации в среды культивирования добавляли изопропил-β-D-тиоолактозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1.0 мМ. При выращивании штаммов, содержащих pMW118-производные плазмиды, в среды дополнительно вносили 100 мкг/мл ампициллина (ООО "Синтез", Россия).

Контролируемое микроаэробное культивирование проводили в биореакторе, как описано ранее [13]. Использовали комбинированную среду, содержащую (г/л): триптон – 10, дрожжевой экстракт – 5.0, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O – 15.1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 3.0, NH<sub>4</sub>Cl – 1.0, NaCl – 0.5, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O – 0.015, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0.5 и 5 мг/л тиамина. Аэробную фазу накопления биомассы проводили в течение 7 ч при 37°C и 850 об./мин с потоком воздуха

0.5 л/мин. Индуцировали экспрессию генов, находящихся под контролем LacI-зависимых промоторов через 3 ч инкубации. Микроаэробную продуктивную фазу инициировали добавлением в среду глюкозы до концентрации 25 г/л, изменением оборотов мешалки до 250 об./мин, и снижением потока воздуха до 0.1 л/мин.

Собранные для анализа клеточные суспензии центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. В полученных супернатантах определяли концентрации секретированных метаболитов и остаточной глюкозы. Все эксперименты повторялись не менее трех раз.

**Аналитические методы.** Концентрации органических кислот в культуральных жидкостях, освобожденных от биомассы центрифугированием, определяли методом ВЭЖХ с использованием системы "Waters" HPLC system (США). Применяли ион-эксклюзионную колонку Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) ("Phenomenex", США) с детекцией при длине волны 210 нм. В качестве подвижной фазы использовали водный раствор серной кислоты (2.5 мМ) со скоростью потока 0.5 мл/мин. Для измерения концентрации глюкозы, система была укомплектована рефрактивным детектором "Waters" 2414 и колонкой Spherisorb-NH2 ("Waters", США). Подвижной фазой служила смесь ацетонитрил/вода (объемное соотношение 75/25) при скорости потока 1.0 мл/мин.

Идентификацию и количественный анализ содержания 3-ГМК в культуральных жидкостях осуществляли методом хромато-масс-спектрометрии по ранее разработанным методикам [13]. Использовали газовый хроматограф Agilent 6890N, оснащенный автосамплером 7683B и масс-селективным детектором Agilent 5975, укомплектованный капиллярной колонкой DB-5MS ("Agilent", США) длиной 30 м, внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной пленки 0.25 мкм. В качестве газа носителя использовался гелий со скоростью потока 1.0 мл/мин. Пробу 1 мкл вводили в испаритель в режиме деления потока 1 : 50. Температура испарителя составляла 230°C. Использовали следующую температурную программу термостата колонки: начальная изотерма 1 мин при 60°C, последующий градиент до 120°C со скоростью 3°C/мин, затем до 220°C со скоростью 20°C/мин, финальная изотерма 1 мин при 220°C. Применяли ионизацию электронами (электронный удар, 70 eV) при режиме работы масс-селективного детектора с контролем заданных ионов (117.10 m/z, 131.10 m/z, 147.10 m/z, 191.10 m/z). Температура ионного источника была установлена на 230°C. Пробоподготовка включала экстракцию аналита из культуральной жидкости, упаривание экстрактов в токе азота и дериватизацию с получением триметилсилильных производных. Полученные данные обрабатывали с помощью Agilent MSD ChemStation Software. Для

идентификации целевого анализа использовались библиотечные данные (индекс удерживания и масс-спектр). Количественный анализ осуществляли с использованием соответствующего стандарта.

Энантиомерную форму синтезированной штаммами 3-ГМК определяли с помощью хиральной газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором, используя колонку “Agilent” CP-Chiral-Dex CB (длина 25 м, 0.25 мм внутренний диаметр, толщина пленки 0.25 мкм). Проводили предварительную дериватизацию анализа с получением метилового эфира 3-ацетоксимасляной кислоты. В качестве стандартов использовали ацетилированные коммерчески доступные метиловые эфиры (*R*)- и (*S*)-3-ГМК (“Sigma-Aldrich”, США). Использовали газовый хроматограф Shimadzu GC-2010 (Япония), оснащенный автосамплером АОС-5000. В качестве газа-носителя использовали гелий со скоростью потока 1.0 мл/мин. Применяли режим ввода с делением потока (1 : 20, объем пробы 1 мкл). Температура инжектора составляла 200°C, термостата колонки – 110°C, детектора – 250°C. Обработку данных осуществляли с использованием программы GCsolution (“Shimadzu”, Япония).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Биосинтез 3-ГМК по обращенному БОЖК из двух молекул ацетил-КоА требует расхода одного восстановленного эквивалента НАДН. Гликолитическая утилизация глюкозы приводит к формированию двух молекул пирувата и сопровождается генерацией двух НАДН. Анаэробная конверсия пирувата в ацетил-КоА под действием пируватформатлиазы (КФ 2.3.1.54) не сопровождается образованием НАДН, в то время как при аэрации действие пируватдегидрогеназы (КФ 1.2.4.1/2.3.1.12/1.8.1.4) приводит к формированию дополнительной молекулы НАДН на каждый образующийся ацетил-КоА. Соответственно, у штаммов *E. coli* лишенных способности к брожению уровень анаэробного формирования НАДН будет превосходить необходимый для эффективного биосинтеза 3-ГМК. Кроме того, известно, что клетки *E. coli* с инактивированными генами *pta*, *ldhA* и *adhE* не способны к анаэробному росту [20]. В результате, при анаэробно-гликолизе у подобных штаммов, сконструированных для продукции 3-ГМК, будет подавляться не только повышенным внутриклеточным пулом НАДН, но и избыточной генерацией АТФ [21]. С другой стороны, в присутствии кислорода, внутриклеточная доступность НАДН, требующегося для биосинтеза 3-ГМК, будет лимитироваться активностью дыхательной цепи переноса электронов. Таким образом, ни полностью анаэробные, ни аэробные условия не могли рассматриваться

как оптимальные для биосинтеза 3-ГМК из глюкозы по обращенному БОЖК ранее сконструированным штаммом VOX3.1 Δ4 P<sub>L</sub>-*atoB* P<sub>L</sub>-*tesB*.

Действительно, при первичной характеристике, штамм VOX3.1 Δ4 P<sub>L</sub>-*atoB* P<sub>L</sub>-*tesB* в аэробных условиях не синтезировал из глюкозы заметных количеств 3-ГМК, а при анаэробно-продукции целевого вещества была довольно низкой [13]. В настоящей работе биосинтетический потенциал штамма исходно оценивали при микроаэробном культивировании. В таких условиях штамм, в зависимости от индукции экспрессии гена *fadB*, находящегося под контролем LacI-зависимого промотора, синтезировал из глюкозы от 2.9 до 4.9 мМ 3-ГМК с молярным выходом 0.07–0.12 моль/моль (табл. 3). При этом основную часть потребленной глюкозы штамм секретирует в виде пировиноградной и уксусной кислот. Формирование штаммом 3-ГМК, наблюдаемое в отсутствие индукции экспрессии гена *fadB*, могло объясняться определенной “протечкой” промотора P<sub>trc-ideal-4</sub> [14], тогда как мало зависящий от индукции синтез 3-ГМК уровень секреции пировиноградной и уксусной кислот мог являться следствием ряда причин. В первую очередь, к повышенной секреции данных предшественников в синтезе 3-ГМК мог приводить недостаток в штамме внутриклеточного НАДН. Однако, накопление штаммом заметных количеств сукцината и малата указывало на то, что условия культивирования штамма были достаточно “безкислородными” для формирования соответствующих дикарбоксилатов в результате функционирования восстановительной ветви цикла трикарбоновых кислот, обычно активной в условиях анаэробно-продукции. Повышенный уровень синтеза штаммом ацетата, при относительно невысоком формировании 3-ГМК, мог быть следствием как недостаточной активности сверхэкспрессированных в штамме ферментов БОЖК, так и результатом активности неспецифичных тиоэстераз, отличных от направленно сверхэкспрессированной тиоэстеразы II (*TesB*). Действительно, клетки *E. coli* природно обладают как минимум восемью тиоэстеразами, способными гидролизовать тиоэфирную связь КоА-производных с образованием соответствующих карбоксилатов. Среди них тиоэстеразы YciA, YbgC и YdiI демонстрируют довольно широкую субстратную специфичность в отношении ацил-производных кофермента А [10, 22, 23]. При этом YciA проявляет максимальную активность в отношении ацетил-КоА [10].

Для оценки эффективности потенциальных подходов к улучшению синтеза 3-ГМК в штамме VOX3.1 Δ4 P<sub>L</sub>-*atoB* P<sub>L</sub>-*tesB* был первично инактивирован ген *yciA*. В результате данной модификации выход 3-ГМК и уровень синтеза соответствующего соединения производным штаммом VOX3.1 Δ4 P<sub>L</sub>-*atoB* P<sub>L</sub>-*tesB* Δ*yciA* возросли практи-

**Таблица 3.** Концентрации и молярные выходы метаболитов секретируемых сконструированными штаммами при микроаэробной утилизации глюкозы\*

Штамм	ИПТГ	Пируват		Ацетат		Малат		Сукцинат		3-ГМК	
		ММ	МОЛЬ/МОЛЬ	ММ	МОЛЬ/МОЛЬ	ММ	МОЛЬ/МОЛЬ	ММ	МОЛЬ/МОЛЬ	ММ	МОЛЬ/МОЛЬ
ВОХ3.1 Δ4 P <sub>L</sub> - <i>atoB</i> P <sub>L</sub> - <i>tesB</i>	–	23.2 ± 1.6	0.57	19.2 ± 1.2	0.47	0.9 ± 0.1	0.02	1.1 ± 0.1	0.03	2.9 ± 0.2	0.07
	+	20.6 ± 1.3	0.49	20.4 ± 1.3	0.49	0.9 ± 0.1	0.02	0.9 ± 0.1	0.02	4.9 ± 0.3	0.12
ВОХ3.1 Δ4 P <sub>L</sub> - <i>atoB</i> P <sub>L</sub> - <i>tesB</i> Δ <i>yciA</i>	–	24.4 ± 1.7	0.60	16.0 ± 1.0	0.39	1.0 ± 0.1	0.02	1.0 ± 0.1	0.02	3.5 ± 0.2	0.09
	+	21.6 ± 1.5	0.51	16.8 ± 1.2	0.40	0.9 ± 0.1	0.02	0.9 ± 0.1	0.02	6.1 ± 0.4	0.15
MGΔ4 P <sub>L</sub> - <i>tesB</i> (pMW118m- <i>atoB-fadB</i> )	–	6.7 ± 0.4	0.16	18.7 ± 1.3	0.44	1.0 ± 0.1	0.02	1.3 ± 0.1	0.03	13.9 ± 0.8	0.32
	+	4.6 ± 0.3	0.11	17.6 ± 1.1	0.41	0.8 ± 0.1	0.02	1.4 ± 0.2	0.03	14.9 ± 0.9	0.35
MGΔ4 P <sub>L</sub> - <i>tesB</i> Δ <i>yciA</i> (pMW118m- <i>atoB-fadB</i> )	–	8.5 ± 0.6	0.19	13.6 ± 0.9	0.31	1.0 ± 0.1	0.02	1.3 ± 0.1	0.03	15.6 ± 1.0	0.36
	+	6.5 ± 0.5	0.15	12.1 ± 0.7	0.27	0.9 ± 0.1	0.02	1.2 ± 0.1	0.03	17.0 ± 1.2	0.38
MGΔ4 P <sub>L</sub> - <i>tesB</i> Δ <i>yciA</i> Δ <i>ydiI</i> (pMW118m- <i>atoB-fadB</i> )	–	8.1 ± 0.6	0.18	14.2 ± 1.0	0.32	0.9 ± 0.1	0.02	1.3 ± 0.1	0.03	15.3 ± 0.9	0.35
	+	6.3 ± 0.4	0.15	12.4 ± 0.8	0.28	1.0 ± 0.1	0.02	1.0 ± 0.1	0.02	16.9 ± 1.1	0.38

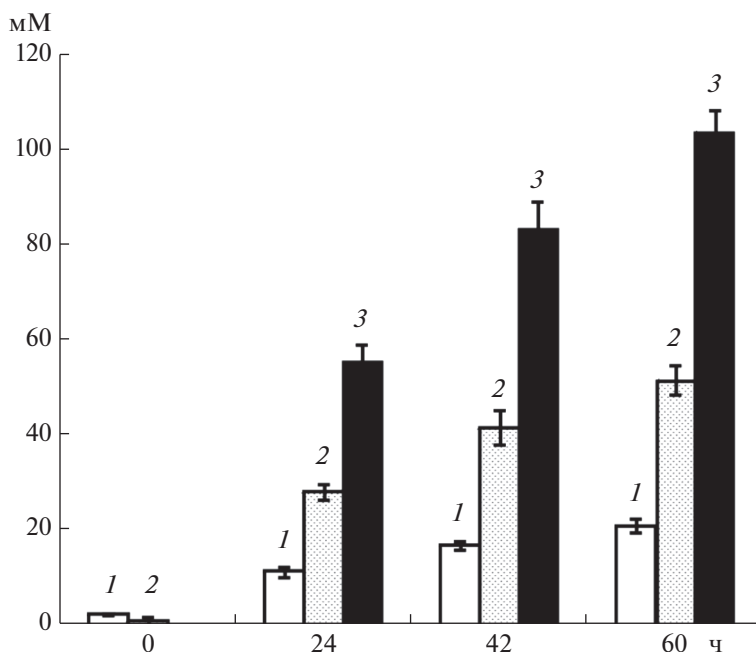
\* Приведены стандартные отклонения для трех независимых экспериментов.

чески на 20%, тогда как выход и уровень синтеза ацетата снизились на то же значение (табл. 3). Тем не менее, уровень секреции штаммом пирувата был неизменным, а ацетат оставался основным продуктом секретируемым штаммом в ходе утилизации глюкозы. Данный факт свидетельствовал о том, что, по-видимому, именно внутриклеточный уровень белков катализирующих реакции БОЖК лимитировал продукцию 3-ГМК сконструированным штаммом. Несмотря на то, что промотор P<sub>L</sub> фага лямбда, контролирующей в штамме экспрессию гена ацетил-КоА С-ацетил-трансферазы *atoB*, является одним из “сильнейших” для *E. coli*, а промотор P<sub>trc-ideal-4</sub>, расположенный перед геном 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназы (*fadB*) мало уступает ему по “силе” [14], хромосомная экспрессия единичных копий соответствующих генов не могла, очевидно, обеспечить в штамме форсированного протекания реакций обращенного БОЖК, способствующего повышению синтезу целевого соединения.

Для проверки правомочности данной гипотезы гены *atoB* и *fadB* были клонированы в составе экспрессионного вектора pMW118m-*atoB-fadB*, под контролем промотора P<sub>trc-ideal-2</sub>, и первоначально экспрессированы в специально сконструированном штамме MGΔ4 P<sub>L</sub>-*tesB*. За исключением уровня экспрессии соответствующих генов, кодирующих ферменты БОЖК, полученный штамм MGΔ4 P<sub>L</sub>-*tesB* (pMW118m-*atoB-fadB*) был практически изогенен штамму ВОХ3.1 Δ4 P<sub>L</sub>-*atoB*

P<sub>L</sub>-*tesB*. Отличия заключались в отсутствии в штамме MGΔ4 мутации *lacI<sup>Q</sup>* и в наличии интактного гена *fadE*. Однако, в отсутствие в среде жирных кислот экспрессия генов *fad*-регулона, в том числе *fadE*, репрессируется в *E. coli* транскрипционным регулятором FadR и активность соответствующих ферментов в клетке отсутствует [24]. Также, наблюдаемая в LacI<sup>Q</sup> штамме ВОХ3.1 Δ4 P<sub>L</sub>-*atoB* P<sub>L</sub>-*tesB* “протечка” промотора P<sub>trc-ideal-4</sub> не позволяла ожидать строгой репрессии, за счет данного свойства штамма, аналогичного по характеристикам промотора P<sub>trc-ideal-2</sub> [14] при его расположении в составе плазмиды.

Действительно, в ходе микроаэробной утилизации глюкозы штамм MGΔ4 P<sub>L</sub>-*tesB* (pMW118m-*atoB-fadB*) секретирует сходные количества метаболитов вне зависимости от присутствия в среде ИПТГ (табл. 3). Вместе с тем, количество синтезированной штаммом MGΔ4 P<sub>L</sub>-*tesB* (pMW118m-*atoB-fadB*) 3-ГМК и выход этого соединения возросли практически в 3 раза, до 14.9 мМ и 0.35 моль/моль, по сравнению с соответствующими показателями, 4.9 мМ и 0.12 моль/моль, демонстрируемыми штаммом ВОХ3.1 Δ4 P<sub>L</sub>-*atoB* P<sub>L</sub>-*tesB* при индукции. Рост синтеза штаммом 3-ГМК произошел, в первую очередь, за счет резкого снижения секреции пирувата, тогда как уровень образования ацетата снизился незначительно. Таким образом, повышение формирования 3-ГМК штаммом MGΔ4 P<sub>L</sub>-*tesB* (pMW118m-*atoB-fadB*) являлось результатом интенсификации потока уг-



**Рис. 1.** Концентрации метаболитов (мМ): пирувата (1), ацетата (2) и 3-ГМК (3), секретированных штаммом MGD4  $P_L$ -*tesB* *DuciA* (pMW118m-*atoB-fadB*) при микроаэробной утилизации глюкозы в биореакторе в присутствии ИПТГ.

лерода через ацетил-КоА и вовлекающие его последующие реакции обращенного БОЖК. Это было следствием увеличенного синтеза в клетке белков AtoB и FadB, достигнутого при плазмидной экспрессии соответствующих генов. Тем не менее, выход 3-ГМК синтезированной штаммом MGD4  $P_L$ -*tesB* (pMW118m-*atoB-fadB*) был далек от теоретического максимума, 1 моль/моль, а секреция ацетата оставалась значительной.

Делеция гена, кодирующего основную неспецифичную тиоэстеразу YciA, не привела, однако, к выраженному падению секреции ацетата соответствующим производным штаммом MGD4  $P_L$ -*tesB* *DuciA* (pMW118m-*atoB-fadB*) (табл. 3). Можно предположить, что за гидролиз тиоэфирной связи ацетил-КоА с образованием ацетата в штамме MGD4  $P_L$ -*tesB* *DuciA* (pMW118m-*atoB-fadB*) были ответственны другие неспецифичные тиоэстеразы. В качестве такой тиоэстеразы, в первую очередь, могла быть рассмотрена YdiI, обладающая заметно меньшей активностью по отношению к ацетил-КоА, нежели YciA (0.222 мкг/мг/мин), составляющей 0.036 мкг/мг/мин, но сравнимой с таковой для гиперэкспрессированной в штамме TesB (0.030 мкг/мг/мин) [10]. В дальнейшем ген *ydiI* был инактивирован в штамме MGD4  $P_L$ -*tesB* *DuciA* (pMW118m-*atoB-fadB*). При микроаэробной утилизации глюкозы полученный штамм MGD4  $P_L$ -*tesB* *DuciA* *YdiI* (pMW118m-*atoB-fadB*) синтезировал, вне зависимости от присутствия в среде ИПТГ, количества 3-ГМК и ацетата аналогичные таковым родительского штамма MGD4  $P_L$ -*tesB*

*DuciA* (pMW118m-*atoB-fadB*) (табл. 3). Таким образом, секреция ацетата штаммом MGD4  $P_L$ -*tesB* *DuciA* *YdiI* (pMW118m-*atoB-fadB*) была обусловлена, по-видимому, побочной активностью гиперэкспрессированной тиоэстеразы II.

Известно, что анаэробная утилизация жирных кислот клетками *E. coli* по БОЖК невозможна без наличия в среде внешнего акцептора электронов [25]. Таким образом, несмотря на отсутствие прямых свидетельств, можно было предположить, что активность ферментов БОЖК, нуждающихся в участии кофакторов НАДН/НАД<sup>+</sup>, может, в той или иной степени, подавляться высоким внутриклеточным пулом НАДН. Поддержание оптимального внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса по этой причине, очевидно, является ключевым условием эффективного синтеза целевых продуктов по обращенному БОЖК. При микроаэробном культивировании в колбах, насыщение среды кислородом не может поддерживаться на постоянном уровне и, как отмечалось выше, достигаемые в итоге условия инкубации штаммов были анаэробными. Ранее было показано, что оптимальные условия для биосинтеза 3-ГМК из глюкозы штаммом VOX3.1  $\Delta 4$   $P_L$ -*atoB*  $P_L$ -*tesB* достигались при проведении продуктивной фазы в биореакторе с поддержкой постоянного насыщения среды низким уровнем кислорода [13], поэтому биосинтетические характеристики штамма MGD4  $P_L$ -*tesB* *DuciA* (pMW118m-*atoB-fadB*) оценивали при реализации процессов роста

и биосинтеза 3-ГМК в ферментере, как описано в разделе Методика.

В биореакторе штамм MGD4 P<sub>L</sub>-*tesB* Δ*yciA* (pMW118m-*atoB-fadB*) к концу инкубации синтезировал из глюкозы ~104 мМ 3-ГМК с выходом, достигающим 0.75 моль/моль (рис. 1) и энантиомерным избытком (S)-стереоизомера >99.5%. Финальный уровень секреции штаммом ацетата составлял ~51.8 мМ при выходе ~0.38 моль/моль, на фоне относительно низкого накопления пирувата. В аналогичных условиях штамм BOX3.1 Δ4 P<sub>L</sub>-*atoB* P<sub>L</sub>-*tesB* синтезировал из глюкозы 3-ГМК с выходом 0.66 моль/моль при заметно большей, по сравнению со штаммом MGD4 P<sub>L</sub>-*tesB* Δ*yciA* (pMW118m-*atoB-fadB*), побочной продукции ацетата [13].

Таким образом, в результате реконструкции штамма-продуцента в сочетании с проведением процесса биосинтеза целевого вещества в условиях способствующих его эффективному формированию удалось оптимизировать продукцию 3-ГМК из глюкозы направленно сконструированными штаммами *E. coli*.

Вместе с тем, результаты исследования свидетельствовали о том, что биосинтетические характеристики полученного штамма-продуцента 3-ГМК могут быть в дальнейшем улучшены за счет обеспечения в клетке четкой координации активностей ключевых ферментов, ответственных за конверсию ацетил-КоА в целевой продукт. Такая координация может быть обеспечена в результате тонкой регуляции уровня экспрессии соответствующих генов. Кроме того, оптимизация условий культивирования штамма-продуцента, направленная на достижение в клетке выгодного окислительно-восстановительного баланса также может способствовать достижению повышенного уровня конверсии глюкозы в 3-ГМК.

Авторы выражают благодарность сотруднику НИЦ “Курчатовский институт”-ГосНИИгенетика Губайдуллину И.И. за помощь в клонировании генов *atoB* и *fadB*, а также конструировании экспрессионной плазмиды, несущий данные гены.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-08059).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blacklock T.J., Sohar P., Butcher J.W., Lamanec T., Grabowski E. J. J. // J. Org. Chem. 1993. V. 58. № 7. P. 1672–1679.
2. Chiba T., Nakai T. // Chem. Lett. 1985. V. 161. P. 651–654.
3. Mori K., Sugai T. // Synthesis. 1982. V. 9. P. 752–753.
4. Mori K., Takikawa H. // Tetrahedron. 1990. V. 46. P. 4473–4486.
5. Spengler J., Albericio F. // Curr. Org. Synth. 2008. V. 5. № 2. P. 151–161.
6. Liu Q., Ouyang S.P., Chung A., Wu Q., Chen G.Q. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 76. № 4. P. 811–818.
7. Tseng H.C., Martin C.H., Nielsen D.R., Prather K.L. // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. № 10. P. 3137–3145.
8. Lee S.H., Park S.J., Lee S.Y., Hong S.H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 79. № 4. P. 633–641.
9. Dellomonaco C., Clomburg J.M., Miller E.N., Gonzalez R. // Nature. 2011. V. 476. № 7360. P. 355–359.
10. Clomburg J.M., Vick J.E., Blankschien M.D., Rodríguez-Moyá M., Gonzalez R. // ACS Synth. Biol. 2012. V. 1. P. 541–554.
11. Gulevich A.Y., Skorokhodova A.Y., Sukhozhenko A.V., Shakulov R.S., Debabov V.G. // Biotechnol. Lett. 2012. V. 34. № 3. P. 463–469.
12. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Стасенко А.А., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 1. С. 21–29.
13. Gulevich A.Y., Skorokhodova A.Y., Sukhozhenko A.V., Debabov V.G. // J. Biotechnol. 2017. V. 244. P. 16–24.
14. Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.А., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Биотехнология. 2006. № 3. С. 6–16.
15. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Моржакова А.А., Антонова С.В., Сухоженко А.В., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 4. С. 383–388.
16. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. // Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Ed., N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.
17. Datsenko K.A., Wanner B.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.
18. Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.И., Дорошенко В.Г., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Молекулярная биология. 2005. Т. 39. № 5. С. 823–831.
19. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Ермишев В.Ю., Крылов А.А., Минаева Н.И., Полонская З.М., Зименков Д.В., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Молекулярная биология. 2009. Т. 43. № 3. С. 547–557.
20. Fischer C.R., Tseng H.C., Tai M., Prather K.L., Stephanopoulos G. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 88. № 1. P. 265–275.
21. Koebmann, B.J., Westerhoff H.V., Snoep, J.L., Nilsson, D., Jensen, P.R. // J. Bacteriol. 2002. V. 184. № 14. P. 3909–3916.
22. Zhuang Z., Song F., Zhao H., Li L., Cao J., Eisenstein E., Herzberg O., Dunaway-Mariano D. // Biochemistry. 2008. V. 47. № 9. P. 2789–2796.
23. Chen M., Ma X., Chen X., Jiang M., Song H., Guo Z. // J. Bacteriol. 2013. V. 195. № 12. P. 2768–2775.
24. Fujita Y., Matsuoka H., Hirooka K. // Mol. Microbiol. 2007. V. 66. № 4. P. 829–839.
25. Campbell J.W., Morgan-Kiss R.M., Cronan J.E. // Mol. Microbiol. 2003. V. 47. № 3. P. 793–805.

## Optimization of Biosynthesis of (*S*)-3-Hydroxybutyric Acid from Glucose Through Inverted Fatty acid $\beta$ -Oxidation Pathway by Recombinant *Escherichia coli* Strains

A. Yu. Gulevich<sup>a, \*</sup>, A. Yu. Skorokhodova<sup>a</sup>, and V. G. Debabov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

\*e-mail: andrey.gulevich@gmail.com.ru

Microaerobic synthesis of 3-hydroxybutyric acid by *Escherichia coli* strain BOX3.1  $\Delta 4$  P<sub>L</sub>-*atoB* P<sub>L</sub>-*tesB* (MG1655 *lacI*<sup>0</sup>,  $\Delta$ *ackA-pta*,  $\Delta$ *poxB*,  $\Delta$ *ldhA*,  $\Delta$ *adhE*,  $\Delta$ *fadE*, P<sub>L</sub>-SD<sub>*phi10-atoB*</sub>, P<sub>*irc-ideal-4*</sub>-SD<sub>*phi10-fadB*</sub>, P<sub>L</sub>-SD<sub>*phi10-tesB*</sub>) previously directly engineered for biosynthesis of target compound from glucose through the inverted fatty acid  $\beta$ -oxidation pathway was studied. The yield of the target product of 0.12 mol/mol was achieved. Inactivation in the strain of the gene encoding nonspecific thioesterase YciA led to the elevation of yield of 3-hydroxybutyric acid up to 0.15 mol/mol. For the optimization of biosynthesis of target product the strain MG $\Delta 4$  P<sub>L</sub>-*tesB* (MG1655  $\Delta$ *ackA-pta*,  $\Delta$ *poxB*,  $\Delta$ *ldhA*,  $\Delta$ *adhE*, P<sub>L</sub>-SD<sub>*phi10-tesB*</sub>) was engineered, and the genes encoding key enzymes of fatty acid  $\beta$ -oxidation were overexpressed in the strain from the plasmid pMW118m-*atoB-fadB*. The level of microaerobic synthesis of 3-hydroxybutyric acid by the strain MG $\Delta 4$  P<sub>L</sub>-*tesB* (pMW118m-*atoB-fadB*) achieved in primary evaluation conditions reached 0.35 mol/mol. Inactivation in the strain of the gene of nonspecific thioesterase YciA led to only minor decrease in acetate byproduct. Further inactivation in the strain of gene encoding nonspecific thioesterase YdiI had virtually no effect on the level of synthesis of side products. Cultivation of the constructed strain MG $\Delta 4$  P<sub>L</sub>-*tesB*  $\Delta$ *yciA* (pMW118m-*atoB-fadB*) in bioreactor under the controlled conditions ensured achievement of yield of 3-hydroxybutyric acid amounting to 0.75 mol/mol.

**Keywords:** 3-hydroxybutyric acid, fatty acid  $\beta$ -oxidation, metabolic engineering, *Escherichia coli*

УДК 579.873.21.083.182:574.22

## ИММУНОДОМИНАНТНЫЕ БЕЛКИ ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ *Mycobacterium tuberculosis*

© 2021 г. К. А. Трутнева<sup>1</sup>, В. Г. Авдиенко<sup>2</sup>, Г. Р. Дёмина<sup>1</sup>, М. О. Шлеева<sup>1</sup>,  
М. С. Шумков<sup>1</sup>, Е. Г. Салина<sup>1</sup>, А. С. Капрельянец<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр  
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение  
“Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза”, Москва, 107564 Россия

\*e-mail: arseny@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 26.08.2020 г.

После доработки 20.10.2020 г.

Принята к публикации 02.11.2020 г.

Для выявления иммунодоминантных белков, экспрессируемых клетками *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) в условиях, приближенных к персистенции возбудителя туберкулеза в организме хозяина, изучали белковый профиль покоящихся клеток *Mtb in vitro*, образующихся в результате постепенного закисления среды выращивания и длительного хранения. Согласно 2D электрофорезу в таких клетках сохранялось большое разнообразие белков, хотя состав белков в протеомных профилях активно растущих и покоящихся клеток существенно отличался. Методом иммуноблоттинга с использованием пулированных сывороток крови больных туберкулезом в покоящихся клетках выявлено 10 белков, способных связываться с иммуноглобулинами. Два белка (Rv2018 и Rv0341) являются новыми иммуногенными, ранее не описанными в литературе. Из найденных иммуногенных белков были отобраны четыре (Rv0341, Rv2018, Rv1509, Rv2986) с наибольшей структурной специфичностью для *Mtb* за счет содержания уникальных протяженных доменов. Гены, кодирующие данные белки были клонированы в клетках *E. coli* для получения рекомбинантных белков на основе рЕТ-вектора. Рекомбинантные белки распознавались антителами в индивидуальных сыворотках больных туберкулезом. От 5 до 45% больных (для разных антигенов) имели концентрации иммуноглобулинов, превышающие средние значения у здоровых доноров. Максимальное превышение демонстрировал белок Rv2986. Таким образом, изучение фенотипически измененных (покоящихся) клеток *Mtb* позволило обнаружить специфический набор иммунодоминантных белков, которые могут в дальнейшем быть использованы для выбора и конструирования полипептидов пригодных для серодиагностики активного/латентного туберкулеза.

**Ключевые слова:** *M. tuberculosis*, покоящиеся формы, протеом, иммуноферментный анализ, серодиагностика

**DOI:** 10.31857/S0555109921020173

Туберкулез (ТБ) остается опасным заболеванием, вызывающим 1.5 млн случаев смерти и около 10 млн новых случаев в год (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>). Хотя ситуация с туберкулезом в России в последние годы стабилизируется, Российская Федерация по-прежнему находится в списке стран, где отмечена эпидемия туберкулеза. В 2019 г. Россия вошла в двадцатку стран с наиболее негативной ситуацией в отношении распространения туберкулеза. (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>). Ситуация осложняется высоким и растущим уровнем обнаружения штаммов, устойчивых к антибиотикам первой линии (до 29% в 2018 г.) [1]. Дополнительной проблемой в эпиде-

миологии туберкулеза является очень большое количество людей, имеющих латентную форму туберкулеза, до 1/4 населения Земли, по данным ВОЗ. Некоторые эпидемиологи считают, что около 80% населения России латентно инфицировано *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), в то время как выявление таких форм затруднено, поскольку в этом случае туберкулез связан с неактивными (покоящимися) и “некультивируемыми” бактериями, которые нуждаются в специальной процедуре для их реактивации.

Несмотря на значительный прогресс в понимании механизмов, лежащих в основе латентного туберкулеза, многие аспекты длительной персистенции возбудителя в организме хозяина остаются

ся не разгаданными. Очевидно, что в этом процессе значительная роль отводится взаимодействию возбудителя и хозяина, в частности взаимодействию с его иммунной системой [2]. В этой связи особый интерес имеет установление набора иммуногенных белков покоящихся форм (ПФ) *Mtb*, которые по биохимическому составу значительно отличаются от активно размножающихся бактерий [3, 4].

С другой стороны, выявление пула иммунодоминантных белков ПФ *Mtb* может представлять интерес для выбора антигенов для серодиагностики ТБ. Необходимо отметить, что такой выбор, как правило, основан на знаниях о продукции белков *Mtb* во время активного роста, что на самом деле далеко от реальной ситуации пребывания *Mtb* в организме хозяина. Очевидно, для успешной серодиагностики необходимы знания о репертуаре антигенов *Mtb*, экспрессируемых *in vivo* в условиях воздействия стресса на патоген, например, факторов иммунной системы организма. В этом контексте покоящиеся формы *Mtb*, образующиеся в условиях стрессорных воздействий на клетки бактерий *in vitro*, могут представлять уникальную модель состояния возбудителя для изучения антигенного репертуара, близкого к ситуации *in vivo*. Это диктует необходимость проведения фундаментальных исследований в области “стрессорной” протеомики микобактерий.

Цель работы – выявление иммунодоминантных белков *Mtb*, экспрессируемых в экспериментальной модели стрессированных клеток *in vitro* методами протеомики и иммунологии.

## МЕТОДИКА

**Образование покоящихся форм *M. tuberculosis*.** В работе был использован штамм *Mtb* дикого типа H37Rv (получен из ЦНИИ туберкулеза), который первоначально выращивали на стандартной среде Сотона (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1.4; L-аспарагин – 4.0; цитрат аммония трехвалентного железа – 0.05; цитрата натрия – 2.0; 1%-ный  $\text{ZnSO}_4$  – 0.1 мл, глицерин – 60 мл; pH 7.0 (доводили 1 М NaOH) и добавляли АДС (бычий сывороточный альбумин, глюкоза и NaCl) и Твин-80 – 0.05% [5].

Покоящиеся “некультивируемые” микобактерии, утратившие способность расти на плотных средах (“некультивируемость”, НК) вследствие постепенного подкисления среды в течение стационарной фазы роста, были получены, как описано ранее [3]. Бактерии выращивали в течение 12–15 сут в 50 мл среды Сотона с добавлением 0.05% Твин-80 и АДС в колбах объемом 100 мл на орбитальном шейкере (200 об./мин). Эти бактериальные культуры использовали для посева в модифицированную среду Сотона с целью получения НК *Mtb*. Модификация среды Сотона за-

ключалась в замене Твин-80 на 0.025%-ный тилоксапол и АДС на 0.5%-ный бычий альбумин Cohn-Analog (“Sigma”, США). В отличие от стандартной среды Сотона (с pH 7.0) начальные значения pH в модифицированных средах составляли 6.2. 200 мл модифицированной среды Сотона помещали в колбу объемом 500 мл (3–5 колб на один эксперимент) и инкубировали при 37°C в течение 40–60 сут при перемешивании. Величину pH среды измеряли периодически и, когда значение pH, пройдя через максимум (pH 7.7), вновь достигало 6.0–6.2 в стационарной фазе, культуры переносили в закрытые пластиковые 50-миллилитровые пробирки и добавляли 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (МЭС) для получения конечной концентрации 20 мМ и предотвращения дальнейшего подкисления при длительном хранении. Инкубацию продолжали в статических условиях при комнатной температуре в темноте в течение 1 г. после засева.

**2D электрофорез.** Активные и покоящиеся клетки, полученные в четырех биологических повторах эксперимента, описанного выше, объединяли. Количество клеток составляло приблизительно 3.5 г влажной массы. Бактериальную культуру центрифугировали при 7000 об./мин в течение 15 мин и 10 раз промывали буфером, содержащим (г/л): NaCl – 8, KCl – 0.2 и  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 0.24 (pH 7.4). Осадок клеток ресуспендировали на льду в 100 мМ буфере HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота) pH 8.0, содержащем коктейль ингибиторов протеаз (“Sigma”, США) и фенолметансульфонилфторид (PMSF), а затем разрушали клетки с использованием шариков циркония на гомогенизаторе FastPrep-24 (MP Biomedicals, США) в течение 1 мин 5 раз для активных клеток и 10 раз для покоящихся клеток. Лизат центрифугировали при 13000 g в течение 15 мин при 4°C. Супернатант разделяли на мембранную (осадок) и цитозольную фракции (супернатант) с использованием ультрацентрифугирования при 100000 g в течение 2 ч по принципу седиментации.

Мембранную фракцию трижды промывали буфером HEPES с использованием ультрацентрифугирования, выделяли экстракцией с использованием детергента додецилсульфата натрия (2%-ного ДДС-Na).

Цитозольную фракцию и мембранный экстракт осаждали с использованием набора для очистки ReadyPrep 2-D (“BioRad”, США) для селективного осаждения и удаления из образцов белка загрязнений, таких как детергенты, липиды и фенольные соединения. Такое осаждение позволяет ресуспендировать осадок белка в буфере для изоэлектрофокусирования, содержащем 8 М мочевины, 2 М тиомочевину, 10 мМ 1,4-дителиотреитол (ДТТ), 2 мМ трис (2-карбоксиил)фосфин-гидро-



хлорид (ТСЕР), 1% (вес./об. CHAPS, 1% (вес./об.) Тритон X-100, 1% (вес./об. амидосульфобетаин-14 (АСБ) и 0.4% (об./об. амфолитов (pH 3–10).

Изоэлектрическое фокусирование проводили в 5%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) (30%, акриламид/бисакриламид, 8 М мочевины, 2% амфолитов, pH 3–10 и 4–6 (1 : 4), 1% CHAPS, 1% Тритон X-100, 0.4% АСБ) с использованием стеклянных трубочек с внутренним диаметром 2.4 мм в камере для изоэлектрофокусирования (модель Tube Cell 175, “BioRad”, США) до достижения 3700 В/ч вольт-часов.

Для анализа использовали 100 мкг белка каждого образца. После фокусировки гели извлекали из стеклянных трубок и фиксировали в буфере 1 (0.375 М Трис-НСl, pH 6.8, 2 М мочевины, 20%-ный (об./об.) глицерин, 2% ДДС, 2%-ный ДДТ) и буфере 2 (0.375 М Трис-НСl, pH 6.8, 2 М мочевины, 20%-ный глицерин, 2% ДДС и 0.01%-ный бромфеноловый синий) по 15 мин в каждом. Второе направление проводили как описано в работе О’Фарелл [6], на больших пластинах (20 × 20 см), в 12%-ных гелях ПААГ с ДДС-На толщиной 1.5 мм в стандартном трис-глициновом буфере в ячейке PROTEAN II xi для вертикального электрофореза (“BioRad”, США). Гели окрашивали Coomassie CBGG-250 (Roti-Blue “Carl Roth”, Германия) с последующим окрашиванием серебром (<https://www.alphalyse.com/wp-content/uploads/2015/09/Silver-stained-protocol.pdf>).

Фотографии гелей получали с использованием Syngene G: BOX Gel & Blot Imaging Systems (“Syngene”, Великобритания). Изображения гелей, окрашенные Coomassie, анализировали с использованием программного обеспечения TotalLab TL120 для расчета плотности пятна.

Каждое видимое пятно белка, соответствующее пятну на иммуноблоте вырезали вручную из геля и анализировали как отдельный образец с использованием анализа MALDI-TOF. Данные MS/MS, полученные после проведения MALDI-TOF, были использованы для поиска в базе данных Mascot Protein (MSDB) для определения белков. Функции белка были взяты из базы данных Tuberculist. Каждый образец для 2D анализа был проверен дважды.

**Анализ белков методом MALDI-TOF.** Триптический гидролиз белка в ПААГ, окрашенном Coomassie Brilliant Blue, проводили следующим образом. Кусочек геля размером 3–4 мм<sup>3</sup> дважды промывали для удаления красителя в 100 мкл 40%-ного раствора ацетонитрила в 0.1 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> в течение 20 мин при 37°C.

Гидролиз белка в ПААГ, окрашенного серебром, проводили следующим образом. Кусочек геля размером 3–4 мм<sup>3</sup> дважды промывали для удаления красителя в 100 мкл смеси 30 мМ K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> и

100 мМ Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (1 : 1) в течение 15 мин. Удалив жидкую фазу, 3 раза отмывали деионизированной водой в течение 10 мин. После удаления красителя гель промывали 40% раствором ацетонитрила в 0.1 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> в течение 20 мин.

После удаления отмывочных растворов для дегидратации геля добавляли 100 мкл ацетонитрила. Удалив ацетонитрил и высушив кусочек геля, добавляли 3.5 мкл раствора модифицированного трипсина (“Promega”, США) в 0.05 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> с концентрацией 15 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 5 ч при 37°C, затем к раствору добавляли 5.25 мкл 0.5%-ного ТФУ в 50%-ном растворе водного ацетонитрила и тщательно перемешивали. Раствор над гелем использовали для получения MALDI-масс-спектров.

Подготовка образцов для масс-спектрометрии проводилась следующим образом: на мишени смешивали по 1.5 мкл раствора образца и 0.5 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (10 мг/мл в 20%-ном водном ацетонитриле, 0.5% ТФУ), полученную смесь высушивали на воздухе.

Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflextreme (“Bruker”, Германия), оснащенном УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. Точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.007% (70 ppm). Спектры получали в диапазоне масс 500–6500 *m/z*, выбирая мощность лазера оптимальную для достижения наилучшего разрешения. Для получения спектров фрагментации использовали тандемный режим прибора, точность измерения фрагментных ионов была не менее 2 Да.

Идентификацию белков осуществляли при помощи сервиса NCBI Blast. По предполагаемым аминокислотным последовательностям спектров фрагментации отдельных пептидов были подобраны кандидаты среди белков других организмов. Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 (“Bruker Daltonics”, Германия).

**Иммуноблоттинг.** Иммуноблоттинг проводили после переноса белков с геля на ПВДФ-мембрану в камере Protean (Bio-Rad, США). Реакцию первичных антител проводили в растворе, содержащем антитела больных или здоровых людей, разведенных в соотношении 1 : 300, 5%-ный бычий сывороточный альбумин, 0.1 М NaCl в течение 1 ч. Затем мембраны отмывали тем же раствором, не содержащим антител 3 раза по 10 мин. Гибридизацию вторичными антителами проводили с использованием иммунопероксидазного конъюгата козьих античеловеческих антител (“Sigma-Aldrich”, США), разведенных в соотношении 1 : 20000. После отмывки от вторичных антител ви-

зуализацию пятен проводили с помощью BCIP (5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат) и NBT (нитро-синий тетразолий хлорид) (“Sigma-Aldrich”, США) согласно рекомендациям производителя.

**Получение рекомбинантных белков.** Клонирование генов, кодирующих белки Rv0341, Rv2018, Rv1509, Rv2986, Rv0432, Rv3676 осуществляли по геномной ДНК штамма *M. tuberculosis* H37Rv с использованием праймеров F 5'-GGCACGcatatgACCTCGCTTATCG-3' (строчными буквами выделен сайт узнавания рестриктазы NdeI) и R 5'-GCGTAggatccAGATCACGGTATGC-3' (выделен сайт BamHI) для гена Rv0341, F 5'-GTGAATcatatgGCTGGCGACC-3' (выделен сайт NdeI) и R 5'-GctcgagGATTCCGATCAGGCT-3' (выделен сайт XhoI) для гена Rv2018, F 5'-catatgGTGTTTGC-GTTGAGTAATAATCTG-3' (выделен сайт NdeI) и R 5'-ggatccTTACCTCTTCGTTAGCCGCAC-3' (выделен сайт BamHI) для гена Rv1509, F 5'-ATCcatatgATGAACAAAGCAGAGCTCATT-3' (выделен сайт NdeI) и R 5'-CATggatccСТАТТТGCGACCCCGC-CGAGC-3' (выделен сайт BamHI) для гена Rv2986, F 5'-ATCggatccATGCCAAAGCCCGCCGATCAC-3' (выделен сайт BamHI) и R 5'-CATTaagcttGC-CGGAACCAATGACACCGCA-3' (выделен сайт HindIII) для гена Rv0432, F 5'-ATCgaattcGTG-GACGAGATCCTGGCCAGG-3' (выделен сайт EcoRI) и R 5'-CATTaagcttCCTCGCTCGGCGGG-CCAGTCT-3' (выделен сайт HindIII) для гена Rv3676.

Полученные ПЦР-продукты генов Rv0341 и Rv1509 были лигированы в промежуточный вектор pGEM-T easy (“Promega”, США), а затем перенесены в конечную плазмиду pET19b. Клонирование кодирующей части генов Rv2018 и Rv2986 осуществляли непосредственно в вектор pET19b, без промежуточных этапов. Клонирование генов Rv0432, Rv3676 осуществляли в вектор pET23a. Конструкции трансформировали в экспрессионный штамм *E. coli* BL21DE3. Активация экспрессии рекомбинантных белков с полученных плазмид обеспечивала синтез белка с полигистидиновым тагом (10 His), расположенным на N-конце полипептида (вектор pET19b) и с полигистидиновым тагом (6 His), расположенным на C-конце полипептида (вектор pET23a). Как промежуточные, так и итоговые генетические конструкции были проверены методами ПЦР и секвенирования.

Для каждого белка были оптимизированы условия выделения и очистки с использованием металлохелатной хроматографии в денатурирующих условиях. Для получения белка отдельную колонию засеивали в 50 мл МПБ с 100 мкг/мл ампициллина. Культуру инкубировали в течение ночи при перемешивании (220 об./мин) и 37°C. Затем 200 мл среды МПБ (2–4 колбы по 200 мл среды), содержащей 100 мкг/мл ампициллина, инокулировали 1% ночной культуры, индуктор

экспрессии изопропил-β-D-тиогалактозид (ИПТГ, 1 мМ) вносили после достижения оптической плотности в культуре ОП<sub>600</sub> 0.5–0.6. Последующую инкубацию проводили с перемешиванием при температуре 37°C или при комнатной температуре (холодовая индукция) в течение 4–5 ч. При низком уровне экспрессии белка индукцию проводили в течение ночи. Клетки собирали центрифугированием 4000 g в течение 15 мин, ресуспендировали в 5 мл буфера, содержащего 5 мМ имидазол, 0.5 М NaCl, 20 мМ Трис-HCl, pH 8.0 (буфер 1x ВВ), в присутствии 8 М мочевины. Клеточную биомассу хранили при –20°C в течение 2–4 нед.

К размороженной клеточной биомассе добавляли ДНКазу (5 ед.) и РНКазу (5 мкг) в присутствии Mg<sup>2+</sup> (5 мМ) и 1x ВВ, pH 8.0 (к рекомбинантному белку Rv1509 добавляли 1x ВВ, pH 9.0). После разрушения клеточной биомассы на ультразвуковом дезинтеграторе (3–5 раз по 1 мин) дважды проводили центрифугирование 10000 g в течение 30 мин при 4°C. Надосадочную жидкость наносили на колонку с Ni<sup>2+</sup>-NTA-сефарозой 6В, уравновешенную 1x ВВ. После нанесения образца колонку промывали 10 объемами 1x ВВ.

Белок получали в 2 стадии: 1 стадия – снижение концентрации мочевины с 8.0 М до 0 (градиент мочевины) в течение 40 мин; 2 стадия – элюция белка имидазолом 5–500 мМ (ступенчато) в течение 1ч 20 мин.

Диализ каждого рекомбинантного белка проводили с соответствующим буфером. Диализ белка Rv0341 проводили против буфера: 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 мМ NaCl, pH 8.0. Диализ белка Rv1509 проводили против буфера: 25 мМ Трис-HCl, 250 мМ NaCl, pH 9.0. Диализ белка Rv2018 проводили против буфера: 20 мМ Трис-HCl, 200 мМ NaCl, pH 8.0. Диализ белков Rv2986, Rv0432, Rv3676 проводили против буфера: 40 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl, pH 8.0. Диализ проводили дважды при температуре 4°C. Белки фильтровали через фильтр Millex-GV, Millipore 0.22 мкм (“Sartorius”, Германия) и хранили при 4°C.

Измерение концентрации белков проводили методом Флуорес [7] и/или на спектрофотометре (“BioDrop”, Германия) по соотношению поглощения при 280 и 260 нм, с учетом коэффициента молярной экстинкции.

Чистоту рекомбинантных белков оценивали методом электрофореза в 12%-ном ПААГ и иммуноблотом, со специфическими анти-His антителами и подтверждали методом МАЛДИ.

**Определение концентрации белков по Флуорес.** К 0.1 мл анализируемого раствора белка добавляли 0.9 мл раствора красителя (0.0075%-ный раствор бромфенолового синего, 15%-ный этанол и 2.5%-ная уксусная кислота). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при 610 нм.

Для построения калибровочной кривой использовали БСА. Каждую пробу анализировали в трех повторностях.

**Определение концентрации иммуноглобулинов в сыворотках крови методом ELISA.** Сорбцию препарата антигена осуществляли в лунках 96-луночного планшета “Costar, США” с высоким связыванием в течение ночи при 4°C из 100 мкл раствора с концентрацией 1.0 мкг/мл в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7.4, с 0.17 М NaCl (ФБС). Планшет четырехкратно отмывали фосфатным буфером, содержащим 0.05% Твин-20 (ФБСТ), после чего в лунки вносили по 100 мкл сывороток, разбавленных ФБСТ от 1 : 50, а также стандарты аффинновыделенных противотуберкулезных антител человека (от 0 до 1000 мкг/мл) и инкубировали 30 мин при 37°C. Затем планшет трехкратно отмывали, добавляя по 100 мкл раствора моноклональных антител против IgG человека в ФБСТ, меченных пероксидазой (1 : 1000), и инкубировали 30 мин при 37°C. После трехкратной отмывки планшета определяли иммуоферментную реакцию в каждой лунке. Для этого в лунки вносили по 100 мкл 50 мМ цитратно-ацетатного буфера, pH 5.2, с 0.035%-ным 3,3',5,5'-тетраметилбензидином, и 0.01%-ным H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, инкубировали 15 мин при комнатной температуре, останавливали реакцию 1.0 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и измеряли ОП при 450 нм. Концентрацию связавшихся иммуноглобулинов рассчитывали по калибровочной кривой со стандартами противотуберкулезных антител человека.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления иммунологически реактивных белков в клетках *Mtb* в состоянии, приближенно к ситуации *in vivo*, использовали покоящиеся клетки *Mtb*, образующиеся в результате длительного культивирования в условиях постепенного закисления среды при выращивании в пост-стационарной фазе [3]. Как известно, закисление среды является основным фактором, ограничивающим рост клеток возбудителя туберкулеза в макрофагах [8]. Из полученных таким образом клеток, а также из активно делящихся клеток *Mtb* были выделены белки цитозольной и мембранной фракции и получены белковые профили методом двумерного электрофореза (2D электрофореза) [4]. Несмотря на длительное хранение покоящихся клеток без деления протеом таких клеток сохранял большое количество белков, хотя и отличался по содержанию отдельных белков от протеома активных клеток. Стабильность белков, возможно связана с наличием значительного количества ферментов, участвующих в защите от окислительного стресса, а также шаперонов. Протеом покоящихся форм содержал ферменты, участвующие в специфических метаболических путях, потенциально обеспечивающих метабо-

лизм на низком уровне, или эти белки могут быть “запасены” для использования в процессе реактивации до начала процессов биосинтеза [4].

Для обнаружения иммунореактивных белков в стрессированных клетках *Mtb* был проведен иммуноблоттинг с переносом белков (активных и покоящихся микобактерий), полученных при проведении 2D электрофореза. В качестве первичных антител использовали выделенные иммуноглобулины из пулированной сыворотки больных туберкулезом. В результате инкубации со вторичными антителами получали окрашенные пятна. Соответствующие белковые пятна на исходном геле вырезали и идентифицировали с помощью MALDI-TOF-анализа. В результате было выявлено 9 белков в покоящихся клетках и 21 в активных клетках (табл. 1). Необходимо отметить, что у активных и покоящихся клеток эти белки различались за исключением трех белков Rv1475c, Rv3804c, Rv1886c.

Сравнение аминокислотных последовательностей иммунореактивных белков покоящихся *Mtb* с белками других бактерий с использованием программы BLAST позволило ранжировать их по сходству с белками других бактерий за исключением представителей микобактериального комплекса (параметр “score” Табл. 2). Три белка с наименьшим значением score, то есть с наибольшей структурной специфичностью для *Mtb* за счет содержания уникальных для *Mtb* протяженных доменов, были далее более подробно изучены. Были клонированы соответствующие гены и получены рекомбинантные белки (Rv0341-белок, индуцируемый изониазидом IniB; Rv1509-белок с неизвестной функцией; Rv2018 – антитоксин) в виде His-tag белков на основе экспрессионной векторной системы pET19b (“Novagen”, Индия). Полученные рекомбинантные белки согласно электрофорезу в 12%-ном ПААГ и иммуноблоттингу связывались со специфическими к His-tag антителами (рис. 1). Их соответствие исходным белкам подтверждалось методом MALDI-TOF (не показано).

Полученные рекомбинантные белки были протестированы на способность связывания с антителами сывороток больных ТБ методом иммуноблоттинга. Для этой работы в качестве первичных антител использовали выделенные с помощью аффинной хроматографии из пулированной сыворотки 12 больных ТБ иммуноглобулины. Как оказалось, наилучшие результаты были получены если предварительно из сыворотки осаждали липопротеиды с помощью сульфата декстрана в присутствии ионов кальция. В качестве вторичных антител использовали конъюгаты античеловеческих антител с фосфатазой или конъюгат белка G с пероксидазой. В результате инкубации были получены окрашенные полосы, соответствующие белковым пятнам на исходном геле. Иммуноре-

**Таблица 1.** Пул белков, выявляющих связывание с иммуноглобулинами пулированной сыворотки больных\*

Тип клеток <i>M.tuberculosis</i>	Белковый продукт	Название гена	Rv номер
Активные\покоящиеся**	Малат синтаза G	<i>glcB</i>	Rv1837c
Активные\покоящиеся**	Возможная аконитаза	<i>Acn</i>	Rv1475c
Активные**	Универсальный стрессовый белок TB31.7	<i>TB31.7</i>	Rv2623
Активные**	Возможная S-аденозилметионин-зависимая метил трансфераза	Rv0731c	Rv0731c
Активные**	Белок Wag31 семейства Diviva	<i>wag31</i>	Rv2145c
Активные**	ДНК-зависимая РНК полимеразы ( $\alpha$ субединица)	<i>rpoA</i>	Rv3457c
Активные**	Секретируемая L-аланин дегидрогеназа	<i>ald</i>	Rv2780
Активные**	Транскрипционный регуляторный белок MoxR1	<i>moxR1</i>	Rv1479
Активные**	Липаза\эстераза LipN	<i>lipN</i>	Rv2970c
Активные**	Триггерный фактор (TF)	<i>tig</i>	Rv2462c
Активные**	Консервативный белок	Rv0831c	Rv0831c
Активные**	Энолаза Eno	<i>eno</i>	Rv1023
Активные**	Консервативный белок	<i>fhaA</i>	Rv0020c
Активные**	$\beta$ -кетоацил-АСР синтаза	<i>kasB</i>	Rv2246
Активные**	Консервативный белок	<i>35kd_ag</i>	Rv2744c
Активные**	Электрон транспортный флавопротеин	<i>fixB</i>	Rv3028c
Активные**	Транскрипционный анитерминирующий белок	<i>nusG</i>	Rv0639
Активные**	Тиоредоксин	Rv1324	Rv1324
Активные**	Консервативный белок	Rv3075c	Rv3075c
Покоящиеся**	Консервативный белок	Rv2018	Rv2018
Покоящиеся**	Аконитаза	<i>acn</i>	Rv1475c
Покоящиеся***	Шаперон GroEL	<i>groEL1</i>	Rv3417c
Покоящиеся***	Шаперон DnaK (HSP70)	<i>dnaK</i>	Rv0350
Покоящиеся**	Каталаза-пероксидаза KatG	<i>katG</i>	Rv1908c
Покоящиеся**	Метионин синтаза	<i>metE</i>	Rv1133c
Покоящиеся***	Изониазид-индуцибельный белок IniB	<i>iniB</i>	Rv0341

\* Представлены иммунореактивные белки, выявленные в протеоме активного *M. tuberculosis* (10 сут роста культуры) и в протеоме покоящихся форм туберкулеза (12 мес. хранения культуры) с использованием пулированной сыворотки 10 больных туберкулезом.

\*\* Белки цитоплазматической фракции.

\*\*\* Белки мембранной фракции.

активность данных рекомбинантных белков была проверена с двумя дополнительными панелями пулированных сывороток больных ТБ. Согласно иммуноблоттингу все три белка показали способность связываться с антителами сывороток (рис. 2).

Поскольку существовала вероятность, что не все белки (особенно гидрофобные или находящиеся в виде олигомеров) могут быть обнаружены с помощью 2D электрофореза, было проведено разде-

ление белков покоящихся клеток в одномерном ПААГ электрофорезе в присутствии ДДС-Na. Иммуноблоттинг разделенных таким образом белков позволил обнаружить иммунореактивную полосу с высокой активностью в районе 20 кДа. Согласно MALDI-TOF в иммунореактивной зоне были представлены три белка: Rv2986c, *hupB* (связывающийся с ДНК белок семейства HU); Rv0432, *sodC* (периплазматическая супероксиддисмутаза [Cu-Zn]); Rv3676, *crp*, (транскрипционный регулятор семейства Crp/Fng белков). Для установле-

**Таблица 2.** Структурная гомология иммунодоминантных белков, обнаруживаемых в покоящихся клетках *M. tuberculosis*

Фракция клеток	Название белка	Номер гена	Молекулярная масса	<i>M. tuberculosis</i> комплекс**	Другие бактерии (score)*
Цитоплазма	Каталаза-пероксидаза KatG	Rv1908c	80572.8	+	1311
Цитоплазма	Малат синтаза G	Rv1837c	80403	+	1394
Цитоплазма	Аконитаза	Rv1475c		–	1741
Цитоплазма	Метионин синтаза	Rv1133c	81549.5	+	1384
Мембраны	Шаперон DnaK	Rv0350	66830.9	+	1258
Мембраны	Шаперон GroEL1	Rv3417c	55877.5	+	914
Цитоплазма	Консервативный белок	<b>Rv2018</b>	<b>26034.5</b>	Кроме <i>M. microtti</i>	<b>433</b>
sds- мембраны	Изониазид-индуцибельный белок IniB	<b>Rv0341</b>	<b>43921.2</b>	+	<b>206</b>
sds- мембраны	Гипотетический белок	<b>Rv1509</b>	<b>33023.4</b>	Только у <i>M. tuberculosis</i> и <i>M. canetti</i>	<b>492</b>
Цитоплазма	HU гомолог HupB	<b>Rv2986c</b>	<b>22 187.3</b>	+	<b>238</b>

\* Параметр “score” включает оценку покрытия последовательности и аминокислотное сходство в гомологичном белке по сравнению со сравнимым белком из *Mtb*. Большие значения соответствуют большему сходству последовательностей. Приведены максимальные значения score. Жирным шрифтом выделены белки с минимальным значением score.

\*\* +/– наличие или отсутствие гомолога данного белка у всех представителей бактерий туберкулезного комплекса.

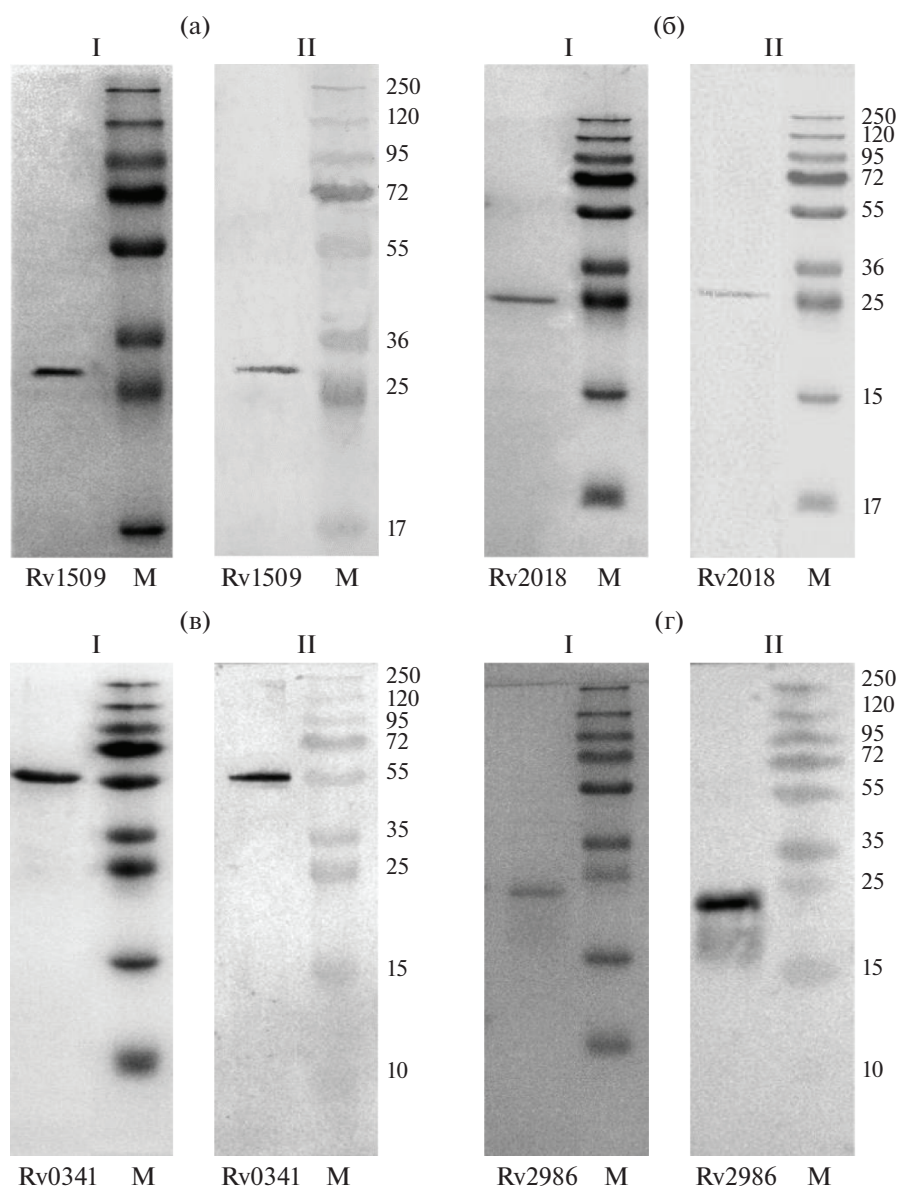
ния иммунореактивного белка все три гена были клонированы в клетках *E. coli* и соответствующие белки были получены в виде рекомбинантных белков в системе рЕТ векторов (рЕТ19в и рЕТ23а). В результате были получены индивидуальные белки, которые были подвергнуты электрофорезу в ПААГ в денатурирующих условиях и проведен иммуноблоттинг с пулированными сыворотками больных туберкулезом. Оказалось, лишь белок Rv2986c проявлял способность связываться с иммуноглобулинами сывороток (рис. 3), который был использован в дальнейших экспериментах.

Полученные четыре рекомбинантных белка были использованы для оценки наличия антител в индивидуальных сыворотках больных туберкулезом и здоровых доноров методом ИФА.

Всего было проведено четыре серии экспериментов (по одному для каждого белка). В каждом эксперименте использовались 42 сыворотки больных ТБ и 42 сыворотки здоровых доноров. Согласно полученным данным все четыре рекомбинантных антигена распознавались сыворотками больных ТБ (рис. 4). Однако лишь от 5 до 45% больных (для разных антигенов) имели концентрации иммуноглобулинов, которые превышали средние значения у здоровых доноров. Максимальное превышение демонстрировал белок Rv2986. В тоже время в сыворотках у 2–14% здоровых доноров также выяв-

лялись антитела в концентрациях, превышающих те же средние значения.

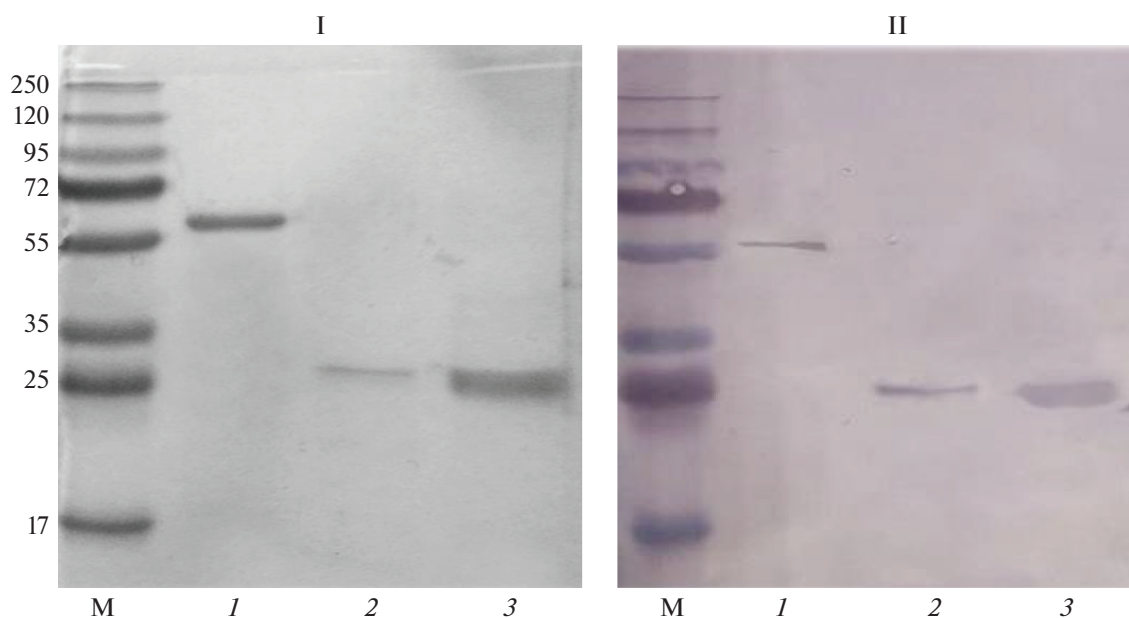
Два из изученных белков (Rv2018 и Rv0341) являются новыми, ранее не описанными в литературе. Белок Rv2018 имел сходство с антитоксином семейства VarB, который обнаруживается в G/C богатых актинобактериях, в том числе микобактериях. Полагают, что системы “токсин-антиоксин” играют важную роль в переходе клеток бактерий в покоящееся состояние [9]. Белок, кодируемый геном Rv0341 (IniB – Isoniazid inducible gene protein) согласно BLAST обнаруживается исключительно у микобактерий и находится в составе крупных комплексов (680 кДа и более) в экстракте мембран покоящихся клеток *M. tuberculosis*. На ранней стадии реактивации покоящихся микобактерий начинается разрушение этих комплексов до мономерной формы белка, а в логарифмической фазе крупные комплексы с белком Rv0341 исчезают. Белок IniB со-локализуется с нуклеиновыми кислотами в экстрактах мембран покоящихся микобактерий [10]. IniB выявляется гиперэкспрессированным при заражении макрофагов клетками *Mtb*. Фрагменты белка IniB хорошо связываются с комплексом гистосовместимости МНС (Major Histocompatibility Complex) 1 и 2 класса лимфоцитов и таким образом, очевидно, что IniB участвует в клеточном иммунном ответе [11]. Согласно недавно опубликованной работе



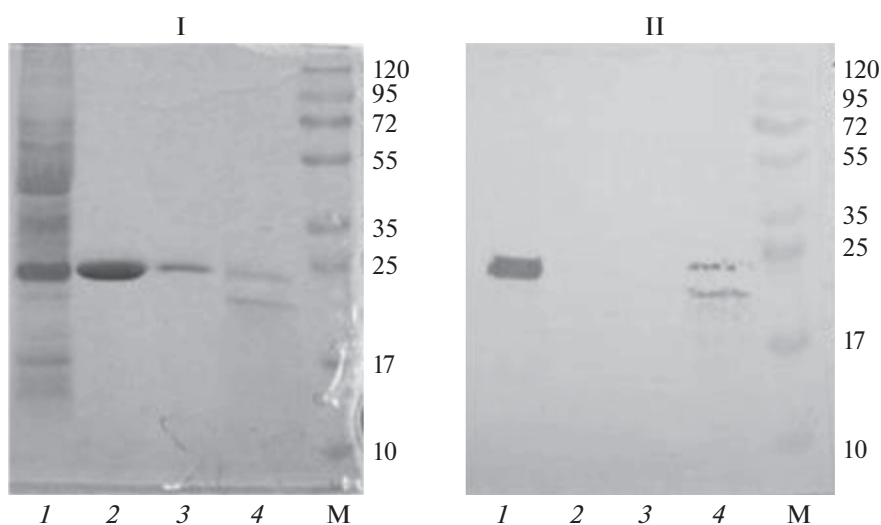
**Рис. 1.** Электрофорез в 12%-ном ПААГ с ДДС-Na (I) рекомбинантных белков: Rv1509 (а), Rv2018 (б), Rv0341 (в), Rv2986 (г) и соответствующий иммуноблот (II) со специфическими к His-tag антителами.

этот белок имеет хороший протективный потенциал для защиты от ТБ [12]. Однако данный белок ранее не был описан в качестве связывающегося с антителами, он также не вошел в списки иммуногенных белков, полученных на основе изучения тотального иммунопротеома активных клеток МТБ в публикациях 2010–2020 гг. [13–15]. Белок, кодируемый геном Rv2986с является ДНК-связывающим и относится к гистоноподобным белкам (НурВ, НУ-гомолог). Его экспрессия увеличивалась как в стационарной фазе роста *Mtb*, так и в гипометаболическом состоянии [16–18]. В качестве иммуногенного НурВ, найденный во фракции клеточных стенок активных *Mtb*, был

описан в литературе ранее [19]. Было также установлено, что концентрация антител против этого белка или фрагментов НурВ в сыворотках больных ТБ достоверно превышает таковую у здоровых доноров [20, 21]. Однако эти данные не нашли подтверждения в исследованиях тотального иммунопротеома активных клеток *Mtb*. В таких исследованиях оценивали иммуногенность большинства белков, входящих в протеом *Mtb* [13, 15]. Так в работе 2010 г. [13] из общего пула белков *Mtb* было выявлено 484 белка в качестве распознающихся сыворотками больных, среди которых белки, выявленные в настоящем исследовании, отсутствовали (в том числе НурВ). Из 484 белков была



**Рис. 2.** Электрофорез в 12%-ном ПААГ с ДДС-На рекомбинантных белков (I) Rv0341 (1), Rv2018 (2), Rv1509 (3) и соответствующий иммуноблот (II) с антителами пулированной сыворотки больных туберкулезом.

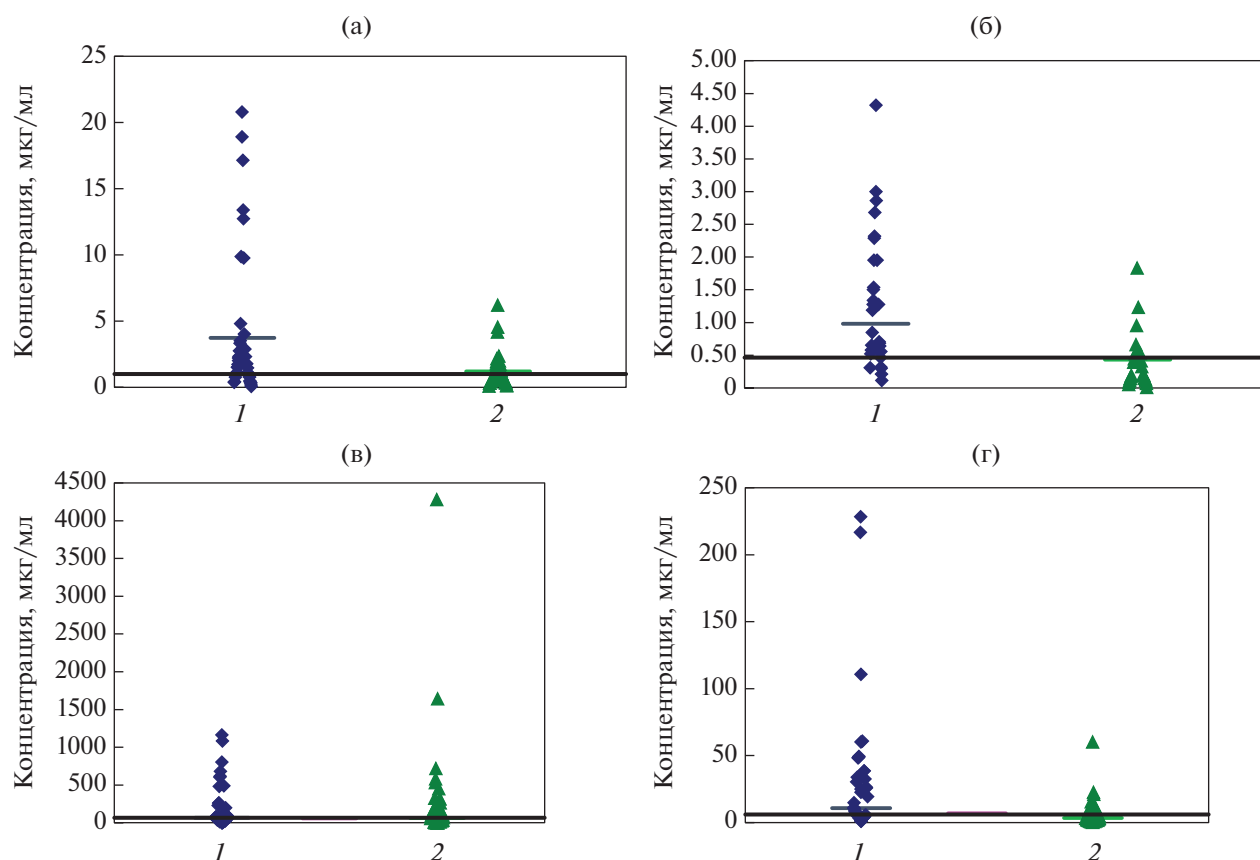


**Рис. 3.** Электрофорез в 12%-ном ПААГ с ДДС-На экстракта мембран клеток *M. tuberculosis*, трех рекомбинантных белков, обнаруженных в иммунореактивной полосе во фракции мембран (I) и соответствующий иммуноблот (II) с пулированной сывороткой больных туберкулезом: 1 – ДДС-На экстракт из мембран; 2 – Rv3676; 3 – Rv0432; 4 – Rv2986.

выделена группа из 13 белков, наиболее часто распознающихся индивидуальными сыворотками. Однако иммуногенность белков даже из этой группы варьировала существенно среди больных туберкулезом. Сходная большая вариабельность в иммуногенности была описана в недавно опубликованной работе по серодиагностике ТБ у 755 больных из нескольких стран с применением панели из 22 предварительно отобранных из полного протеома антигенов *Mtb* в виде рекомбинантных бел-

ков [14], а также в работе по выявлению биомаркеров для серодиагностики латентного ТБ [22].

Отсутствие антигенов, отобранных в нашем исследовании, в цитируемых выше публикациях возможно связано с методами, используемыми для экспрессии большого числа белков с применением специальных белковых микрочипов которые не покрывают на 100% протеом *Mtb* [13], и в которых чистота экспрессируемых белков может быть не достигнута [14]. Это отличается от экспрессии



**Рис. 4.** ИФА связывания рекомбинантных белков Rv1509 (а), Rv0341 (б), Rv2018 (в), Rv2986 (г) с антителами сывороток крови индивидуальных больных туберкулезом (1) и здоровых доноров (2) (использовали 42 образца больных и 42 образца здоровых доноров).

индивидуальных белков, когда проведена экспериментальная селекция и выявлены иммуногенные белки с помощью моделей *in vitro*, как в настоящем исследовании, и делает такое направление перспективным.

В целом, в результате такого подхода выявлены иммунодоминантные белки *Mtb*, в том числе новые, ранее не опубликованные, проявляющие способность связываться с антителами сывороток больных ТБ. Поскольку в настоящем исследовании использовались покоящиеся клетки *Mtb*, нельзя исключить, что наличие антител в сыворотках к обнаруженным иммунодоминантным белкам связано с наличием персистирующих клеток возбудителя в организме хозяина.

Как в цитируемых исследованиях, так и в настоящей работе содержание антител к отдельным антигенам сильно варьирует у больных туберкулезом. Как полагают это может быть связано с несколькими причинами, в том числе: 1) наличием метаболическом и физиологическом состоянии у конкретного пациента и, соответственно различная экспрессия данного антигена в момент отбора образцов крови; 2) генетические особенности

пациентов и связанные с этим особенности иммунного ответа, что также может отражаться на синтезе антител; 3) в среднем низкий уровень гуморального ответа у больных туберкулезом (особенно при хронической инфекции), который приводит к вариабельности содержания антител к конкретному антигену [13, 14]. С другой стороны, в сыворотках некоторых здоровых людей определяются антитела, реагирующие с теми же антигенами. Возможно, это связано с наличием неспецифических для *Mtb* доменов в первичной структуре исследуемых белков. Изучение иммунореактивности полипептидов, сконструированных на основе специфических доменов белков, найденных в настоящем исследовании, может оказаться перспективным для серодиагностики туберкулеза.

При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 16-15-00245-П).



Рекомбинантный белок Rv0341 был исследован при поддержке гранта РФФИ № 18-015-00239.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Нечаева О.Б.* // Туберкулез и болезни легких. 2018. V. 8. № 96. P. 15–24.
2. *Apt A.S., Logunova N.N., Kondratieva T.K.* // Tuberculosis. 2017. V. 106. P. 1–8.
3. *Shleeva M.O., Kudykina Y.K., Vostroknutova G.N., Suzina N.E., Mulyukin A.L., Kaprelyants A.S.* // Tuberculosis. 2011. V. 91. № 2. P. 146–154.
4. *Trutneva K.A., Shleeva M.O., Demina G.R., Vostroknutova G.N., Kaprelyants A.S.* // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2020. V. 10. P. 26
5. *Connell N.D.* // Methods cell biol. 1994. V. 45. P. 107–125.
6. *O'Farrell P.H.* // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. P. 4007–4021.
7. *Flores R.* // Anal. Biochem. 1978. V. 88. P. 605–611.
8. *Welin A., Raffetseder J., Eklund D., Stendahl O., Lerm M.* // J. Innate Immun. 2011. V. 3. № 5. P. 508–518.
9. *Barer M.R., Harwood C.R.* // Adv. Microb. Physiol. 1999. V. 41. P. 93–137.
10. *Shleeva M., Trutneva K., Shumkov M., Demina G., Kaprelyants A.* // FEBS Open Bio. 2018. V. 8. № S1. P. 400
11. *Flyer D.C., Ramakrishna V., Miller C., Myers H., McDaniel M., Root K., Flourney C., Engelhard V.H., Canaday D.H., Marto J.A., Ross M.M., Hunt D.F., Shabanowitz J., White F.M.* // Infect. Immun. 2002. V. 70. № 6. P. 2926–2932.
12. *Bettencourt P., Müller J., Nicastri A., Cantillon D., Madhavan M., Charles P.D., Fotso C.B., Wittenberg R., Bull N., Pinpathomrat N., Waddell S.J., Stylianou E., Hill A., Ternette N., McShane H.* // NPJ Vaccines. Springer US. 2020. V. 5. № 2. <https://doi.org/10.1038/s41541-019-0148-y>
13. *Kunnath-Velayudhan S., Salamon H., Wang H.Y., Davidow A.L., Molina D.M., Huynh V.T., Cirillo D.M., Michel G., Talbot E.A., Perkins M.D., Felgner P.L., Liang X., Gennaro M.L.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 33. P. 14703–14708.
14. *Broger T., Basu Roy R., Filomena A., Greef C.H., Rimmelme S., Havumaki J., Danks D., Schneiderhan-Marra N., Gray C.M., Singh M., Rosenkrands I., Andersen P., Husar G.M., Joos T.O., Gennaro M.L., Lochhead M.J., Denking C.M., Perkins M.D.* // Clin. Infect. Dis. 2017. V. 64. № 7. P. 947–955.
15. *Peng Z., Chen L., Zhang H.* // J. Int. Med. Res. 2020. V. 48. № 3. <https://doi.org/10.1177/0300060520910042>
16. *Matsumoto S., Furugen M., Yukitake H., Yamada T.* // FEMS Microbiol. Lett. 2000. V. 182. № 2. P. 297–301.
17. *Matsumoto S., Yukitake H., Furugen M., Matsuo T., Mineta T., Yamada T.* // Microbiol. Immunol. 1999. V. 43. № 11. P. 1027–1036.
18. *Lewin A., Baus D., Kamal E., Bon F., Kunisch R., Maurischat S., Adonopoulou M., Eich K.* // BMC Microbiol. 2008. V. 8. P. 91
19. *Yeruva V.C., Duggirala S., Lakshmi V., Kolarich D., Altmann F., Sritharan, M.* // Clin. Vaccine Immunol. 2006. V. 13. № 10. P. 1137–1142.
20. *Sritharan N., Choudhury M., Sivakolundu S., Chaurasia R., Chouhan N., Rao P.P., Sritharan M.* // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2014. V. 34. № 1. P. 33–40.
21. *Sivakolundu S., Mannela U.D., Jain S., Srikantam A., Peri S., Pandey S.D., Sritharan M.* // Trans R Soc. Trop. Med. Hyg. 2013. V. 107. № 1. P. 43–50.
22. *Zhou F., Xu X., Wu S., Cui X., Pan W.* // BMC Infectious Diseases. 2017. V. 17. № 1. P. 793.

## Immunoreactive Proteins of Dormant *Mycobacterium tuberculosis* Cells

K. A. Trutneva<sup>a</sup>, V. G. Avdienko<sup>b</sup>, G. R. Demina<sup>a</sup>, M. O. Shleeva<sup>a</sup>, M. S. Shumkov<sup>a</sup>,  
E. G. Salina<sup>a</sup>, and A. S. Kaprelyants<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre 'Fundamentals of Biotechnology' of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

<sup>b</sup>*Central Institute for Tuberculosis, Moscow, 107564 Russia*

\*e-mail: [arseny@inbi.ras.ru](mailto:arseny@inbi.ras.ru)

In order to find antigenic proteins for human which are expressed by *M. tuberculosis* (*Mtb*) cells *in vitro* under conditions close to situation of persistence *in vivo*, the protein profile of dormant *Mtb* obtained after gradual acidification of *Mtb* culture was studied. According to 2D electrophoresis significant variety of proteins in dormant cells was found. However, representation of individual proteins in dormant vs active cells differ substantially. Immunoblotting revealed 10 proteins in different protein fractions of dormant cells which are able to bind antibodies in pooled sera of TB patients. Two proteins (Rv2018 and Rv0341) are new, earlier not found as immunogenic in other studies. Four proteins (Rv0341, Rv2018, Rv1509, Rv2986) with maximum structural specificity for *Mtb* were selected for further analysis. These proteins were expressed in *E. coli* cells and studied for immunogenicity of individual sera of TB patients and healthy donors by ELISA. All proteins revealed ability to react with individual sera of TB patients. From 5 to 45% (depending on particulate protein) TB patients have titer higher than average titers of healthy donors +SD, most immunogenic was protein Rv2986. Thus, application of phenotypically changed (dormant) *Mtb* cells allows to elucidate a specific repertoire of immunodominant proteins which could be used in construction of polypeptides useful for serodiagnosis of active/latent TB.

**Keywords:** *M. tuberculosis*, dormant forms, proteome, enzyme-linked immunosorbent assay, serodiagnostics

УДК 577.152.344:582.282.123.4

## СВОЙСТВА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ МИКРОМИЦЕТА *Aspergillus ustus* 1, ОБЛАДАЮЩЕЙ ВЫСОКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПРИ ГИДРОЛИЗЕ ФИБРИЛЛЯРНЫХ БЕЛКОВ

© 2021 г. Е. А. Попова<sup>1</sup>, В. Г. Крейер<sup>1</sup>, С. К. Комаревцев<sup>2</sup>, С. В. Шабунин<sup>2</sup>, А. А. Осмоловский<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж, 394087 Россия

\*e-mail: aosmol@mail.ru

Поступила в редакцию 27.06.2020 г.

После доработки 07.09.2020 г.

Принята к публикации 02.11.2020 г.

Из комплекса белков, синтезируемых микромицетом *Aspergillus ustus* 1 в условиях твердофазного культивирования, была выделена новая протеиназа, гидролизующая коллаген, эластин и фибрин. Показано, что фермент имел молекулярную массу 33 кДа и изоэлектрическую точку (*pI*) 4.6 и не содержал углеводных остатков. Ингибиторный анализ позволил отнести протеиназу к сериновому типу. Установлено, что рН–оптимум действия фермента ~рН 6.0, температурный оптимум – 41°C. Коллагенолитическая активность выделенной протеиназы *A. ustus* 1 в 1.46 раз превышала активность препарата протеиназ *A. terreicola* и была сопоставима с активностью препарата коллагеназы *Clostridium histolyticum*.

**Ключевые слова:** протеиназы микромицетов, активность по отношению к фибриллярным белкам, коллагенолитические ферменты, аспергиллы, твердофазное культивирование

**DOI:** 10.31857/S0555109921020124

На протяжении многих лет выявление и изучение новых продуцентов высокоактивных протеиназ остается важной задачей современной микробиологии. В связи с разнообразием сфер их использования сохраняется потребность в протеолитических ферментах с различными свойствами. Микромицеты имеют ряд важных преимуществ по сравнению с другими продуцентами таких ферментов, поскольку они способны образовывать комплекс протеиназ, проявляющих активность в широком диапазоне рН и температур. Так, ранее было показано, что микромицет *Aspergillus ustus* 1 способен синтезировать протеиназы, обладающие высокой коллагенолитической, фибринолитической и эластинолитической активностью [1]. Такие протеиназы широко применяются в фармацевтической [2], легкой [3] и пищевой [4] отраслях промышленности. Можно было предположить, что протеолитические ферменты, образуемые микромицетом *A. ustus* 1, окажутся более доступными по сравнению с аналогами, сохраняя при этом высокую активность.

Цель работы – выделение комплекса протеиназ, синтезируемых микромицетом *A. ustus* 1 в условиях твердофазного культивирования, и изу-

чение свойств наиболее активного фермента, способного гидролизовать коллаген, фибрин и эластин.

### МЕТОДИКА

**Объект исследования и условия культивирования.** Использовали штамм микромицета *A. ustus* 1, отобранный ранее в качестве продуцента протеиназ, обладающих коллагенолитической, фибринолитической и эластинолитической активностью [1]. Твердофазное культивирование проводили в культуральных флаконах Т-75 (“Eppendorf”, Германия) в статических условиях при 28°C. В качестве носителя использовали вермикулит, на 1 г которого добавляли 4.2 мл ферментационной среды следующего состава (%): глюкоза – 3.0, глицерин – 7.0, гидролизат рыбной муки – 0.5, NaNO<sub>3</sub> – 0.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.05 и MgSO<sub>4</sub> – 0.05. Инокулирование осуществляли 1 мл суспензии спор с поверхностной культуры микромицета в 0.0001%-ном растворе Твин-80. По окончании культивирования в культуральные флаконы добавляли 20 мл 0.05 М Na-ацетатного буфера, рН 5.5, и инкубировали при перемешивании на

орбитальной качалке (200 об./мин) в течение 30 мин. Культуральную жидкость отделяли фильтрованием через фильтровальную бумагу (“ФС”, Россия).

**Выделение и фракционирование комплекса протеиназ микромицета *A. ustus* 1.** Внеклеточные белки микромицета получали осаждением сульфатом аммония (608 г на 1 л культуральной жидкости). Осадок белков отделяли центрифугированием при 15000 g в течение 20 мин при 4°C, растворяли в 0.01 М Na-ацетатном буфере, pH 5.5, диализовали в диализных трубках против этого же буфера в течение 12 ч при 4°C и лиофильно высушивали.

Полученные белки фракционировали методом изоэлектрофокусирования в течение 36 ч в колонке объемом 110 мл (“ЛКВ”, Швеция) в градиенте pH 2.5–10 (амфолинов) и плотности сахаразы 0–40% при напряжении 800 В [5]. Содержимое колонки собирали по фракциям объемом 1.5 мл, в каждой из которых определяли pH, содержание белка (при 280 нм) и протеолитическую активность.

**Определение протеолитической активности.** Определяли общую протеолитическую, коллагенолитическую, фибринолитическую и эластинолитическую активность.

Общую протеолитическую (казеинолитическую) активность определяли модифицированным методом Ансона–Хагихары по гидролизу 1%-ного раствора казеина по Хаммерштайну в 0.1 М Na-ацетатном буфере, pH 5.5, в течение 10 мин при 37°C, как описано ранее [6]. Активность рассчитывали по количеству тирозина в продуктах протеолиза, не осаждаемых трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Оптическую плотность определяли спектрофотометрически при 275 нм и рассчитывали количество высвободившегося тирозина в пробе. Активность выражали в мкмольх тирозина, освобожденного за мин ( $E_{\text{Тир}}$ ).

Фибринолитическую активность определяли аналогично общей протеолитической активности при гидролизе 1%-ной суспензии бычьего фибрина в 0.1 М Na-ацетатном буфере, pH 5.5, в течение 30 мин при 37°C [6, 7]. Активность выражали в  $E_{\text{Тир}}$ .

Коллагенолитическую активность определяли с использованием в качестве субстрата суспензии азоколлаген (2 мг/мл) по общепринятой методике [8, 9]. Активность выражали в мкг азоколлагена, расщепившегося в течение 1 мин ( $E_{\text{Азк}}$ ).

Эластинолитическую активность определяли по расщеплению Suc-Ala-Ala-Ala-pNA (0.05%-ный раствор), являющегося хромогенным пептидным субстратом эластазы, по общепринятой методике [1, 10] при pH 5.5 и 37°C. Активность выражали в мкмольх *n*-нитроанилина в мин ( $E_{\text{пНА}}$ ), содержание которого устанавливали спектрофотометри-

чески при 405 нм на спектрофотометре Bio-Spectrometer kinetic (“Eppendorf”, Германия).

Аналогичным способом определяли активность по отношению к другим хромогенным субстратам, таким как p-Glu-Pro-Arg-pNA (субстрат активированного протеина C), Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (субстрат тромбина), H-D-Val-Leu-Lys-pNA (плазмина), H-D-Ile-Pro-Arg-pNA (тканевого активатора плазминогена), p-Glu-Gly-Arg-pNA (субстрат урокиназы), Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (Ха-фактора), Ac-Phe-pNA (химотрипсина), Bz-Arg-pNA (трипсина) и Z-Ala-Ala-Leu-pNA (субтилизина).

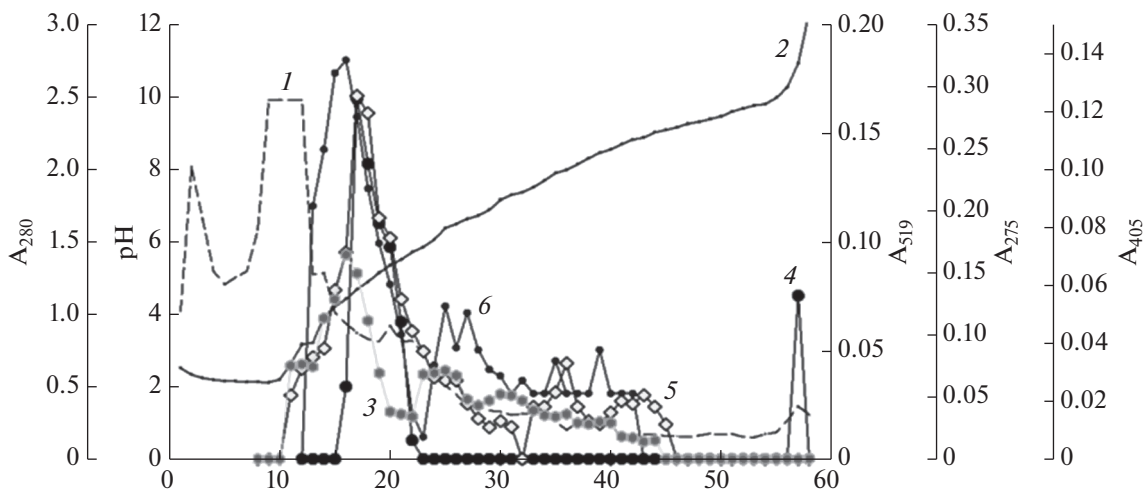
Гидролиз осуществляли при постоянном перемешивании в термошейкере TS-100 (“BioSan”, Латвия). Опыты проводили в трех повторностях. Приведенные результаты представляли собой средние значения, ошибка которых не превышала 5–7%.

**Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ).** Нативный электрофорез в ПААГ проводили по методу Дэвиса в трис-глициновом буфере, pH 8.3 [11]. Денатурирующий электрофорез проводили в ПААГ по методу Лэммли с изменениями при силе тока 50 мА [12].

**Ингибиторный анализ.** Ингибиторный анализ осуществляли как описано ранее [13], используя ингибиторы металлопротеиназ (этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и *o*-фенантролин), а также цистеиновых (пара-хлормеркурийбензоат, *n*-ХМБ) и сериновых (фенилметилсульфонилфторид, ФМСФ) протеиназ в молярном соотношении фермент : ингибитор 1 : 10 и 1 : 100. Остаточную активность фермента определяли при 37°C после его прединкубации с ингибитором в течение 90 мин при 25°C, используя в качестве субстрата азоколлаген. Активность выражали в процентах от контроля.

**Определение углеводного компонента в молекуле протеиназы.** Для выявления содержания углеводного компонента в молекуле выделенной протеиназы проводили качественную реакцию с периодной кислотой и реактивом Шиффа (фуксинсернистая кислота) методом дот-блоттинга на нитроцеллюлозных мембранах [14]. В качестве положительного контроля использовали раствор 0.5 мг/мл внеклеточной дрожжевой инвертазы, а в качестве отрицательного – 0.5 мг/мл БСА.

**Определение pH-оптимума действия и pH-стабильности протеиназы.** Зависимость активности протеиназы от pH определяли в 0.4 М универсальном (натрий-ацетат-фосфат-боратном) буфере, pH от 4.0 до 7.0. К 150 мкл буфера с соответствующим значением pH добавляли 100 мкл пробы фермента и 100 мкл суспензии азоколлагена (2 мг/мл). Для определения стабильности фермента при различных значениях pH его инкубировали в течение 2 ч в 0.4 М универсальном буфере с различными значениями pH (от 4.0 до 10.0)



**Рис. 1.** Изоэлектрофокусирование внеклеточных белков в культуральной жидкости *A. ustus* 1:  $A_{280}$  (1), pH (2), казеинолитическая (3), фибринолитическая (4), эластинолитическая (5) и коллагенолитическая (6) активность.

при 37°C и измеряли остаточную активность. Полученные результаты выражали в % от исходной активности.

**Определение температурного оптимума активности и термостабильности протеиназы.** Температурный оптимум действия протеиназы при гидролизе коллагена определяли в 0.05M трис-HCl-буфере, pH 8.2, в диапазоне от 20 до 55°C.

Термостабильность фермента изучали после его инкубации в течение 2 ч при заданных температурах (от 24 до 65°C). Полученные результаты выражали в % остаточной активности от исходной.

**Сравнение протеиназы *A. ustus* 1 с протеиназами других микромицетов.** Для сравнения коллагенолитической активности протеиназ, секретируемых *A. ustus* 1 и *A. terricola*, проводили гидролиз нативного бычьего коллагена в течение 5 ч при 37°C. Для этого к 7.0 мкл каждого фермента (1 мг белка/мл) добавляли 343 мкл суспензии коллагена (2 мг/мл) и инкубировали в течение 5 ч при 37°C. Реакцию останавливали 350 мкл 0.05 M трис-HCl буфера, pH 8.2, содержащего 12% полиэтиленгликоля 6000 (PEG 6000) и 25 мкМ ЭДТА, и нингидринового реагента. Затем смесь нагревали в течение 10 мин до 80°C. После охлаждения добавляли 500 мкл бидистиллированной воды и измеряли оптическую плотность при 570 нм [15]. Для расчета коллагенолитической активности строили калибровочную кривую по L-лейцину. Активность выражали в единицах (ед.) высвобождения из коллагена (бычий, нативный из ахиллового сухожилия) пептиды, в количестве, эквивалентном 1.0 мкмоль L-лейцина в течение 5 ч при pH 7.4 и 37°C (после окраски нингидрином).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение внеклеточных протеиназ микромицета *A. ustus* 1, активных по отношению к фибриллярным белкам, показало их перспективность для потенциального практического применения. Полученный комплексный препарат внеклеточных белков *A. ustus* 1 обладал как казеинолитической активностью, которая составляла 33.9  $E_{\text{тир}}$ /мг белка, так и коллагенолитической активностью — 16.8  $E_{\text{азк}}$ /мг белка  $\times 10^{-3}$ ). В результате проведения изоэлектрофокусирования полученных внеклеточных белков было обнаружено несколько групп протеолитически активных фракций, концентрирующихся при различных значениях pH, что свидетельствовало о присутствии нескольких ферментов. Так, фракции, обладающие наибольшей фибринолитической, коллагенолитической, казеинолитической и эластинолитической активностью, концентрировались в одной фракции при pH 4.5–4.7 (рис. 1). Можно предположить, что в этой фракции присутствовала основная протеиназа, которая имела изоэлектрическую точку (pI) 4.6. В диапазоне pH 6.3–6.6 концентрировалась фракция, обладающая коллагенолитической, казеинолитической и эластинолитической активностью, при pH 7.5–7.8 — фракция с коллагенолитической и эластинолитической активностью, а при pH 8.2–8.4 — фракция, которая проявляла только коллагенолитическую активность. Однако уровень активности в этих фракциях оказался существенно ниже (рис. 1).

Были изучены свойства выделенной основной протеазы. Результаты электрофореза в ПААГ по Лэммли в присутствии ДС-Na представлены на рис. 2. Аналогичные результаты были получены при нативном электрофорезе в ПААГ по Дэвису

(данные не представлены). Полученные результаты свидетельствовали о гомогенности выделенного фермента, который характеризовался молекулярной массой ~33 кДа.

В дальнейших экспериментах по установлению физико-химических свойств выделенной протеиназы использовали определение ее коллагенолитической активности.

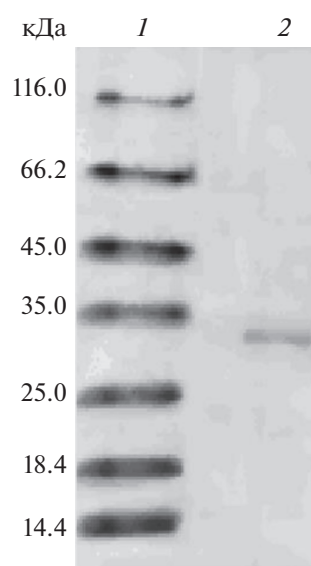
Ингибиторный анализ внеклеточной протеиназы *A. ustus* 1 показал, что ее коллагенолитическая активность практически полностью ингибировалась ФМСФ, в то время как другие использованные ингибиторы не влияли на ее активность (табл. 1). Полученные результаты позволили отнести выделенный фермент к группе сериновых протеиназ.

В результате изучения влияния температуры на коллагенолитическую активность протеиназы *A. ustus* 1 было показано, что оптимальная активность проявлялась при 41°C (рис. 3). Следует отметить, что более 80% коллагенолитической активности сохранялось в достаточно широком диапазоне температур от 39 до 55°C. Также было показано, что протеиназа сохраняла 100% коллагенолитической активности при инкубации в течение 2 ч при температурах от 24 до 45°C (рис. 3).

Изучение оптимального pH для проявления активности протеиназы *A. ustus* 1 показало, что наибольшая коллагенолитическая активность фермента была обнаружена при pH 6.0 (рис. 3). Фермент сохранял 100% активности в диапазоне pH от 5.0 до 8.0 и терял 26.6% активности при pH 9.0. При этом более 75% активности сохранялось в пределах от pH 5.5 до 6.5. При pH 4.0 и 10.0 активность составляла менее 30% от максимальной (рис. 3).

Определение содержания гликопротеинов в молекуле протеиназы *A. ustus* 1 показало, что фермент не гликозилирован (рис. 4), что позволяет в будущем рассматривать возможность его клонирования и экспрессии в прокариотических системах. На рис. 5 представлены результаты определения активности протеиназы *A. ustus* 1 при гидролизе хромогенных пептидных субстратов активированного протеина С, тромбина, плазмина, тканевого активатора плазминогена, урокиназы, Ха-фактора и трипсина. Видно, что наивысшую активность, равную  $29.9 E_{pNA}/мл \times 10^{-3}$ , фермент проявлял при гидролизе субстрата тромбина (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA). Следует отметить также, что протеиназа *A. ustus* 1 преимущественно гидролизовала субстраты, содержащие остаток основной аминокислоты в положении P1, кроме того активность зависела от длины пептида.

Свойства новой внеклеточной протеиназы, выделенной из комплекса внеклеточных белков микромицета *A. ustus* 1, сходны со свойствами некоторых протеиназ, синтезируемых другими ви-



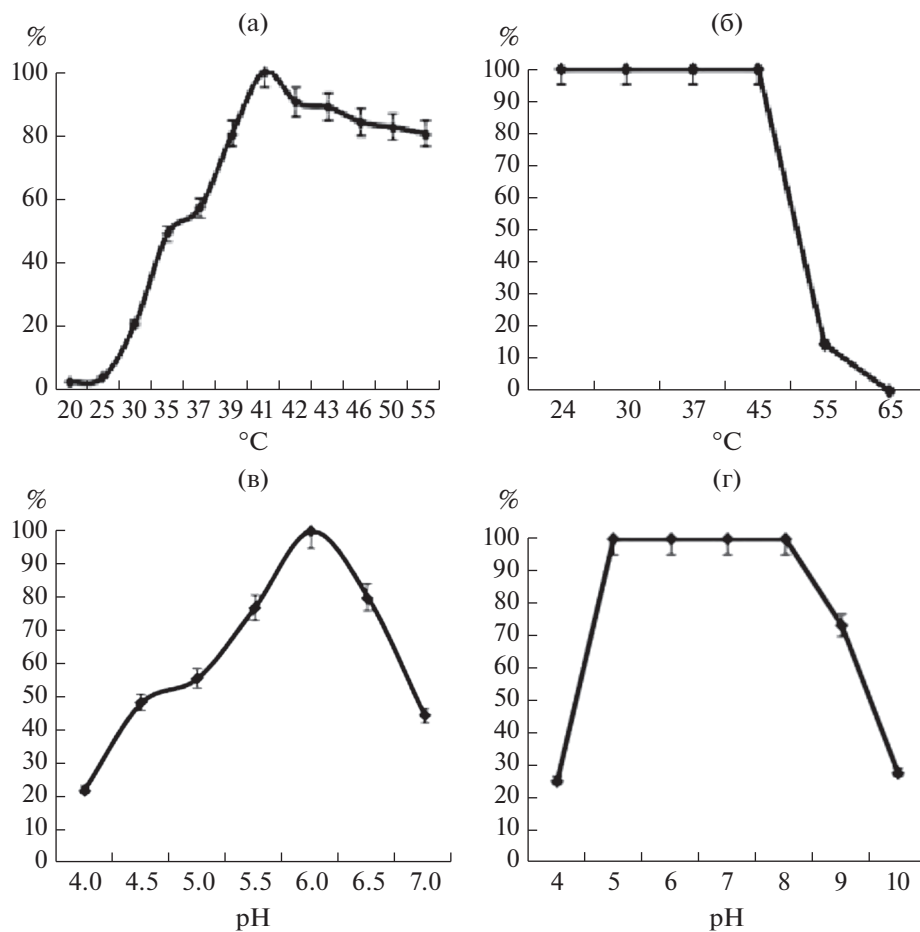
**Рис. 2.** Электрофорез по Лэмбли в присутствии ДДС-Na внеклеточной протеиназы *A. ustus* 1 (1) и белков-маркеров (2) молекулярной массы: бета-галактозидаза (116 кДа), БСА (66.2 кДа), овальбумин (45 кДа), лактатдегидрогеназа (35 кДа), эндонуклеаза рестрикции Bsp981 (25 кДа), бета-лактоглобулин (18.4 кДа) и лизоцим (14.4 кДа).

дами рода *Aspergillus* (табл. 2), но отличались более широким спектром расщепляемых субстратов, включая такие, как фибрин и эластин. Эта особенность может быть востребована, например, при производстве белковых кормовых добавок, поскольку позволит снизить затраты на их ферментативную обработку.

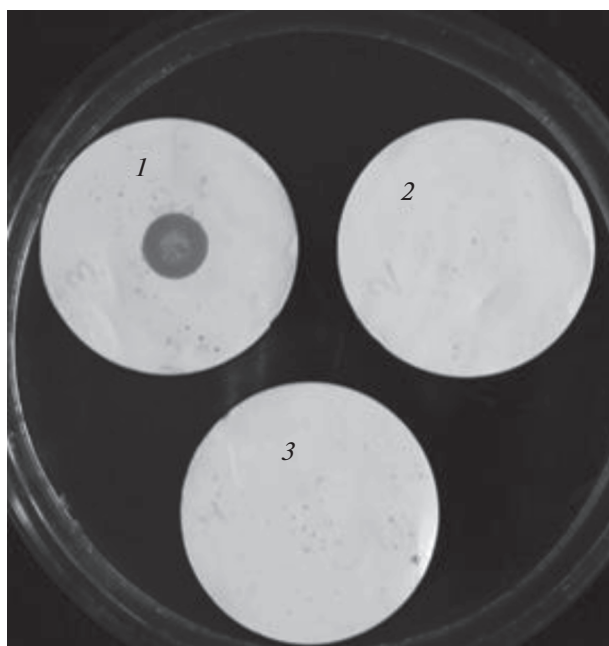
Для сравнения коллагенолитической активности протеиназы *A. ustus* 1 и *A. terreicola*, входящей в

**Таблица 1.** Ингибиторный анализ внеклеточной протеиназы *A. ustus* 1

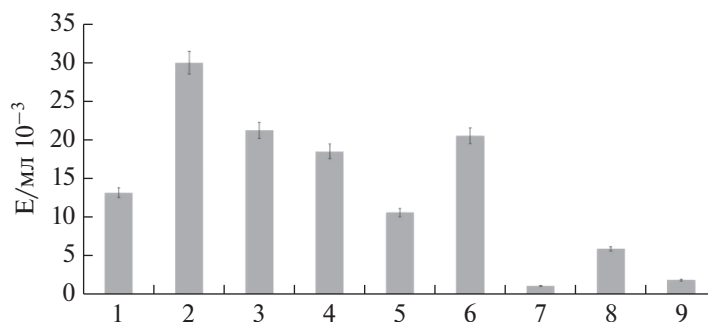
Ингибитор	Молярное соотношение фермент : ингибитор	Остаточная активность, %
Контроль (без ингибитора)	-	100.0
ЭДТА	1 : 10	100.0
	1 : 100	100.0
n-ХМБ	1 : 10	100.0
	1 : 100	100.0
o-фенантролин	1 : 10	100.0
	1 : 100	100.0
ФМСФ	1 : 10	3.7
	1 : 100	4.0



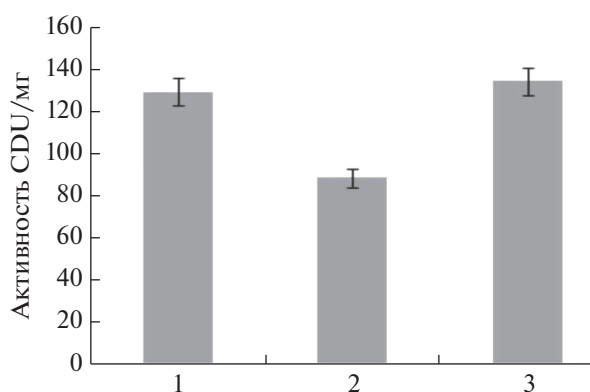
**Рис. 3.** Активность (а, в) и стабильность (б, г) протеиназы *A. ustus* 1 при различных температурах (а, б) и рН (в, г).



**Рис. 4.** Определение с ШИК–реактивом методом дот-блоттинга гликопротеинов в молекулах протеиназы *A. ustus* 1 (3), инвертазы (1, положительный контроль) и БСА (2, отрицательный контроль).



**Рис. 5.** Активность протеиназы *A. ustus* 1 по отношению к хромогенным субстратам, 1 – p-Glu-Pro-Arg-pNA (субстрат активированного протеина C), 2 – Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (тромбина), 3 – H-D-Val-Leu-Lys-pNA (плазмина), 4 – H-D-Ile-Pro-Arg-pNA (тканевого активатора плазминогена), 5 – p-Glu-Gly-Arg-pNA (урокиназы), 6 – Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (Ха-фактора), 7 – Ac-Phe-pNA (химотрипсина), 8 – Bz-Arg-pNA (трипсина), 9 – Z-Ala-Ala-Leu-pNA (субтилизина).



**Рис. 6.** Сравнение коллагенолитической активности протеиназы *A. ustus* 1 (1), препарата “Террилитин” (2) и коммерческой коллагеназы *C. histolyticum* (3).

качестве действующее вещества в состав коммерческого коллагенолитического противоожогового препарата “Террилитин”, нативный бычий коллаген гидролизovali в течение 5 ч этими ферментами. Результаты данного эксперимента

представлены на рис. 6. Как видно на гистограмме, коллагенолитическая активность протеиназы *A. ustus* 1 не только в 1.46 раз превышала активность протеиназы *A. terricola*, но и была сопоставима с активностью коллагеназы *Clostridium histolyticum* (“Sigma-Aldrich”, США). Полученные данные позволили рассматривать протеиназу *A. ustus* 1 в качестве основы для разработки более активных и простых в получении ферментных препаратов, способных стать полноценной альтернативой уже имеющимся препаратам противоожогового действия.

Таким образом, было установлено, что высокоактивный при гидролизе фибриллярных белков внеклеточный фермент, синтезируемый микромицетом *A. ustus* 1 в условиях твердофазного культивирования, представлял собой негликозилированную сериновую протеиназу с молекулярной массой 33 кДа и *pI* 4.6, которая характеризовалась проявлением максимальной активности при pH 6.0 и 41°C.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 20-16-00085).

**Таблица 2.** Сравнение свойств протеиназы *A.ustus* 1 и протеиназ других аспергиллов

Продуцент	pH- и температурный оптимум действия фермента	Молекулярная масса, кДа	Действие ингибиторов	Гидролизуемые субстраты	Источник
<i>Aspergillus oryzae</i>	pH 7.0; 55°C	43	ФМСФ	Казеин	[16]
<i>Aspergillus</i> sp. (UCP 1276)	pH 8.0; 40°C	28.7	ФМСФ	Казеин, кератин, коллаген	[17]
<i>Aspergillus ustus</i> 1	pH 6.0; 41°C	33	ФМСФ	Казеин, коллаген, фибрин, эластин	Настоящая работа

## ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А.П. и С.К.К. – получение и обработка результатов, написание статьи, В.Г.К. и С.В.Ш. – анализ и обсуждение результатов, А.А.О. – концептуализация работы, участие в написании статей, общее руководство работой.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попова Е.А., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Котова И.Б., Егоров Н.С. // Микология и фитопатология. 2019. Т. 53. № 4. С. 229–235.
2. Erdevе O., Atasay B., Arsan S. // Ped. Dermatol. 2007. V. 24. № 2. P. 195–196.
3. Bhagwat P.K., Dandge P.B. // Biocat. Agric. Biotechnol. 2018. V. 15. P. 43–55.
4. Thapa S., Li H., OHair J., Bhatti S., Chen F.-C., Al Nasr K., Johnson T., Zhou S. // Mol. Biotechnol. 2019. V. 61. № 2. P. 579–601.
5. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. № 6. С. 580–586
6. Осмоловский А.А., Попова Е.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Вестник Московского университета. 2016. Т. 71. № 1. P. 71–76.
7. Осмоловский А.А., Рукавицына Е.Д., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Микробиология. 2017. V. 86. № 4. P. 504–509.
8. Chavira Jr.R., Burnett T.J., Hageman J.H. // Anal. Biochem. 1984. V. 136. № 2. P. 446–450.
9. Шаркова Т.С., Кураков А.В., Осмоловский А.А., Матвеева Э.О., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Микробиология. 2015. Т. 84. № 3. С. 316–322.
10. Bieth J., Wermuth C.G. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1973. V. 53. № 2. P. 383–390.
11. Davis B.J. // Ann. N.Y. Ac. Sci. 1964. V. 121. № 2. P. 404–427.
12. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
13. Крейер В.Г., Руденская Г.Н., Ландау Н.С., Покровская С.С., Степанов В.М., Егоров Н.С. // Биохимия. 1983. Т. 48. № 8. С. 1365–1373.
14. Thronton D.J., Carlstadt I., Sheehan J.K. // Mol. Biotechnol. 1996. V. 5. № 2. P. 171–176.
15. Zhang Y., Fu Y., Zhou S., Kang L., Li C. // Anal. Biochem. 2013. V. 437. № 1. P. 46–48.
16. Ao X.L., Yu X., Wu D.T., Li C., Zhang T., Liu S.L., Chen S.J., He L., Zhou K., Zou L.K. // AMB Exp. 2018. V. 8. № 1. P. 1–10.
17. Ferreira C.M.O., Correia P.C., Brandão-Costa R.M.P., Albuquerque W.W.C., Lin Liu T.P.S., Campos-Takaki G.M., Porto A.L.F. // Biomed. Chromatogr. 2017. V. 31. № 5. P. e3882.

## Properties of a Highly Active Extracellular Proteins for Fibrillary Proteins Produced by Micromycete *Aspergillus ustus* 1

E. A. Popova<sup>a</sup>, V. G. Kreyer<sup>a</sup>, S. K. Komarevtsev<sup>b</sup>, S. V. Shabunin<sup>b</sup>, and A. A. Osmolovskiy<sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup>Faculty of Biology, Moscow State University M.V. Lomonosov, Moscow, 119234 Russia

<sup>b</sup>Federal State Budgetary Scientific Institution “All-Russian Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy”, Voronezh, 394087 Russia

\*e-mail: aosmol@mail.ru

A new non-glycosylated serine proteinase capable of hydrolysis of collagen, elastin, and fibrin was isolated from a complex preparation of proteins formed by *A. ustus* 1 micromycete under solid-phase cultivation conditions. The enzyme had a molecular weight of 33 kDa and a *pI* of 4.6. Also, the pH-optimum (6.0) and temperature optimum (41°C) of the work of this proteinase were determined.

**Keywords:** enzymes highly active in relation to fibrillar proteins, collagenolytic enzymes, proteinases of micromycetes



УДК 582.28; 577.112

## ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕКТИНА *Fusarium solani* 4

© 2021 г. Рин. С. Мухаммадиев<sup>1, \*</sup>, Риш. С. Мухаммадиев<sup>1</sup>, Е. В. Скворцов<sup>1</sup>,  
Л. Р. Валиуллин<sup>1</sup>, А. П. Глинушкин<sup>2</sup>, Т. В. Багаева<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань, 420075 Россия

<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии,  
Московская обл., Одинцовский район, Одинцово, 143050 Россия

<sup>3</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

\*e-mail: tanirtashir@mail.ru

Поступила в редакцию 02.11.2020 г.

После доработки 02.11.2020 г.

Принята к публикации 02.11.2020 г.

Из мицелия микроскопического гриба *Fusarium solani* 4 выделен и очищен электрофоретически гомогенный лектин с удельной активностью 100.0 ед./мг белка. Определена молекулярная масса нативной молекулы лектина, равная 38 кДа, и установлено, что он состоит из двух идентичных субъединиц, молекулярная масса которых, определенная методом электрофореза в ПААГ в присутствии ДДС-На, равнялась 19 кДа. Изучены физико-химические свойства и углеводная специфичность лектина, а также его влияние на раковые клетки млекопитающих *in vitro*. Полученные результаты открывают перспективы дальнейшего изучения лектина и его применения как потенциального средства медицинского назначения.

**Ключевые слова:** лектин, *Fusarium solani* 4, выделение, очистка, свойства белка

**DOI:** 10.31857/S0555109921020094

Лектины представляют собой моно- и поливалентную группу белков или гликопротеинов, способных с высокой специфичностью распознавать и обратимо связывать определенные углеводные структуры, не подвергая их химической модификации [1, 2]. Это уникальное свойство лектинов делает их бесценным инструментом при решении многих медико-биологических задач, в том числе, при создании противовирусных, антимикробных, противоопухолевых и иммуномодулирующих препаратов, а также для определения групп крови и диагностики различных заболеваний [3–7].

Лектины повсеместно встречаются в природе. Они найдены у различных организмов, включая вирусы, бактерии, актиномицеты, грибы, растения и животные [8]. Лектины участвуют в межклеточных взаимодействиях, в адгезии к клеточной поверхности, регулируют процессы внутриклеточного транспорта и осуществляют контроль роста и дифференциации тканей и органов [3], а также как сигнальные молекулы играют важную роль в формировании ответных реакций к биотическим и абиотическим факторам среды [9, 10]. Однако биологические функции и свойства многих лектинов до сих пор остаются малоизученными.

В последнее время среди значительного количества изучаемых биологических объектов особое

внимание привлекают микроскопические грибы, в частности их способность к синтезу лектинов [11]. Углевод-связывающие белки грибов являются очень интересной в теоретическом и практическом плане группой белков, но к настоящему времени способность синтезировать лектины известна для немногих микромицетов. Установлено, что лектины присутствуют в мицелии и культуральной жидкости таких видов грибов, как *Beauveria bassiana*, *Arthrotrichum oligospora*, *Aspergillus gorakhpurensis*, *Rhizoctonia crocorum* и *Trichophyton rubrum* [12–15]. Имеется небольшое количество данных о способности плесневых грибов рода *Fusarium* к синтезу лектинов [16–18]. В предыдущих работах [19, 20] была изучена способность грибов рода *Fusarium* образовывать мицелиальные лектины, и изучены их некоторые биохимические свойства.

Необходимо отметить, что во многих биологических объектах часто наблюдается образование не одного лектина, а группы лектин-подобных белков или гликопротеинов, имеющих различную структуру и специфичность [8, 21]. Микроскопические грибы не являются исключением, однако для получения гомогенного лектина необходим подбор и выполнение соответствующих условий его выделения и очистки.

Цель работы – выделение, очистка и характеристика лектина микроскопического гриба *Fusarium solani* 4.

## МЕТОДИКА

В работе использованы Трис (“ICN Biomedicals”, США), Сефадексы G-100 и G-75 (“Sigma”, Швеция), D-глюкоза, D-арабиноза, L-арабиноза, L-рамноза, D-ксилоза, L-фукоза, D-манноза, D-рибоза, D-лактоза, D-галактоза, D-маннит, D-фруктоза, D-раффиноза, D-мальтоза, N-ацетил-D-галактозамин, D-глюкуроновая кислота, сахароза, целлобиоза, крахмал, ксилан, хондроитин-6-сульфат, фетуин и фибриноген (“Fluka”, Германия). Все остальные реагенты имели степень чистоты х. ч. и ч. д. а. (“Merck”, Германия, “Sigma”, США и “ПанЭко”, Россия).

**Микроорганизм и условия культивирования.** Объектом исследования служил микроскопический гриб *Fusarium solani* 4, полученный из музея культур микромицетов кафедры биохимии и биотехнологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета. Культивирование штамма микромицета проводили на картофельно-глюкозной среде, содержащий (г/л) картофель 200.0, глюкозу 20.0, с перемешиванием, при 28°C в течение 8 сут [20].

**Выделение и очистка лектина.** Мицелиальный лектин получали на 8 сут культивирования продуцента по методу, описанному в работе Розена с соавт. [12].

Мицелий собирали фильтрованием через стерильную нейлоновую ткань, тщательно промывали стерильной дистиллированной водой, а затем 20 mM Трис-НСl-буфером (pH 7.8). Белки из мицелия микромицета выделяли после гомогенизацией биомассы с помощью механического измельчения в 20 mM Трис-НСl-буфере (pH 7.8) в соотношении 1 : 1. Для более полного извлечения белков, однородную массу оставляли при перемешивании на 6 ч при температуре 4°C, полученный осадок отделяли центрифугированием (13500 g, 20 мин, 4°C). Затем белки осаждали 65%-ным уксусом (об./об.) в течение 1 сут. Осадок отделяли центрифугированием (10000 g, 15 мин, 4°C), растворяли в минимальном объеме 20 mM трис-НСl буфера, pH 7.8, и диализовали против этого же буфера в диализных мешках (“Orange Scientific”, Бельгия) в течение 2 сут при 4°C. Полученный раствор белка использовали для дальнейшего выделения и очистки лектина.

Лектин выделяли из суммы белков с помощью хроматографической системы низкого давления BioLogic LP (“Bio-Rad”, США) на колонках с Phenyl Sepharose High Performance (1 мл), а затем на Bio-Scale™ Mini Macro-Prep High Q (3 мл) и

Сефадексом G-75. Перед нанесением на колонки белки фильтровали через стерильные мембранные фильтры Millex (d 33 мм, d пор 0.45 мкм, полиэтилсульфон, “Merck Millipore”, США).

С первой колонки, содержащей гидрофобный сорбент, связавшийся белки элюировали градиентом концентрации  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  от 1.5 до 0 M в 20 mM Трис-НСl буфере, pH 7.8, со скоростью потока 1.0 мл/мин. Со второго сорбента белки элюировали линейным градиентом NaCl от 0 до 1.0 M со скоростью 3 мл/мин. Элюцию белка при гелефильтрации на Сефадексе G-75 осуществляли 20 mM Трис-НСl буфером, pH 7.8, со скоростью 0.5 мл/мин.

На каждой стадии очистки определяли концентрацию белка методом спектрофотометрии и рассчитывали гемагглютинирующую активность, степень очистки и выход белка.

**Электрофоретический анализ и определение молекулярной массы.** Степень чистоты и молекулярную массу лектина определяли методом электрофореза в 12.5%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях и геле-фильтрацией на колонке Сефадексе G-100.

Одномерный электрофорез в ПААГ с ДДС-На проводили по методу Лэммли [22] в камере Mini-Protean Tetra Vertical Electrophoresis Cell (“Bio-Rad”, США). Окрашивание гелей проводили в растворе нитрата серебра, содержащего 0.4%-ный  $\text{AgNO}_3$ , 0.09%-ный NaOH (об./об.) и 0.2%-ный  $\text{NH}_3$  (об./об.). В качестве маркеров использовали коммерческие наборы белков PageRuler Unstained Protein Ladder (“Fermentas”, Литва) с известной молекулярной массой (10–200 кДа).

Молекулярную массу нативного лектина определяли методом геле-фильтрации на колонке Econo – Column (1.5 × 50 см, “Bio-Rad”, США) с Сефадексом G-100 (диаметр частиц 40–120 мкм), уравновешенной 20 mM Трис-НСl буфером, pH 7.8. В качестве белков-маркеров применяли лизоцим (14 кДа),  $\alpha$ -химотрипсин (26 кДа), пероксидазу (34 кДа) и бычий сывороточный альбумин (70 кДа). Пробы наносили на колонку объемом 1 мл с концентрацией белка 2 мг/мл. Скорость элюции – 0.5 мл/мин.

Сканирование и анализ белковых полос гелей осуществляли на приборе ChemiDoc™ MP Imaging System (“Bio-Rad”, США) с помощью программы Image Lab™ Software.

**Определение температурного и pH-оптимума, углеводной специфичности лектина, влияния ионов металлов на активность.** Определение осуществляли согласно методу Сингха с соавт. [23].

Для определения pH-оптимума активности лектина осуществляли инкубацию его в различных буферных растворах при значениях pH от 3.0 до 11.0 в течение часа при 20°C, после чего анали-

зировали активность лектина реакцией прямой гемагглютинации.

Для определения температурного оптимума активности лектина проводили инкубацию его в исходном буферном растворе в интервале от 10 до 90°C в течение 20 мин, после чего анализировали активность белка реакцией прямой гемагглютинации.

Действие ионов металлов на активность лектина устанавливали после взаимодействия с различными солями металлами. В качестве солей металлов были использованы от 1.25 до 20 мМ CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, AlCl<sub>3</sub>, FeCl<sub>3</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub> и CoCl<sub>2</sub>.

Углеводную специфичность лектина устанавливали методом ингибирования реакции гемагглютинации по взаимодействию с моно- и полисахаридами в концентрациях 300 мМ и 5 мг/мл соответственно.

**Определение цитотоксической активности лектина.** Оценку проводили по выживаемости различных культур клеток с помощью МТТ-теста в соответствии с ранее описанной методикой [24]. Клеточные линии клеток рака печени (HEPG2, ATCC® HB-8065™), молочной железы (MCF-7, ATCC® HTB-22™) и простаты человека (PC-3, ATCC® CRL-1435™) были предоставлены из коллекции культур клеток Научно-образовательного центра фармацевтики (Казань, Россия).

Цитотоксичность лектина при воздействии на клетки в условиях *in vitro* выражали значениями IC<sub>50</sub> (наименьшая ингибирующая концентрация, мкг/мл) лектина, которая способна вызывать 50%-ное подавление роста популяции клеток изучаемой культуры. В качестве контроля использовали клетки, выдержанные без добавления лектина.

**Определение гемагглютинирующей активности лектина.** Активность лектина определяли реакцией прямой гемагглютинации с нативными эритроцитами человека группы крови 0 (I). В работе использовали 2%-ную суспензию эритроцитов (об./об.), полученную по методу Лулика с соавт. [8].

Статистическую обработку данных проводили с применением программного обеспечения Microsoft Office Excel 2013. Для определения средней арифметической и ее средней ошибки использовали данные трех независимых экспериментов. Нормальность распределения выборок устанавливали по критерию Шапиро–Уилка. Достоверность различий между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента для независимых переменных. Достоверно отличными считали результаты при  $p < 0.05$ . Величину IC<sub>50</sub> определяли на основе дозозависимых кривых с применением программы Origin™.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время не существует универсальных методов выделения и очистки лектинов. Основная причина этого заключается в их структурно-функциональной гетерогенности и нестабильности при воздействии факторов внешней среды [11, 21]. Для получения гомогенного лектина из микромицета *F. solani* 4 была использована 5-стадийная очистка, результаты которой представлены в табл. 1.

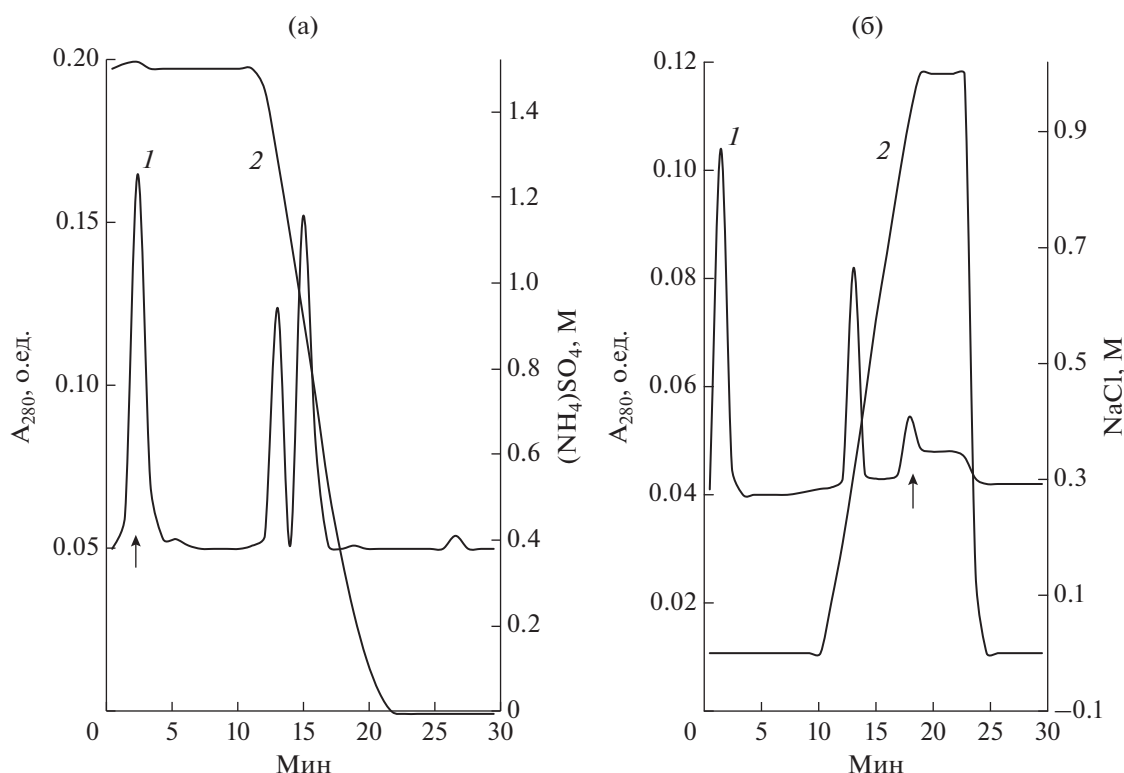
Из мицелия *F. solani* 4 экстрагировали белки гомогенизацией биомассы путем механического измельчения ее в 20 мМ Трис-НСl буфере (рН 7.8). Первоначально их осаждали из экстракта 65%-ным сульфатом аммония. Однако при их осаждении ацетоном выход лектина оказался выше и составил 105.3%, а степень очистки повышалась в 1.9 раза. В связи с этим в дальнейшем белки осаждали только ацетоном.

Далее очистку лектина *F. solani* 4 осуществляли гидрофобной хроматографией (рис. 1а). Компоненты, обладающие лектиновой активностью, объединяли, определяли в них содержание белка и рассчитывали удельную гемагглютинирующую активность.

Поиск необходимого сорбента для очистки полученного белкового компонента показал, что наибольший его выход и чистоту удавалось получить при использовании анионообменного сорбента High Q (рис. 1б). При элюции градиентом NaCl белки, связавшиеся с этим сорбентом, разделялись на отдельные компоненты. Исследование их гемагглютинирующей активности показало, что только компоненты, содержащиеся во фракциях 18 и 19, можно было отнести к лектинам. После ионообменной хроматографии этот лектин имел достаточно высокую степень очистки по сравнению с исходным компонентом, а общий выход лектина составил 54.6%.

Учитывая, что использованные методы и приемы позволили лишь частично очистить лектин *F. solani* 4, на последнем этапе для его очистки применили гель-фильтрацию на Сефадексе G-75. В результате этого удалось полностью очистить лектин от балластных белков.

Таким образом, разработанная схема очистки агглютинина микромицета *F. solani* 4 позволила получить хроматографически очищенный лектин со степенью очистки 83.3 раз и выходом 21.9%. Следует отметить, что для успешной хроматографии лектина *F. solani* 4 имел значение выбор рН буферного раствора. Наиболее эффективно он сорбировался на сорбентах при слабощелочных значениях рН 7.6–8.0. Для агглютинина, выделенного и очищенного из мицелия другого штамма *F. solani*, наиболее эффективно связывание белка с сорбентом также происходило при слабощелочных рН (8.0) [16]. Однако предложенный в этой



**Рис. 1.** Хроматография белков *Fusarium solani* 4, полученная с помощью гидрофобной хроматографии на Phenyl Sepharose High Performance (а) и ионообменной хроматографии на Bio-Scale™ Mini Macro-Prep High Q (б). 1 – белок; 2 – градиент  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (а) или NaCl (б). Стрелкой указан белковый пик лектина.

работе способ выделения и очистки агглютинина отличался от разработанной в данной работе схемы его получения. Так, в предложенной в работе [16] в схеме очистки отсутствовал этап ионообменной хроматографии.

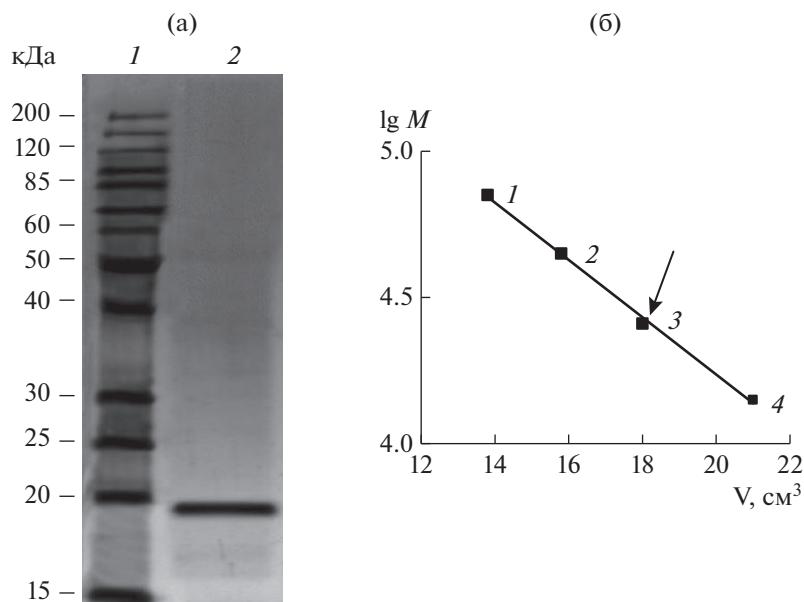
Высокая степень очистки выделенного белка-лектина *F. solani* 4 была подтверждена присутствием только одного компонента на электрофореграмме, полученной методом ДДС-Na-ПААГ-электрофореза. Удельная активность выделенного и очищенного лектина составила 100.0 U/мг белка. Расчет

показал, что из 1 г сухой массы мицелия можно получить 4.5 мкг/мл очищенного белка.

Применение стандартных белков-маркеров с молекулярной массой 15–200 кДа позволило определить, что в денатурирующих условиях с ДДС-Na при электрофорезе в ПААГ молекулярная масса лектина микромицета *F. solani* 4 составила 19.0 кДа (рис. 2а). Однако определение молекулярной массы лектина в нативных условиях методом гель-фильтрации на Сефадексе G-100 показало, что белок *F. solani* 4 имел молекулярный

**Таблица 1.** Выделение и очистка лектина из мицелия *F. solani* 4

Стадия очистки	Объем, мл	Белок, мг/мл	Общий белок, мг	Титр ГА	Общая ГА, ед.	Удельная ГА, ед./мг	Степень очистки	Выход %
Исходный экстракт	5.7	6.8	38.8	8	45.6	1.2	1	100
Фракционирование ацетоном и диализ	3.0	7.2	21.6	16	48.0	2.2	1.9	105.3
Гидрофобная хроматография	2.0	4.8	9.6	16	32.0	3.3	2.8	70.2
Ионообменная хроматография High Q	3.0	0.13	0.4	4	12.0	30.8	25.6	54.6
Гель-фильтрация на сефадексе G-75	2.5	0.04	0.1	4	10.0	100.0	83.3	21.9



**Рис. 2.** Электрофореграмма лектина микроицета *F. solani* 4 после очистки ионообменной хроматографией на High Q и гель-фильтрации на Сефадексе G-75 (а) и окраски нитратом серебра (2), белки-маркеры молекулярной массы (1); зависимость логарифма молекулярной массы белков-маркеров от объема их элюирования (V) при гель-фильтрации на Сефадексе G-100 (б): белки-маркеры (кДа): бычий сывороточный альбумин (70, 1), овалбумин (45, 2), α-химотрипсин (26, 3), лизоцим (14, 4), объем элюции лектина отмечен стрелкой.

вес 38.0 кДа (рис. 2б). Это позволило предположить, что лектин представлял собой димер и состоял из двух идентичных субъединиц, каждая из которых имела молекулярную массу 19.0 кДа. Данная молекулярная масса лектина близка по размеру к агглютиниnam микроицетов *Athelia rolfii*, *Arthrotrichy oligospora*, *Neurospora sitophila* (36–40 кДа), для которых также было характерно гомодимерное строение белка [12, 13, 25].

Получение лектина микроскопического гриба *F. solani* 4 в высокоочищенном гомогенном состоянии позволило исследовать его физико-химические свойства и биологическую активность.

Было установлено, что белок оставался полностью стабильным в диапазоне температур от 10 до 60°C. В связи с этим рН-оптимум активности лектина *F. solani* 4 устанавливали при 20°C. Для этого лектин инкубировали в течение 1 ч в различных буферных растворах, значения рН которых варьировали от 3.0 до 11.0.

Изучение влияния температуры и рН на активность лектина микроицета *F. solani* 4 показало, что он оказался термостабильным и щелочеустойчивым, поскольку обладал устойчивостью в широком интервале температур (10–60°C) и проявлял максимальную активность преимущественно при щелочных значениях рН (рН 6.5–8.5).

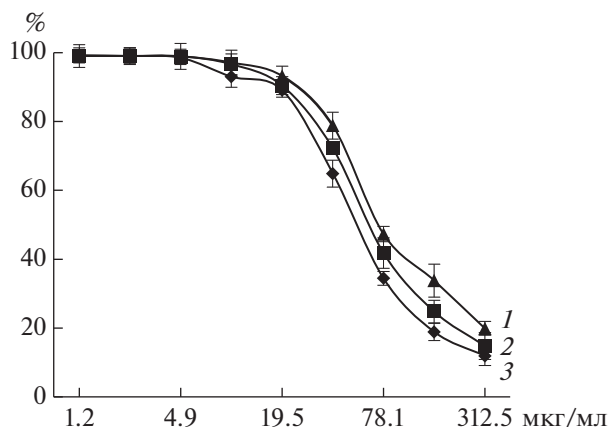
Полученные результаты согласовывались с данными, приведенными в работах [11, 26], в которых показано, что лектины микроскопических грибов могут функционировать в широком ин-

тервале температур и значений рН и сохранять активность в пределах температур от 5 до 100°C и рН от 1.5 до 12.5.

Проверка влияния широкого спектра ионов металлов на активность лектина *F. solani* 4 показала независимость гемагглютинирующей активности от их присутствия. Можно предположить, что это указывает на отсутствие ионов металлов в активном центре связывания углеводов. Для большинства лектинов микроицетов наличие ионов металлов в их составе не является строго необходимым [11].

Характеризуя агглютинин из мицелия микроицета *F. solani* 4, было интересно определить его специфичность к определенным углеводам, поскольку именно это уникальное свойство служит основой классификации лектинов и делает их перспективными инструментами для решения многих медико-биологических задач [27].

В результате проведенных исследований удалось определить, что вызванная лектином *F. solani* 4 гемагглютинация не отменялась большинством использованных в экспериментах моно- и полисахаридов. Однако оказалось, что он проявлял сродство к N-ацетилнейраминовой и N-гликолилнейраминовой кислотам (с минимальной ингибирующей концентрацией 150 и 37.5 мМ соответственно). Эта уникальная специфичность лектина фузариума к сиаловым кислотам свойственна и для лектинов животного происхождения, которые относят к так называемым “иммуноглобулин-подоб-



**Рис. 3.** Влияние лектина *F. solani* 4 на линии раковых клеток простаты РС-3 (1), молочной железы МСF-7 (2) и печени НЕРG2 (3) человека.

ным сиало-связывающим лектинам” (Sialic acid-binding Ig-like lectins) [28]. Лектин также распознавал и связывался с углеводными детерминантами фибриногена и фетуина (минимальная ингибирующая концентрация — 0.08 и 0.01 мг/мл). Взаимодействие лектина с данными углеводами открывает перспективы применения его в таких важных областях как иммунология, онкология и медицина, а также для диагностики и терапии различных заболеваний [21, 28–30].

Была проведена оценка лектина *F. solani* 4 в качестве потенциального противоопухолевого агента на линиях раковых клеток печени (НЕРG2), молочной железы (МСF-7) и простаты человека (РС-3). Установлено, что он ингибировал рост всех клеток изучаемых культур, но особенно был активен по отношению к клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы человека НЕРG2, для которой величина  $IC_{50}$  соответствовала концентрации  $53.61 \pm 2.3$  мкг/мл (рис. 3). Величина  $IC_{50}$  для линий опухолевых клеток простаты (РС-3) и молочной железы (МСF-7) составляла  $65.19 \pm 2.5$  и  $74.62 \pm 3.6$  мкг/мл соответственно.

Можно предположить, что неодинаковая чувствительность к лектину разных клеточных линий опухолевых клеток зависит от типичного набора углеводов на поверхности их клеточной мембраны, который и является как одним из решающих факторов при взаимодействии клеток с белком, так и определяющим дальнейшую их гибель. Следует отметить, что имеется немало количество публикаций, подтверждающее данное предположение [29–33]. Это свойство является биологическим основанием для дальнейшего изучения лектина в качестве возможного противоопухолевого агента.

Таким образом, в результате многостадийной очистки из мицелия микромицета *F. solani* 4 был получен электрофоретически гомогенный лек-

тин. Были изучены его физико-химические свойства. Установлено, что лектин представлял собой гомодимер, состоящий из двух идентичных субъединиц. Он обладал повышенным сродством к сиаловым кислотам по сравнению с гликопротеинами фетуином и фибриногеном. Лектин микроскопического гриба проявлял дозозависимое токсическое действие по отношению к линии раковых клеток печени (НЕРG2), простаты (РС-3) и молочной железы (МСF-7). Его уникальная углеводная специфичность и биологическая активность открывает перспективы для дальнейшего изучения в качестве значимого препарата медицинского назначения.

Работа выполнена при финансовой поддержке 8 конкурса “Пятьдесят лучших инновационных идей для Республики Татарстан” и программы “Участник молодежного научно-инновационного конкурса” (проект 11717р/17263).

Авторы выражают благодарность А.А. Набатову (кафедра биохимии и клинической лабораторной диагностики Казанской государственной медицинской академии) за помощь и полезные советы в аналитических экспериментах.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kocourek J., Horejsi V. // in Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. / Eds. T.C. Bog-Hansen and G.A. Spengler, Berlin: Walter de Gruyter, 1983. V. 3. P. 3–6.
2. Singh R.S., Tiwary A.K., Kennedy J.F. // Crit. Rev. Biotechnol. 1999. V. 19. № 2. P. 145–178.
3. Goldstein I.J., Poretz R.D., Liener I.E., Sharon N. // In Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. / Eds. I.E. Liener, N. Sharon, I.J. Goldstein. N.Y.: Academic Press, 1986. P. 33–247.
4. Kanska G. // Int. J. Med. Mushrooms. 2006. V. 8. № 11. P. 19–30.
5. Movafagh A., Ghanati K., Amani D., Mahdavi S.M., Hashemi M., Abdolahi D.Z. et al. // J. Paramed. Sci. 2013. V. 4. P. 1–16.
6. Lagarda-Diaz I., Guzman-Partida A.M., Vazquez-Moreno L. // Int. J. Mol. Sci. V. 18. № 6. P. 1242–1260.
7. Hamid R., Masood A., Wani I.H., Rafiq S. // J. Appl. Pharm. Sci. V. 3. № 6. Suppl 1. P. S93–S103.
8. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. Львов: Вища школа, 1981. 152 с.
9. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем, 2001. 160 с.
10. Larroque M., Ramirez D., Lafitte C., Borderies G., Dumas B., Gaulin E. // Protein Expr. Purif. 2011. V. 80. № 2. P. 217–223.
11. Khan F., Khan M.I. // Int. J. Biol. Chem. 2011. V. 5. № 1. P. 1–20.

12. Rosen S., Ek B., Rask I., Tunlid A. // J. Gen. Microbiol. 1992. V. 138. № 12. P. 2663–2672.
13. Kellens J.T., Allen A.K., Peumans W.J. // J. Gen. Microbiol. 1989. № 1. V. 135. P. 3127–3132.
14. Kossowska B., Zarawska E.L., Olczak M., Katnik-Prastowska I. // Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 1999. V. 123. № 1. P. 23–31.
15. Bhowal J.M., Banerjee S., Sikdar S., Guha A.K., Chatterjee B.P. // Ind. J. Biochem. Bio. 2004. V. 41. № 2. P. 81–88.
16. Khan F., Ahmad A., Khan M.I. // Arch. Biochem. Biophys. 2007. V. 457. № 2. P. 243–251.
17. Singh R.S., Thakur S. // Biologia. 2014. V. 69. P. 1295–1302.
18. Bhari R., Kaur B., Singh R.S. // Braz. J. Microbiol. 2016. V. 47. № 3. P. 775–780.
19. Мухаммадиев Р.С., Мухаммадиев Р.С., Валиуллин Л.Р., Багаева Т.В. // Ветеринарный врач. 2018. Т 1. № 1. С. 10–14.
20. Багаева Т.В., Мухаммадиев Риш.С., Мухаммадиев Рин. С., Алимова Ф.К. // Микология и фитопатология. 2014. Т. 48. № 2. С. 107–111.
21. Подгорский В.С., Коваленко Э.А., Карпова И.С., Сащук Е.В., Гетьман Е.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. № 3. С. 256–263.
22. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 77. № 4. P. 680–683.
23. Singh R.S., Kaur H.P., Kumar P., Kaur H. // Biologia. 2013. V. 68. № 6. P. 1034–1040.
24. Мухаммадиев Рин.С., Мухаммадиев Риш.С., Бирюля В.В., Идиятов И.И., Набатов А.А., Глинушкин А.П., Валиуллин Л.Р. // Сибирский онкологический журн. 2019. Т. 18. № 6. С. 90–95.
25. Ishikawa F., Oishi K. // Agr. Biol. Chem. 1989. V. 53. № 7. P. 1769–1776.
26. Singh R.S., Kaur R. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2015. V. 175. № 3. P. 1938–1947.
27. Sharon N., Lis H. Lectins. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. 440 p.
28. Han J.W., Jung M.G., Shim E.Y., Shim J.B., Kim Y.M., Kim G.H. // Mar. Drugs. 2015. V. 13. № 4. P. 2183–2195.
29. Mody R., Joshi S., Chaney W. // J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 1995. V. 33. № 1. P. 1–10.
30. Zhou R., Han Y., Zhang M., Zhang K., Ng T.B., Liu F. // AMB Express. 2017. V. 7. № 1. P. 47–55.
31. Catanzaro E., Cinzia C., Bishayee A., Fimognari C. // Mar. Drugs. 2020. № 1. V. 18. P. 11–16.
32. Yau T., Dan X., C.C. Ng, T.B. Ng // Molecules. 2015. V. 20. № 3. P. 3791–3810.
33. Audfray A., Beldjoudi M., Breiman A., Hurbin A., Boos I., Unverzagt C., Bouras M., Lantuejoul S., Coll J.L., Varrot A., Le Pendu J., Busser B., Imberty A. // PLoS One. 2015. V. 10. № 6. e0128190.

## Isolation, Purification and Characterization of a Lectin from Fungus *Fusarium solani* 4

R. S. Mukhammadiev<sup>a,\*</sup>, R. S. Mukhammadiev<sup>a</sup>, E. V. Skvortsov<sup>a</sup>,  
L. R. Valiullin<sup>a</sup>, A. P. Glinushkin<sup>b</sup>, and T. V. Bagaeva<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, 420075 Russia

<sup>b</sup>All-Russia Research Institute of Phytopatology, Moscow Region, Odintsovo, 143050 Russia

<sup>c</sup>Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

\*e-mail: tanirtashir@mail.ru

Electrophoretically homogeneous lectin with specific activity of 100.0 U/mg protein was isolated and purified from fungal mycelium of *Fusarium solani* 4. The molecular weight of the native lectin molecule (38 kDa) was determined. It is established consists of two identical subunits, with the molecular mass determined by PAGE-Na electrophoresis in the presence of DDS-Na equal to 19 kDa. The physicochemical properties and carbohydrate specificity of the lectin, as well as its *in vitro* effect on mammalian cancer cells were studied. The results obtained open prospects for further study of lectin and its potential applications as a medical agent.

**Keywords:** lectin, *Fusarium solani*, purification, structure, properties of proteins

УДК 582.284.51:577.115

## ПАТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА И ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ МИЦЕЛИЯ В ПРОЦЕССЕ РОСТА ГЛУБИННОЙ КУЛЬТУРЫ ГРИБА *Stagonospora cirsii* ВИЗР 1.41

© 2021 г. Г. М. Фролова<sup>1</sup>, Е. Р. Котлова<sup>2</sup>, С. В. Сокорнова<sup>1</sup>, С. В. Сеник<sup>2</sup>,  
А. Л. Шаварда<sup>2</sup>, А. Д. Мишарев<sup>3</sup>, А. О. Берестецкий<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Пушкин, 196608 Россия

<sup>2</sup>Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, 197376 Россия

<sup>3</sup>Ресурсный центр “Методы анализа состава вещества” Санкт-Петербургского государственного университета, Петергоф, 198504 Россия

\*e-mail: aberestetskiy@vizr.spb.ru

Поступила в редакцию 11.09.2020 г.

После доработки 30.10.2020 г.

Принята к публикации 02.11.2020 г.

Для идентификации маркеров качества потенциального микогербицида против бодяка полевого (*Cirsium arvense*) на основе мицелия гриба *Stagonospora cirsii* ВИЗР 1.41 проанализированы изменения его патогенности и липидного профиля в процессе глубинного культивирования. Определены жирнокислотный состав и молекулярные виды доминирующих липидов. Показано, что липидный состав мицелия в процессе роста *S. cirsii* существенно меняется вместе с изменением его патогенных свойств. Наиболее патогенный мицелий (в фазе экспоненциального роста) характеризовался относительно максимальным содержанием таких структурных липидов, как фосфатидилхолины (ФХ), фосфатидилэтаноламины (ФЭ) и эргостерин. С возрастом культуры и со снижением патогенности мицелия их содержание в биомассе также снижалось. В начале стационарной фазы роста *S. cirsii* наблюдали максимальную концентрацию липидов, среди которых преобладали триацилглицериды. Установлено, что при старении мицелия снижался индекс двойных связей жирных кислот в составе глицеролипидов, а также происходила замена молекулярных форм ФХ (34:2 на 36:4) и ФЭ (36:4 на 34:2). Можно предположить, что маркерами качества мицелия *S. cirsii* могут служить высокий уровень эргостерина, триацилглицеридов, фосфатидилхолинов (в частности, 34:2-форм) и фосфатидилэтаноламинов (36:4-форм).

**Ключевые слова:** *Stagonospora cirsii*, микогербицид, липиды, молекулярные формы, патогенность

**DOI:** 10.31857/S0555109921020033

Липидный состав грибов – возбудителей заболеваний различных организмов, может быть связан с их вирулентными свойствами, такими как адгезия, инвазивность, развитие, персистенность [1]. Так, в мицелии и спорах микромицетов (например, фитопатогенных, энтомопатогенных и микоризообразующих) часто встречаются липидные включения [2–4]. Накапливающиеся в них триацилглицериды (ТАГ) служат не только резервным источником энергии для успешной колонизации хозяина, но и обеспечивают молекулярное разнообразие фосфолипидов в процессе ремоделинга [5, 6]. В инфекционный процесс вовлечены мембранные липиды различных классов, обеспечивая взаимодействие патогена и хозяина [1, 7]. Этот процесс также зависит от фосфолипидного гомеостаза в клетках грибного патогена, в частности, концентрации и соотношения фосфатидилхо-

линов (ФХ) и фосфатидилэтаноламинов (ФЭ) [8–10], а также содержания эргостерина (ЭС) [11] и сфинголипидов, в особенности, гликоцерамидов (ГлЦер) [12, 13]. Несмотря на то, что липидный состав грибов, включая фитопатогенные виды, изучается достаточно давно [14], его роль во взаимоотношениях микромицетов с растениями исследована недостаточно [15].

В нашей работе [16] было изучено влияние источников азота различной природы на патогенность и липидный состав мицелия гриба *Stagonospora cirsii* J.J. Davis – перспективного для биологической борьбы с бодяком полевым (*Cirsium arvense*). Было сделано предположение, что повышенное содержание в его мицелии стеринов, свободных жирных кислот (ЖК) и определенных ГлЦер в экспоненциальной фазе роста *S. cirsii* может иметь связь с высоким уровнем патогенности этого мик-



ромицета при глубинном культивировании на среде с органическим источником азота [16]. В другой работе [17] было показано, что патогенные свойства мицелия *S. cirsii* существенно зависят также от возраста культуры. Учитывая, что липидный состав грибов меняется с возрастом культуры [14], представляется интересным изучение такой связи и на примере *S. cirsii*, что может быть полезным для выявления биохимических критериев качества микогербицида на его основе.

Цель работы — определение патогенности и липидного профиля мицелия *S. cirsii* в процессе роста глубинной культуры, а также анализ изменений ЖК-состава и молекулярных видов основных липидов.

**Объект исследований.** В работе использовали штамм ВИЗР 1.41 гриба *S. cirsii* из коллекции микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений. Глубинный мицелий *S. cirsii* получали на жидкой сахарозо-соевой среде (СС) по описанной ранее методике [16]. Мицелий собирали в середине экспоненциальной, в начале и конце стационарной фаз роста (на 3, 6 и 9 сут соответственно) и тщательно промывали от остатков питательной среды дистиллированной водой. Прижизненную окраску липидных включений в мицелии *S. cirsii* проводили суданом черным [18]. Препараты исследовали при помощи микроскопа DM2500 с фотокамерой DFC420 (“Leica”, Германия) при 60-кратном увеличении.

Патогенность мицелия *S. cirsii* оценивали по разработанной ранее лабораторной методике [17]. Дополнительно определяли период эпифитного роста инфекционных гиф до момента внедрения в ткань листа через кутикулу. Для этого листовые высежки через 4, 5, 6, 7, 8, 12 и 24 ч после инокуляции мицелием гриба фиксировали в растворе Карнуа, окрашивали анилиновым синим и анализировали под микроскопом при 400-кратном увеличении [18].

**Выделение и анализ липидов.** Липиды экстрагировали из высушенного при комнатной температуре мицелия стандартным методом Фолча, как описано ранее [16]. В экстракте определяли содержание нейтральных липидов (НЛ), сфинголипидов (СЛ) и фосфолипидов (ФЛ) [16]. Для извлечения полярных липидов (ПЛ) из влажного мицелия и последующего их анализа использовали модифицированный для грибов метод Николса [19].

Липиды анализировали методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) с использованием оборудования фирмы “Samag” (Швейцария), включающим автоматический аппликатор (Sampler 4), хроматографическую камеру (ADC 2), спектроденситометр (Scanner 4) и программное обеспечение winCATS. Пластины,

размером 20 × 10 см, для ВЭТСХ (HPTLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, “Merck”, Германия) предварительно промывали смесью СНCl<sub>3</sub>-MeOH (1 : 1, об./об.) и активировали при 120°C в течение 20 мин. На одной пластине анализировали до 20 проб. Объем наносимого экстракта составлял 10 мкл (при концентрации 2 мг/мл), ширина полос нанесения — 6 мм. Хроматографическое разделение НЛ осуществляли как описано в работе [20] в режиме трех-шагового элюирования в системах: хлороформ-метанол-аммиак-бензол (65 : 30 : 6 : 10, об./об.) — 2 см от старта; гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота (70 : 30 : 1, об./об.) — 7 см от старта; гексан-диэтиловый эфир (97 : 3, об./об.) — 8 см от старта. Для разделения ПЛ использовали оптимизированный равномерный 12-ступенчатый градиент метанол-дихлорметан от 65 : 35 до 10 : 90 (об./об.) в атмосфере 1 н NH<sub>4</sub>OH [16]. Полученные данные сопоставляли с результатами разделения ПЛ общепринятым методом двухмерной ТСХ на пластинах TLC Silica gel 60 (“Merck”, Германия), размером 10x10 см, в системах растворителей: хлороформ-метанол-вода (65 : 25 : 4, об./об.) — в первом направлении; хлороформ-ацетон-метанол-уксусная кислота-вода (50 : 20 : 10 : 10 : 5, об./об.) — во втором направлении [21].

Разделенные методом одномерной ТСХ липиды визуализировали реагентом (20 г CuSO<sub>4</sub>, 200 мл метанола, 8 мл H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и 8 мл H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) и последующим нагреванием пластин 5 мин при 175°C. Липиды детектировали на спектроденситометре при 550 нм в режиме поглощения. Соотношение липидов определяли по площади пиков в программе winCATS. После проведения двухмерной ТСХ липиды визуализировали обработкой пластин 5%-ым раствором серной кислоты в метаноле с последующим нагреванием. Количественное определение различных ФЛ и СЛ выполняли с помощью денситометра Денскан и программы DENS-14-12-03 (“Ленхром”, Россия).

Индивидуальные классы липидов определяли по величине R<sub>f</sub> после сравнения со стандартными образцами ТАГ, 1,2-диацилглицеринов, 1,3-диацилглицеринов, ЭС, ФЭ, ФХ, ФС, фосфатидилинозитов (ФИ) (“Sigma”, США) и смеси цереброзидов бычьего мозга (“Larodan”, Швеция). Для их идентификации проводили реакции со специфическими реагентами на отдельные функциональные группы, включающие резорцин в метаноле для определения гликолипидов, реактив Васьяковского и Латышева для — ФЛ, раствор нингидрина в ацетоне для липидов, содержащих первичные аминогруппы, и реактив Драгендорфа для липидов, имеющих триметиламонийные группы. Концентрации рассчитывали с использованием калибровочных кривых, построенных по внешнему стандарту. Для этого на хроматографи-

ческие пластины, помимо исследуемых образцов, наносили стандартные растворы липидов в двух концентрациях.

**Определение жирнокислотного состава.** Препаративное выделение НЛ осуществляли на пластине размером  $20 \times 10$  см (TLC Silica gel 60, "Merk", Германия) в системе гексан–диэтиловый эфир–уксусная кислота (70 : 30 : 1 об./об.), ПЛ – методом двумерной ТСХ как было описано выше. Пластины проявляли с помощью паров йода. Состав ЖК индивидуальных глицеролипидов определяли после их гидролиза 2.5%-ной  $H_2SO_4$  в метаноле в течение 2 ч при  $70^\circ C$ . Отдельные структурные типы стеринов анализировали после дериватизации методом исчерпывающего силилирования. Для этого к растворенному в ацетонитриле сухому остатку общего экстракта липидов добавляли N,O-бис-(триметилсилил)-трифторацетамид и растворенный в пиридине трикозан ( $nC_{23}$ ) в качестве внутреннего стандарта. Смесь встряхивали на вортексе в течение 10 мин, а затем нагревали 15 мин при  $100^\circ C$ . Полученные производные ЖК и стеринов анализировали методом газовой хромато-масс-спектрометрии на хроматографе Maestro с масс-селективным детектором 5975C ("Agilent", США). Для анализа метиловых эфиров ЖК (МЭЖК) использовали капиллярную колонку OmegaWax 250 ("Supelco", США) длиной 30 м, внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0.25 мкм, для анализа парастеринов – колонку HP-5MS с аналогичными параметрами. Хроматографическое разделение МЭЖК проводили в режиме линейного изменения температуры термостата от  $170$  до  $220^\circ C$ , стеринов – от  $70$  до  $320^\circ C$  со скоростью  $6^\circ C/мин$ . Скорость газа-носителя (гелия) составляла 1 мл/мин, температура испарителя –  $250^\circ C$ , температура детектора –  $250^\circ C$ . Сбор данных проводили с помощью программного обеспечения ChemStation ("Agilent", США). Обработку и интерпретацию масс-спектрометрической информации осуществляли с использованием программы AMDIS (<https://www.amdis.net>) и библиотеки NIST2005 (<https://chemdata.nist.gov>).

**Анализ молекулярных видов.** Молекулярные виды ФХ и ФЭ определяли с использованием времяпролетного масс-спектрометра MicrOTOF 10223 ("Bruker", Германия). Липиды извлекали с пластин при помощи полуавтоматического экстрактора TLC-MS Interface ("Camag", Швейцария) смесью изопропанол–метанол–вода (5 : 3 : 2, об./об.) в 0.1%-ном аммиаке для детектирования отрицательно заряженных ионов и метанолом в 0.1%-ной муравьиной кислоте для анализа положительно заряженных ионов. Скорость подачи элюентов (70 мкл/мин) контролировали насосом System Gold 125 HPLC ("Beckman Coulter Inc.", США). Спектры записывали при ионизации рас-

пылением в электрическом поле в режиме положительных и отрицательных ионов в диапазоне  $150$ – $3000 m/z$ , температуре источника ионов  $40^\circ C$  и капиллярном напряжении 3.5 кВ.

Молекулярные виды ГлЦер определяли с использованием времяпролетного масс-спектрометра высокого разрешения MX5310 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) с ортогональным вводом и электрораспылительным источником ионов. Образцы растворяли в смеси метанол–ацетонитрил–муравьиная кислота (49 : 49 : 2, об./об.). Объем пробы составлял 10–50 мкл при скорости подачи 1–5 мкл/мин. Распыляющий потенциал на капилляре составлял 3.3 кВ, температура десольвирующего газа  $50^\circ C$ . Спектры получали в режиме положительных ионов в диапазоне  $150$ – $1500 m/z$ .

**Статистическая обработка результатов.** Статистическую обработку данных проводили стандартными методами с помощью программы Statistica 8.0 ("StatSoft", США). Исследование состава и содержания индивидуальных классов липидов, а также анализ их ЖК проводили в 3-кратной биологической повторности. За биологическую повторность принята глубинная культура *S. cirsii*, выращенная в стандартных условиях в одной колбе в одном независимом эксперименте. Данные, полученные после статистической обработки результатов в независимых экспериментах, представлены в виде  $M \pm \sigma$ , где  $M$  – среднее арифметическое,  $\sigma$  – его стандартное отклонение. Анализ молекулярных видов ФХ и ФЭ проведен в одном независимом эксперименте в 2–3 аналитических повторностях. Достоверность различий в составе и содержании липидов культуры разного возраста оценивали по критерию Стьюдента либо по критерию наименьшей существенной разности (НСР) при  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Физиологические особенности, патогенность и липидный состав.** В глубинной культуре на среде СС гриб *S. cirsii* образовывал мелкие, диаметром ~5 мм розовато-кремовые пеллеты. Меланизация гиф начиналась на 6 сут и достигала максимума на 9 сут роста *S. cirsii*. Как было показано ранее [16, 17] и в табл. 1, на 3 сут культивирования на среде СС гриб находился в фазе экспоненциального роста, начало стационарной фазы наблюдали на 6 сут, а на 9 сут – ее завершение.

Трехсуточный мицелий *S. cirsii* характеризовался наибольшей патогенностью, о чем свидетельствуют короткий период (4 ч) проникновения в ткань листьев бодяка и максимальная площадь их поражения. С увеличением сроков культивирования патогенность мицелия *S. cirsii* снижалась, что выражалось в существенном увеличении длитель-

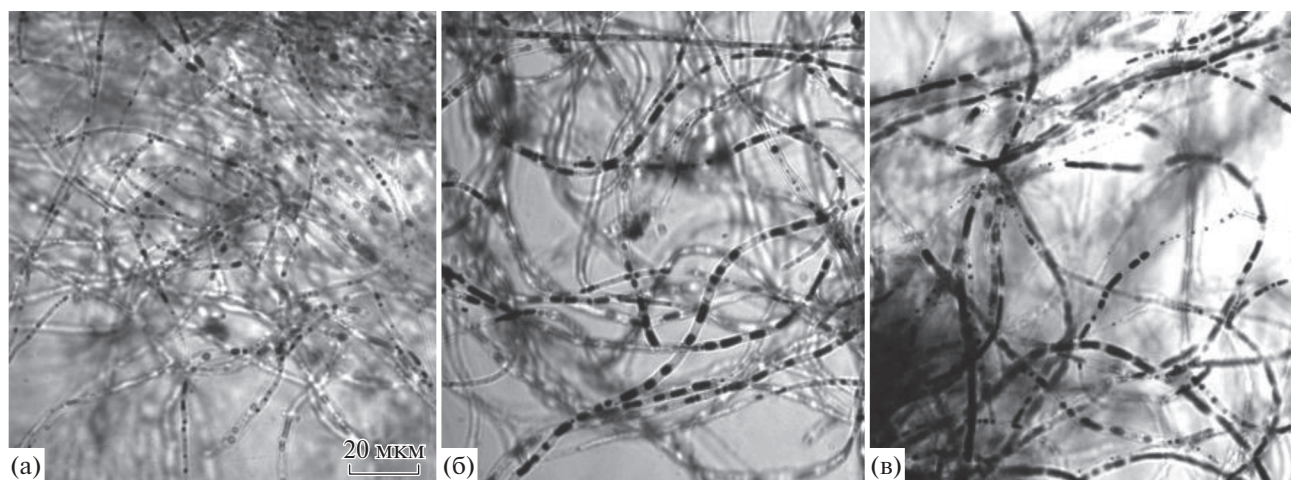


Рис. 1. Липидные включения в глубинном мицелии *S. cirsii* на разных стадиях роста – на 3 (а), 6 (б) и 9 (в) сут.

ности эпифитного роста и уменьшении площади некрозов на листовых дисках (табл. 1).

Липидные включения в мицелии *S. cirsii* окрашивались красителем в сине-черный цвет. Небольшие липидные капли в гифах были отмечены на 3 сут культивирования, а на 6 и 9 сут роста объем липидных включений в мицелии гриба был заметно больше (рис. 1). Микроскопические исследования не выявили каких-либо видоизменений мицелия: аномально утолщенных клеток, хламидоспор и микросклероциев.

Максимальное накопление липидов (6.5% от массы высушенного мицелия) было отмечено в начале стационарной фазы роста *S. cirsii* (табл. 1). Независимо от возраста культуры доминирующими липидами мицелия *S. cirsii* были НЛ, доля которых составляла 55–76% от массы общего липидного экстракта. Максимальное содержание НЛ в мицелии, так же, как и липидных включений отмечено в начале и конце стационарной фазы роста гриба (табл. 1, рис. 1). При этом максимальное содержание ФЛ было обнаружено в 3-суточном мицелии, а СЛ – в 9-суточном. На 9 сут роста доля ФЛ снизилась в 2.5 раза (с 38 до 15% от

суммы липидов), а доля СЛ за время наблюдений незначительно выросла (табл. 1).

**Нейтральные липиды.** Независимо от возраста мицелия *S. cirsii* основными компонентами фракции НЛ были ацилглицериды, доля которых составляла примерно 80%. Среди них преобладали ТАГ (51–60% от пула НЛ), относительное содержание которых при переходе с фазы активного роста (3 сут) на стационарную фазу (6 сут) увеличилось более чем на 30%, а на 9 сут культивирования незначительно (на 15%) снижалось. Доля моно- и диацилглицеридов с возрастом культуры гриба практически не менялась, находясь на уровне около 18% (рис. 2а).

При варьировании концентрации ТАГ в мицелии *S. cirsii* наблюдали также изменения их молекулярного состава. Молекулярные виды ТАГ, содержащие полиненасыщенные С18:2 и С18:3 кислоты (линолевую и линоленовую кислоты), частично замещались молекулярными видами, этерифицированными насыщенными С16:0 и моноеновыми С16:1 и С18:1 кислотами. Так, в 3-суточном мицелии *S. cirsii* фракция ТАГ содержала

Таблица 1. Выход биомассы, патогенные свойства, содержание и состав липидов мицелия *S. cirsii* на различных сроках глубинного культивирования

Возраст культуры, сут	Выход сухой биомассы, г/л	Период эпифитного роста, ч	Площадь некроза, %	Содержание общих липидов, % от сухой биомассы	Содержание основных классов липидов, % от общих липидов*		
					НЛ	ФЛ	СЛ
3	6.7	4	100	4.2	55 ± 1.6	38 ± 2.0	7 ± 1.8
6	11.9	6	85	6.5	76 ± 2.1	16 ± 1.9	8 ± 1.3
9	10.0	12	50	5.7	75 ± 3.2	15 ± 2.5	10 ± 0.9
НСР	6.0	0.3	12.0	0.7	–	–	–

\*НЛ – нейтральные липиды, СЛ – сфинголипиды, ФЛ – фосфолипиды.

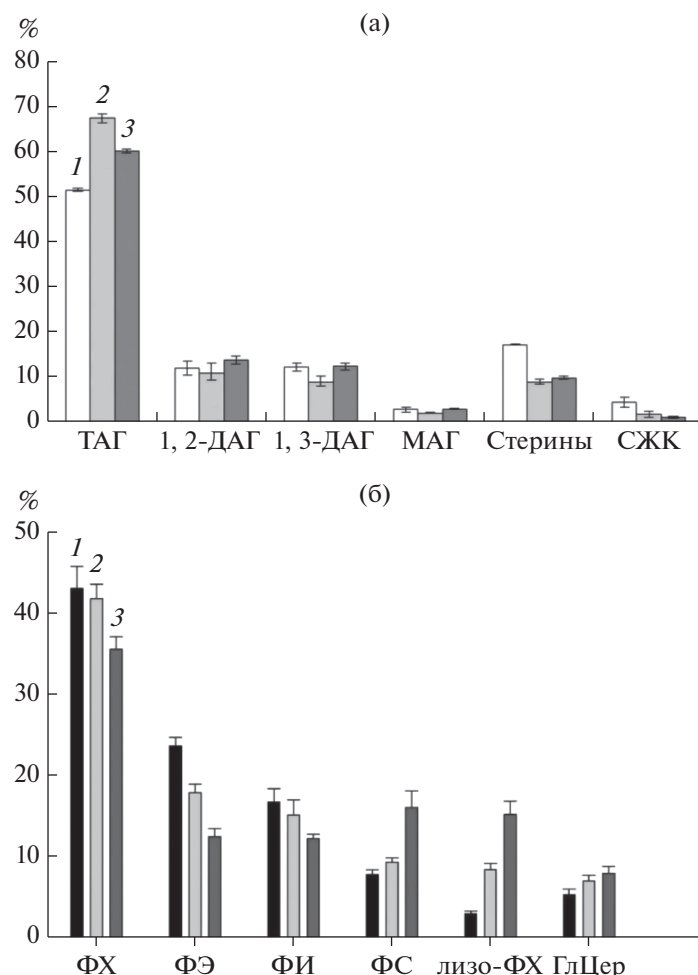


Рис. 2. Изменение относительного содержания нейтральных (а) и полярных липидов (б) на 3 (1), 6 (2) и 9 (3) сут роста глубинной культуры *S. cirsi*.

Таблица 2. Изменения в составе жирных кислот триглицеридов в процессе роста глубинной культуры *S. cirsi* (% от суммы жирных кислот)

ЖК*	ТАГ		
	3 сут	6 сут	9 сут
C <sub>16:0</sub>	16.4 ± 3.5 <sup>a</sup>	27.1 ± 2.8 <sup>b</sup>	22.5 ± 3.0 <sup>b</sup>
C <sub>16:1</sub>	2.7 ± 1.1 <sup>a</sup>	11.1 ± 2.0 <sup>b</sup>	9.3 ± 0.8 <sup>b</sup>
C <sub>18:0</sub>	8.8 ± 2.0	8.7 ± 0.9	8.9 ± 1.0
C <sub>18:1 Δ9</sub>	25.7 ± 3.4 <sup>a</sup>	34.2 ± 1.4 <sup>b</sup>	37.1 ± 1.6 <sup>b</sup>
C <sub>18:1 Δ11</sub>	3.0 ± 0.0	4.3 ± 0.6	4.2 ± 0.7
C <sub>18:2</sub>	38.2 ± 3.2 <sup>a</sup>	11.8 ± 1.1 <sup>b</sup>	14.9 ± 2.7 <sup>b</sup>
C <sub>18:3</sub>	3.3 ± 0.7 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.3 <sup>b</sup>
ΣC <sub>20–22</sub> **	1.2 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.9 ± 0.2
ИДС***	1.2	0.8	0.8

\* Приведены основные ЖК, относительное содержание которых превышало 1%.

\*\* Представлена сумма изомеров полиненасыщенных ЖК C<sub>20</sub>–C<sub>22</sub> ряда.

\*\*\* ИДС — индекс двойных связей. (Приведены средние значения 3 независимых экспериментов и их стандартное отклонение; достоверно различающиеся ( $P \leq 0.05$ ) средние значения отмечены разными буквами — а и б).

38% C<sub>18:2</sub> кислоты, а в стационарной фазе роста — 12–15% (табл. 2).

Содержание стерина в мицелии также заметно изменялось. Максимальное их накопление (17% от суммы НЛ) наблюдалось в фазе экспоненциального роста гриба, а в стационарной фазе их доля снижалась до 8%. Доля свободных ЖК была низкой — 4.8% на 3 сут роста, а на 9 сут культивирования снижалась в 6 раз (рис. 2а). Фракция стерина, независимо от возраста культуры гриба, была представлена в основном ЭС (83–89%). Также в минорных количествах были выявлены: эргоста-5,7,9(11),22-тетраен-3-ол (около 3.5%), 5-дегидро-эргостерин (0.4%) и холестерин (0.3%). В процессе развития культуры *S. cirsi* статистически значимых модификаций состава стерина зарегистрировано не было.

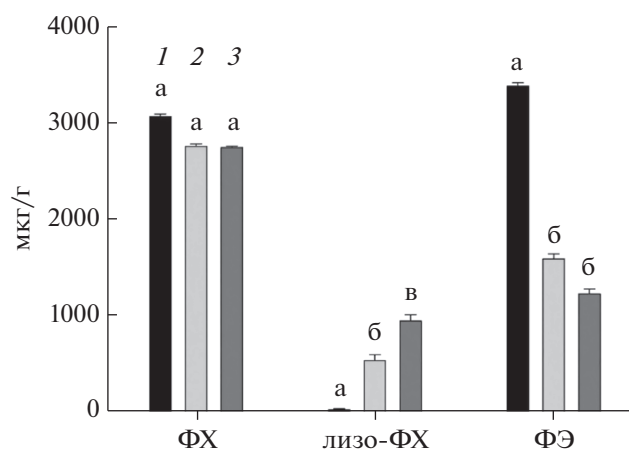
**Полярные липиды.** Согласно данным, полученным методом ВЭТСХ и многократного элюирования, в экспоненциальной фазе роста доминирующими ПЛ в мицелии *S. cirsi* были ФХ и ФЭ —

43% и 23% от пула ПЛ соответственно. Остальные выявленные ФЛ (ФС, ФИ и лизо-ФХ) присутствовали в меньших количествах – 3–16%. В процессе дальнейшего развития культуры относительное содержание ФХ и ФЭ снижалось. При этом доля ФЭ к 9 сут снижалась в 2 раза, а ФХ – всего лишь в 1.2 раза. В конце стационарной фазы роста в мицелии *S. cirsii* существенно повысилось содержание ФС и лизо-ФХ, в 2 и 5 раз соответственно. Содержание ГлЦер в процессе роста гриба изменялась незначительно, но имело тенденцию к увеличению (рис. 2б).

Количественный анализ доминирующих ФЛ, определенный методом двумерной ТСХ подтвердил существенное снижение концентрации ФЭ (в 2.8 раз) в мицелии, тогда как содержание ФХ снижалось незначительно (в 1.1 раз) при трехкратном увеличении концентрации лизо-ФХ в процессе роста мицелия *S. cirsii* (рис. 3).

Анализ состава ЖК ФХ и ФЭ показал, что переход культуры *S. cirsii* от экспоненциальной к стационарной фазе роста сопровождался снижением относительного содержания С18:2 и С18:3 кислот и увеличением доли С18:1 кислоты. Изменения состава ЖК ФХ и ФЭ оказались схожими, отмечено постепенное снижение индекса двойных связей (табл. 3).

**Анализ молекулярных видов.** По данным масс-спектрометрии ФХ и ФЭ формировали два основных кластера молекулярных видов с ацильными группами С16/С18 (С34) и С18/18 (С36). Среди них доминировали четыре молекулярных вида С34:2, С36:4, С36:3 и С36:2, которым соответствовали депротонированные  $[\text{ФЭ}-\text{H}]^-$  с  $m/z$  714.520, 738.528, 740.543 и 742.557 и катионированные молекулы  $[\text{ФХ} + \text{Na}]^+$  с  $m/z$  780.550, 804.552, 806.559



**Рис. 3.** Динамика содержания основных фосфолипидов в мицелии *S. cirsii* на 3 (1), 6 (2) и 9 (3) сут. Средние значения, отмеченные одной буквой, не различаются на уровне  $p = 0.05$ .

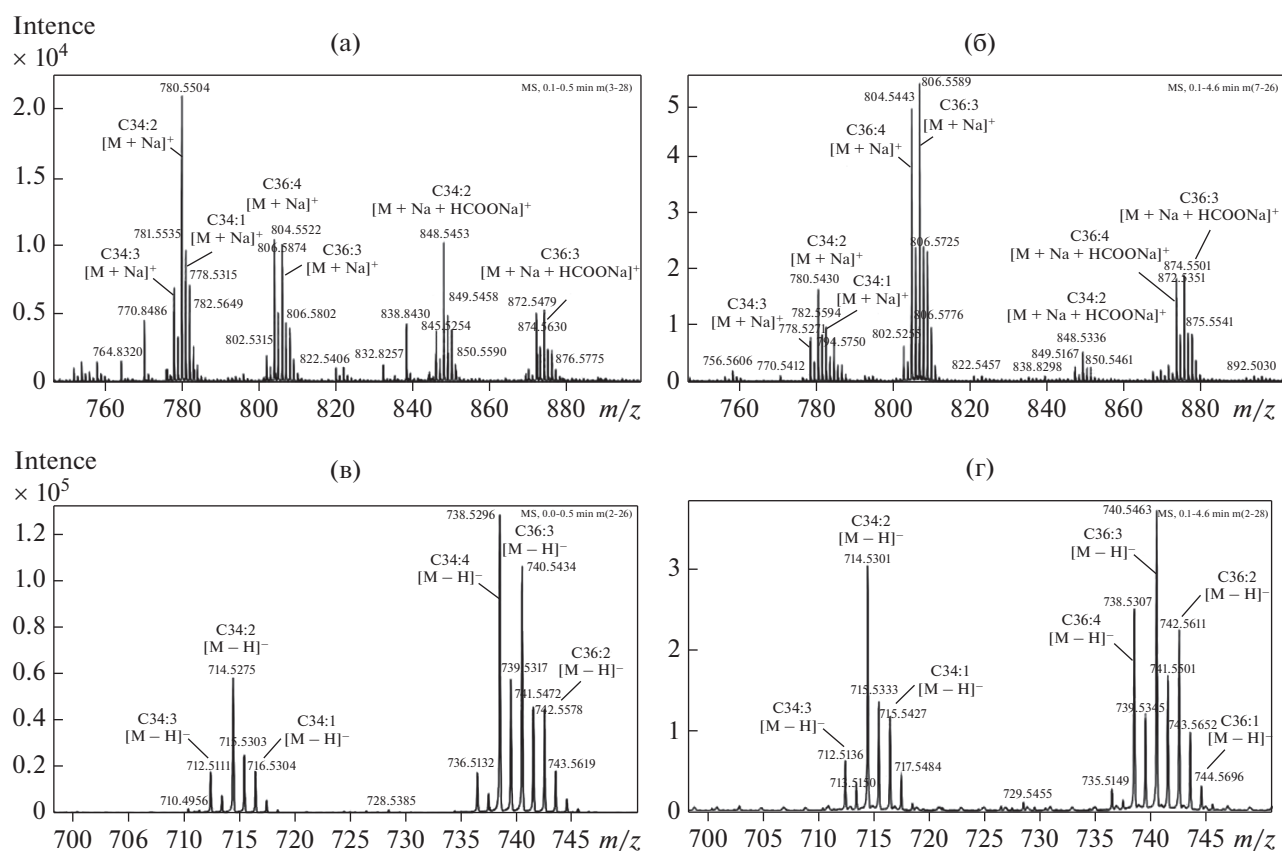
и 808.572. Согласно данным анализа ЖК эти молекулярные виды преимущественно содержат ацильные группы 16:0/18:2, 18:2/18:2, 18:1/18:2 и 18:1/18:1 (табл. 4). Молекулярные ионы в диапазоне  $m/z$  846–850 и 872–876 в спектрах ФХ соответствовали кластеру аддуктов основных молекулярных видов с формиатом натрия  $[\text{ФХ}(\text{С34}) + \text{COONa}]^+$  и  $[\text{ФХ}(26) + \text{COONa}]^+$  (рис. 4).

В 3-суточном мицелии *S. cirsii* доминировали С34 молекулярные виды ФХ, относительное содержание которых составляло 56%. В фазе замедленного роста их доля снижалась до 22%, но при этом увеличивалось содержание С36 молекулярных видов ФХ (с 33 до 78%) (рис. 4, табл. 4). Во фракции ФЭ наблюдалась обратная, но менее вы-

**Таблица 3.** Изменения в составе ЖК доминирующих мембранных липидов в процессе роста глубинной культуры *S. cirsii* (% от суммы жирных кислот)\*

ЖК	ФХ			ФЭ		
	3 сут	6 сут	9 сут	3 сут	6 сут	9 сут
C <sub>16:0</sub>	11.8 ± 1.3	9.8 ± 4.6	10.0 ± 4.3	13.0 ± 0.3	14.3 ± 2.2	12.9 ± 2.7
C <sub>16:1</sub>	0.8 ± 0.4	2.6 ± 0.9	1.2 ± 0.4	1.0 ± 0.5	3.1 ± 0.8	1.7 ± 0.8
C <sub>16:1 Δ9</sub>	8.0 ± 3.4	9.1 ± 2.3	6.9 ± 1.2	5.8 ± 1.8	4.8 ± 0.6	4.8 ± 1.0
C <sub>18:0</sub>	2.1 ± 0.1	3.0 ± 1.7	5.7 ± 1.3	2.4 ± 0.2	4.2 ± 0.7	3.6 ± 0.5
C <sub>18:1 Δ9</sub>	12.5 ± 1.1 <sup>a</sup>	31.8 ± 3.4 <sup>б</sup>	39.2 ± 3.9 <sup>б</sup>	13.1 ± 2.1 <sup>a</sup>	35.1 ± 3.4 <sup>б</sup>	40.0 ± 5.0 <sup>б</sup>
C <sub>18:1 Δ11</sub>	8.0 ± 0.6	5.9 ± 0.9	7.5 ± 1.5	6.8 ± 0.5	5.2 ± 0.7	6.2 ± 0.4
C <sub>18:2</sub>	48.5 ± 5.1 <sup>a</sup>	33.7 ± 2.0 <sup>б</sup>	31.1 ± 1.5 <sup>б</sup>	51.1 ± 4.3 <sup>a</sup>	30.3 ± 1.9 <sup>б</sup>	28.2 ± 3.1 <sup>б</sup>
C <sub>18:3</sub>	4.5 ± 1.6 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.4 <sup>б</sup>	0.7 ± 0.3 <sup>б</sup>	3.3 ± 1.0 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.3 <sup>б</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>б</sup>
ΣC <sub>20–22</sub>	2.3	1.5	–	1.9	–	1.0
ИДС	<b>1.4</b>	<b>1.2</b>	<b>1.1</b>	<b>1.4</b>	<b>1.2</b>	<b>1.1</b>

\* Обозначения как в табл. 2.



**Рис. 4.** Масс-спектры молекулярных видов ФХ (а, б) и ФЭ (в, г) мицелля *S. cirsi*, снятые соответственно в положительном и в отрицательном режимах ионизации (на 3 (а, в) и 9 сут (б, г) роста).

раженная закономерность. Так, независимо от возраста доминировали С36 молекулярные виды ФЭ, содержание которых снижалось незначительно с 76 до 66% на 3 и 9 сут соответственно, при этом содержание ФЭ С34 увеличивалось с 24 до 35% (рис. 4, табл. 4).

Во фракции ГлЦер было выявлено 10 молекулярных видов. Сфингоидные основания ГлЦер были представлены преимущественно 9-метил-4,8-сфингадиенином (d18:2<sup>Δ4,8,9</sup>-Метил). Его окисленная форма d18:1<sup>Δ8,4</sup>-Эпокси,9-Метил обнаружена в значительно меньшем количестве. Доминирующей

**Таблица 4.** Изменения в составе основных молекулярных видов ФХ, ФЭ в процессе роста глубинной культуры *S. cirsi*

ФХ				ФЭ			
$m/z$ [M + Na] <sup>+</sup>	молекулярный вид*	содержание, %**		$m/z$ [M - H] <sup>-</sup>	молекулярный вид	содержание, %	
		3 сут	9 сут			3 сут	9 сут
778	C34:3	11.4	4.4	712	C34:3	4.6	4.5
780	C34:2	33.5	9.5	714	C34:2	14.8	21.9
782	C34:1	11.5	5.2	716	C34:1	4.2	8.0
784	C34:0	0	3.2	738	C36:4	32.7	18.1
804	C36:4	17.2	24.6	740	C36:3	27.1	26.8
806	C36:3	15.7	31.8	742	C36:2	10.5	16.2
808	C36:2	6.3	13.7	744	C36:1	1.4	2.3

\* Показано суммарное количество атомов углерода и двойных связей в ацильной части молекулы фосфолипида; \*\* % от суммы основных (более 2%) идентифицированных молекулярных видов в классе (приведены средние значения 2–3 аналитических повторностей в одном независимом эксперименте).

**Таблица 5.** Изменения в составе молекулярных видов ГлЦер [M + Na]<sup>+</sup> (%) в процессе роста глубинной культуры *S. cirsi*\*

ЖК	m/z	d18:2 <sup>Δ4,8,9</sup> -Метил			m/z	d18:1 <sup>Δ8</sup> , 4-Эпокси, 9-Метил		
		3 сут	6 сут	9 сут		3 сут	6 сут	9 сут
18:1	760	0.8 ± 0.2	0.4 ± 0.01	0.4 ± 0.01	776	—	—	—
18:0	762	5.8 ± 0.2	4.1 ± 1.0	5.2 ± 0.4	778	—	—	—
18:1(ОН)	776	70.7 ± 3.0	75.8 ± 1.5	71.1 ± 5.9	792	3.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	8.2 ± 1.7 <sup>b</sup>	9.1 ± 5.9 <sup>ab</sup>
22:0(ОН)	834	1.2 ± 0.5	2.1 ± 0.1	2.3 ± 0.6	850	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.04	0.8 ± 0.1
24:1(ОН)	860	0.3 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	876	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
24:0(ОН)	862	0.2 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.04 <sup>b</sup>	878	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.05	0.3 ± 0.1

\* Приведены средние значения двух независимых экспериментов и их стандартное отклонение, достоверно отличающиеся ( $P \leq 0.05$ ) средние значения отмечены разными буквами а и б. “—” — не обнаружено.

ЖК, входящей в состав ГлЦер, была С18:1(ОН) кислота. В значительно меньших количествах обнаружены ГлЦер с С18:0, С18:1 и 22:0(ОН) кислотами, длинноцепочечные гидроксиды-кислоты С24 ряда — в следовых. Среди выявленных молекулярных форм ГлЦер независимо от возраста культуры *S. cirsi*, доминирующим (с долей 70–75% от пула ГлЦер) было соединение с m/z 776 [M + Na]<sup>+</sup>, соответствующее 9-метил-4,8-сфингадиенину, связанному амидной связью с 2-гидроксиоктадекановой кислотой (d18:2<sup>Δ4,8,9</sup>-Метил/18:1ОН). По мере старения культуры *S. cirsi* относительное содержание его окисленной формы с m/z 792 [M + Na]<sup>+</sup> увеличивалось в 3 раза (табл. 5).

Штамм *S. cirsi* ВИЗР 1.41 является продуцентом потенциального микогербицида против бодяка полевого, действующим началом которого является мицелий этого гриба [17]. Важно отметить, что помимо высокой биологической эффективности продуценты биопестицидов должны быть высокопродуктивными и устойчивыми к стресс-факторам [22]. При культивировании на среде СС быстрорастущий (находящийся в фазе экспоненциального роста) 3-сут мицелий *S. cirsi* был наиболее патогенным (табл. 1), при этом наибольший выход мицелия наблюдался на 6 сут. Для этого мицелия показано, что он более толерантен к высушиванию, чем 3-суточный [23]. Клетки модельного дрожжевого гриба *Saccharomyces cerevisiae* в фазе стационарного роста также были на несколько порядков более толерантны к высушиванию по сравнению с клетками в фазе экспоненциального роста. При этом в ответ на высушивание изменялся биохимический состав дрожжевых клеток, в том числе состав мембранных липидов [24]. С одной стороны, это свидетельствовало о предпочтительности использования мицелия *S. cirsi* в начале стационарной фазы роста для обработки сорных растений или стабилизации в виде подходящей препаративной формы. С другой стороны, полученные данные показали необходимость поиска биохимических критери-

ев соответствующего качества мицелия *S. cirsi*, поскольку при дальнейшей оптимизации состава жидкой питательной среды продолжительность определенных фаз его роста может меняться.

Анализ общего содержания липидов показал, что глубинный мицелий *S. cirsi* проявлял характерную для большинства мицелиальных грибов тенденцию к их накоплению [25]. Максимальный уровень липидов, среди которых доминировали НЛ, наблюдался в начале стационарной фазы роста, что согласовывалось с их основной ролью резервных или запасных липидов.

Среди НЛ мицелия *S. cirsi* доминирующими оказались ТАГ. Как было показано на примере ряда модельных видов фитопатогенных микромицетов (*Stagonospora nodorum*, *Magnaporthe grisea* и *Zymoseptoria tritici*), способность к накоплению этих резервных липидов может быть одним из факторов вирулентности, увеличивая их толерантность к различным стресс-факторам [26–28]. Высокопатогенный 3-суточный мицелий *S. cirsi* отличался наименьшим относительным содержанием ТАГ, что весьма типично для активно растущих молодых культур микромицетов [25]. Можно предположить, что ТАГ играют определенную роль в патогенности 6-суточного мицелия *S. cirsi*, обеспечивая питание в период эпифитного роста гриба.

В высокопатогенном мицелии в экспоненциальную фазу роста *S. cirsi* наблюдали максимальное содержание стериннов, в частности, ЭС. Накопление ЭС в активно растущем мицелии *S. cirsi* согласовывалось с его важной биологической ролью, связанной с участием в процессах клеточного цикла и поддержания структуры и нормального функционирования мембран [29]. У *Penicillium atrovietum* максимальное содержание ЭС в биомассе также отмечено в фазе экспоненциального роста, а в стационарную фазу наблюдали резкое снижение концентрации этого липида [30]. ЭС рассматривается также как “микроб-ассоциированный молекулярный паттерн” фитопатоген-

ных грибов или элиситор, отвечающий за индукцию растениями неспецифического иммунного ответа [31]. Можно предположить, что *S. cirsi* обладает механизмами, свойственными некоторым некротрофным фитопатогенам (например, *Botrytis cinerea* и *Sclerotinia sclerotiorum*) [32], которые позволяют подавлять защитные реакции растения-хозяина.

Количество и соотношение ФХ и ФЭ имеет большое значение для поддержания функционального состояния мембран. Так, исследования методом компьютерного моделирования выявили существенные изменения латерального давления, электрического поля и дипольного потенциала мембран при различных соотношениях ФХ/ФЭ [33]. Показатель ФХ/ФЭ изменялся в процессе роста и развития грибов. Так, переход глубинной культуры *S. cerevisiae* из логарифмической в стационарную фазу роста сопровождался увеличением соотношения ФХ/ФЭ с 0.9 до 2.2 [34]. В высокопатогенном 3-суточном мицелии *S. cirsi* наблюдали максимальное содержание ФХ и ФЭ, а в процессе роста гриба соотношение ФХ/ФЭ увеличивалось (рис. 26, 3).

Связь содержания и состава мембранных глицерофосфолипидов с патогенными свойствами грибов может быть обусловлена участием их определенных молекулярных видов в формировании необходимых свойств поверхности инфекционных гиф, а также в образовании внеклеточных везикул, обеспечивающих доставку в участки инфекции таких разнообразных факторов вирулентности, как литических ферментов и белков-эффektorов [35]. Практически ничего не известно о влиянии состава ФЛ в инфекционных структурах грибов-возбудителей болезней растений на их патогенные свойства. Однако недавно на примере мутантов *Fusarium graminearum* по некоторым генам, отвечающим за биосинтез ферментов (ФС-декарбоксилазы 2, ФЭ-метилтрансферазы и метилен-ацил-жирной кислоты-ФЛ-синтазы), было показано, что нарушение биосинтеза ФЛ приводит к понижению уровня вегетативного роста и патогенности этого гриба, а также к повышению чувствительности к фунгицидам [10].

Изменения во фракции ФЭ в процессе роста *S. cirsi* включали увеличение относительного содержания видов с  $m/z$  714 (С34:2) и 742 (С36:2) и почти двукратное снижение (с 33 до 18%) уровня видов с  $m/z$  738 (С36:4, преимущественно 18:2/18:2), доминирующего в мицелии *S. cirsi* в фазе активного роста. Предположительно, в ходе развития культуры *S. cirsi*, сопровождающегося снижением патогенности гриба, происходила существенная перестройка жирнокислотного состава доминирующих ФЛ: замена молекулярных видов ФХ16:0/18:2 (С34) на ФХ18:2/18:2 и ФХ18:1/18:2 (С36), а также ФЭ18:2/18:2 (С36) на ФЭ16:0/18:2

(С34). Тенденция, связанная с повышением уровня С34-форм и пониженное содержание С36-форм в составе ФХ, была обнаружена также у мутанта (*Δmr LPAATI*) энтомопатогенного гриба *M. robertsii* по сравнению с вирулентным штаммом дикого типа [9].

С использованием мутантного штамма с нарушенным метаболизмом ГлЦер установлен вклад данного класса липидов в вирулентность возбудителя фузариоза колоса пшеницы *Fusarium graminearum* и выявлена особая роль метильной группы при С-9 сфингоидного основания [13]. У *S. cirsi* во фракции ГлЦер преобладало характерное для грибов соединение (d18:2<sup>Δ4,8,9</sup>-Метил/18:1 ОН), в котором 9-метил-4,8-сфингадиенин связан амидной связью с 2-гидроксиоктадекановой кислотой. Его окисленная форма была обнаружена в значительной меньшей концентрации, однако в процессе роста наблюдалось постепенное увеличение ее содержания одновременно с меланизацией гиф. Возрастная склеротизация мицелиальных клеток патогена человека *Fonsecaea pedrosoi* также сопровождалась меланизацией клеточных стенок и гидроксильрованием сфингоидных оснований ГлЦер [36].

На примере мутантов *Candida albicans* с нарушенным синтезом сфингоидного основания показано влияние ГлЦер на морфологию и рост этого дрожжевого гриба [37, 38]. При этом биоэффektorные свойства ГлЦер в зависимости от их ЖК-состава практически не изучены. По нашим данным в мицелии *S. cirsi* по мере старения и снижения патогенности наблюдалась тенденция к накоплению форм ГлЦер с удлиненной цепью ЖК. Несмотря на то, что изменения весьма незначительные, они могут быть интересны для дальнейшего изучения.

В заключение следует отметить, что: 1) в процессе роста гриба *S. cirsi* его липидный состав существенно менялся вместе с патогенными свойствами; 2) для высокого выхода биомассы оптимальным является использование мицелия гриба в начале стационарной фазы роста при максимальном уровне накопления липидов; 3) отмечена определенная связь патогенности мицелия с относительно высоким содержанием ЭС и ФЭ; 4) с возрастом мицелия снижался индекс двойных связей жирных кислот в составе глицеролипидов, а также происходила замена молекулярных форм ФХ (34:2 на 36:4) и ФЭ (36:4 на 34:2); 5) разнообразие форм и варьирование относительных концентраций ГлЦер в мицелии *S. cirsi* было низким. Принимая во внимание содержание выявленных липидов в мицелии *S. cirsi*, маркерами его качества, по-видимому, можно считать наличие высокого уровня ЭС, ТАГ (с учетом индекса двойных связей жирных кислот, входящих в их состав), ФЭ (в частности, 36:4-форма) и ФХ (34:2-форма).



Авторы выражают признательность М.З. Мурадымову, М.А. Виноградской (Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН) и А.В. Рубижан (Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений) за существенную помощь в проведении исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-00085) с привлечением оборудования Центра коллективного пользования “Инновационные технологии защиты растений” ВИЗР, а также ресурсных центров “Развитие молекулярных и клеточных технологий” и “Методы анализа состава вещества” Санкт-Петербургского государственного университета.

Методическая основа протокола анализа молекулярных видов гликоцерамидов и стероидов разработана в ходе выполнения темы “Оценка изменений корреляционной структуры метаболитных сетей в процессе роста и развития грибов и растений с позиции системной биологии” БИН РАН (AAAA-A18-118032390136-5).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rella A., Farnoud A.M., Del Poeta M. // Prog. Lipid Res. 2016. V. 61. P. 63–67.
- Kobae Y., Gutjahr C., Paszkowski U., Kojima T., Fujiwara T., Hata S. // Plant Cell Physiol. 2014. V. 55. № 11. P. 1945–1953.
- Aguilar L.R., Pardo J.P., Lomelí M.M., Bocardo O.I.L., Juárez Oropeza M.A., Guerra Sánchez G. // Arch. Microbiol. 2017. V. 199. P. 1195–1209.
- Keyhani N.O. // Fungal Biol. 2018. V. 122. № 6. P. 420–429.
- Gao Q., Shang Y., Huang W., Wang C. // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. № 24. P. 7646–7653.
- Harayama T., Riezman H. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2018. V. 19. № 5. P. 281–296.
- Siebers M., Brands M., Wewer V., Duan Y., Hölzl G., Dörmann P. // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1861. № 9. Part B. P. 1379–1395.
- Chen Y.-L., Montedonico A.E., Kauffman S., Dunlap J.R., Menn F.-M., Reynolds T.B. // Mol. Microbiol. 2010. V. 75. № 5. P. 1112–1132.
- Gao Q., Yuzhen L., Hongyan Y., Xu Y.-J., Huang W., Wang C. // Environ. Microbiol. 2016. V. 18. № 11. P. 3976–3990.
- Wang J., Wang H., Zhang C., Wu T., Ma Z., Chen Y. // Phytopathol. Res. 2019. V. 1. № 16. <https://doi.org/10.1186/s42483-019-0023-9>
- Kazan K., Gardiner D.M. // PLoS Pathog. 2017. V. 13. № 5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006297>
- Warnecke D., Heinz E. // Cell. Mol. Life Sci. 2003. V. 60. № 5. P. 919–941.
- Ramamoorthy V., Cahoon E.B., Thokala M., Kaur J., Li J., Shah D.M. // Eukaryotic Cell. 2009. V. 8. № 2. P. 217–229.
- Weete J.D. Lipid Biochemistry of Fungi and Other Organisms. N.Y.: Plenum Press, 1980. 398 p.
- Beccaccioli M., Reverberi M., Scala V. // Front. Biosci. 2019. V. 24. № 1. P. 172–185.
- Фролова Г.М., Сокорнова С.В., Берестецкий А.О. // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 5. С. 506–512.
- Сокорнова С.В., Берестецкий А.О. // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. № 5. С. 1054–1061.
- Барыкина Р. П., Веселова Т. Д., Девятков А. Г., Джалилова Х. Х., Ильина Г. М., Чубатова Н. В. Справочник по ботанической микротехнике. М.: Издательство Московского университета, 2004. 312 с.
- Котлова Е.Р., Сенюк С.В., Кюхер Т., Шаварда А.Л., Кияшко А.А., Псурица Н.В., Зубарев Р.А. // Микробиология. 2009. Т. 78. № 2. С. 226–235.
- Fuchs B., Suss R., Teuber K., Eibisch M., Schiller J. // J. Chromatogr. A. 2011. V. 1218. № 19. P. 2754–2774.
- Benning C., Huang Z.H., Gage D.A. // Arch. Biochem. Biophys. 1995. V. 317. № 1. P. 103–111.
- Berestetskiy A., Sokornova S. Biological Approaches for Controlling Weeds / Ed. R. Radhakrishnan. London: IntechOpen, 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76936>
- Павлова Н.А., Сокорнова С.В. // Вестник защиты растений. 2018. Т. 4. № 98. С. 67–69.
- Skoneczny M., Skoneczna A. Stress Response Mechanisms in Fungi. / Ed. M. Skoneczny. Cham: Springer, 2018. P. 35–85.
- Akpinar-Bayizit A. // Int. J. Chem. Eng. Appl. 2014. V. 5. № 5. P. 409–414.
- Solomon P.S., Lee R. C., Wilson T.J., Oliver R. P. // Mol. Microbiol. 2004. V. 53. № 4. P. 1065–1073.
- Thines E., Weber R.W.S., Talbot N.J. // Plant Cell. 2000. V. 12. № 9. P. 1703–1718.
- Rudd J. J., Kanyuka K., Hassani-Pak K., Derbyshire M., Andongabo A., Devonshire J. et al. // Plant Physiol. 2015. V. 167. № 3. P. 1158–1185.
- Lösel D.M. // Pestic. Sci. 1991. V. 32. № 3. P. 353–362.
- Van Etten J., Gottlieb D. // J. Bacteriol. 1965. V. 89. № 2. P. 409–414.
- Klemptner R.L., Sherwood J.S., Tugizimana F., Dubery I.A., Piater L.A. // Mol. Plant Pathol. 2014. V. 15. № 7. P. 747–761.
- Govrin E. M., Levine A. // Current Biol. 2000. V. 10. № 13. P. 751–757.
- Ding W., Palaiokostas M., Wang W., Orsi M. // J. Phys. Chem. 2015. V. 119. № 49. P. 15263–15274.
- Janssen M.J., Koorengel M.C., de Kruijff B., de Kroon A.I. // Yeast. 2000. V. 16. № 7. P. 641–650.
- Cassilly C.D., Reynolds T.B. // J. Fungi. 2018. V. 4. № 28. <https://doi.org/10.3390/jof4010028>
- Nimrichter L., Cerqueira M.D., Leitão E.A., Miranda K., Nakayasu E.S., Almeida S.R., Almeida I.C., Alviano C.S., Barreto-Bergter E., Rodrigues M.L. // Infect. Immun. 2005. V. 73. № 12. P. 7860–7868.
- Oura T., Kajiwara S. // Microbiol. 2008. V. 154. № 12. P. 3795–3803.
- Oura T., Kajiwara S. // Microbiol. 2010. V. 156. № 4. P. 1234–1243.

## Pathogenicity and Lipid Composition of Mycelium of the Fungus, *Stagonospora cirsii* VIZR 1.41 in the Process of Submerged Liquid Cultivation

G. M. Frolova<sup>a</sup>, E. R. Kotlova<sup>b</sup>, S. V. Sokornova<sup>a</sup>, S. V. Senik<sup>b</sup>, A. L. Shavarda<sup>b</sup>,  
A. D. Misharev<sup>c</sup>, and A. O. Berestetskiy<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>All-Russian Institute of Plant Protection, Pushkin, Saint-Petersburg, 196608 Russia

<sup>b</sup>Botanical Institute, Saint-Petersburg, 197376 Russia

<sup>c</sup>Resource Center "Methods for Analysis of the Composition of Substances" at Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, 198504 Russia

\*e-mail: aberestetskiy@vizr.spb.ru

In order to identify quality markers of a potential mycoherbicide against Canada thistle (*Cirsium arvense*) based on the mycelium of the fungus, *Stagonospora cirsii* VIZR 1.41 changes of pathogenicity and lipid profiles during submerged cultivation on liquid sucrose-soybean medium were analyzed. Within this study, fatty acid composition of major lipids and identification of molecular species of structural lipids were determined. The lipid composition during fungal growth was changed together with its pathogenicity. Highly pathogenic mycelium of the fungus (at the log phase of growth) was featured with relatively highest content of structural lipids – phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), and ergosterol (ES); in the aging of culture and decreasing of pathogenicity their relative concentration decreased. At the beginning of stationary phase of growth (at maximum biomass yield) of *S. cirsii* the highest yield of lipid was found; triacyl glycerides (TAG) were the most abundant among them. Double bond index of fatty acids in glycerolipids decreased with aging of the culture, the substitution of molecular species of PC (34:2-instead 36:4-species) and PE (36:4-instead 34:2-species) was observed as well. The high level of ES, TAG, PC (in particular, 34:2-species) and PE (36:4-species) were supposed to be quality markers of *S. cirsii* mycelium.

**Keywords:** *Stagonospora cirsii*, mycoherbicide, pathogenicity, lipids, molecular species, fatty acid composition

УДК: 577.152.4

## КАТАЛИТИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ИЗОФОРМ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В КУКУРУЗЕ *ZEA MAYS* L.

© 2021 г. А. Т. Епринцев<sup>1</sup>\*, Г. Б. Анохина<sup>1</sup>, П. С. Оя<sup>1</sup>, Я. И. Дедов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Воронежский государственный университет, Воронеж, 394018 Россия

\*e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 05.10.2020 г.

После доработки 30.10.2020 г.

Принята к публикации 02.11.2020 г.

Исследована динамика активности глутаматдегидрогеназы (ГДГ, КФ 1.4.1.2) при прорастании в листьях и щитках кукурузы. Установлено, что изменения активности в листьях и щитках обусловлены как биохимическими, так и молекулярными аспектами функционирования фермента, что подтверждалось вариабельностью относительного уровня транскриптов генов *gdh-1* и *gdh-2*, кодирующих субъединицы ГДГ. Показано, что фермент в листьях преимущественно локализовался в митохондриях (86.54%), и в меньшей степени в цитозоле (9.53%) и хлоропластах (3.92%). Очистка, включающая 4 этапа позволила выделить 3 ферментных препарата ГДГ из листьев кукурузы с различной степенью очистки. Форма ГДГ1 была очищена в 98 раз с выходом 8%. Удельная активность полученного препарата – 195 Е/мг белка. Форма ГДГ2 со степенью очистки 83 раза и выходом 32% имела удельную активность 166 Е/мг белка. Препарат ГДГ3 характеризовался удельной активностью 122.2 Е/мг белка, степенью очистки 61 и выходом 21%. Определены значения рН-оптимумов по реакции аминирования: для ГДГ 1 он составил 7.5, для ГДГ2 и ГДГ3 – 7.0 и 8.5 соответственно. Полученные изоформы имели разные значения  $K_m$  по 2-оксоглутарату: 0.34 мМ для ГДГ1, а для ГДГ2 и ГДГ3 – 0.6 мМ и 0.22 мМ соответственно.

**Ключевые слова:** глутаматдегидрогеназа, кукуруза, прорастание, очистка, изоферменты, субклеточная локализация, экспрессия, праймер

**DOI:** 10.31857/S0555109921020021

Глутаматдегидрогеназа (ГДГ, КФ 1.4.1.2) – фермент, участвующий в регуляции углеводного и азотного метаболизма, обеспечивающего обратимый катализ восстановительного аминирования 2-оксоглутарата до L-глутамата. Структурно ГДГ представляет собой олигомер. Известно, что в организме функционируют как гексамерные, так тетрамерные и димерные формы фермента с массой одной субъединицы от 40 до 60 кДа [1–3]. В зависимости от молекулярного веса мономеров выделяют три группы ГДГ: первая – с молекулярной массой около 50 кДа, вторая – ~115 кДа и третья – ~180 кДа. ГДГ является олигомером и может состоять из субъединиц различного типа:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  [4]. Известно, что преобладание  $\alpha$ -субъединиц в структуре обеспечивает более высокое сродство к глутамату, в то время как наличие  $\beta$ -субъединиц повышает сродство к 2-оксоглутарату [4].

Активаторами реакций обычно служат двухвалентные ионы металлов. По данным литературы в большинстве организмов в качестве активатора выступает кальций. Также реакция может регули-

роваться нуклеотидами, связывающимися с ферментом в аллостерическом центре, такими как АДФ и АМФ. В редких случаях активаторами могут выступать такие аминокислоты как аспарат, аспарагин, цистеин и лейцин [5–7]. Все перечисленные выше соединения в больших концентрациях могут являться также ингибиторами глутаматдегидрогеназной активности [8].

Значения оптимума рН для прямой и обратной реакции в различных организмах могут быть различными. Так для глутаматдегидрогеназы, выделенной из *Arabidopsis thaliana*, оптимум рН для прямой реакции восстановительного аминирования 2-оксоглутарата – 8.3, в то время как для обратной реакции окислительного дезаминирования глутамата – 9.2 [9].

Исследования ГДГ в настоящее время показали, что в геноме *A. thaliana* обнаружены три гена, кодирующие различные типы субъединиц ГДГ, в геноме кукурузы *Zea mays* L. – два гена. Ген *gdh-1* кодирует полипептид  $\beta$ -субъединицы, а ген *gdh-2* ответствен за синтез  $\alpha$ -субъединицы ГДГ. При

стрессе экспрессия данных генов изменяется, что свидетельствует о тесной связи данного фермента с адаптивными реакциями клеточного метаболизма растений [6, 10].

В клетках растений фермент локализован в митохондриях и хлоропластах, а у бактерий и архей может встречаться цитоплазматическая форма [2]. ГДГ распространена во всех органах и тканях растений, но в различных органах и тканях встречаются различные изоформы фермента. Экспрессия генов ГДГ имеет органоспецифический характер. Например, ген *gdh3* арабидопсиса локализован только в листьях, а ген *gdh2* имеет максимальную экспрессию в корнях [11].

ГДГ участвует в метаболизме азота, включая неорганический азот в углеродный скелет при превращении 2-оксоглутарата в глутамат [12]. Кроме того, ГДГ является незаменимым звеном гамма-аминомасляного шунта, необходимого для синтеза гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), участвующей в передаче стрессовых сигналов [3].

В растительных тканях физиологическая роль ГДГ заключается не только в ассимиляции азота, катаболизме глутамата и поставке 2-оксоглутарата для ЦТК, но также в регуляции осмотического баланса и устойчивости к высоким температурам [3]. Этот фермент выступает в качестве промежуточного звена между ЦТК и ГАМК-шунтом. Глутаматдегидрогеназа обеспечивает связь между катаболическим и анаболическим путями.

Цель работы – получение препаратов изоформ ГДГ в высокоочищенном состоянии и исследование их регуляторных и молекулярных аспектов функционирования в кукурузе *Zea mays* L.

## МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования использовали щитки семян, проростки и листья кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская 76, выращенные гидропонным способом при 10-часовом световом дне с интенсивностью освещения 25 Вт/м<sup>2</sup>. Температура выращивания – 25°C.

Активность ГДГ в щитках и листьях определяли в митохондриальной фракции. Для получения субклеточных фракций растения гомогенизировали (в объемном соотношении 1:10) в среде следующего состава: 0.15 М Трис-НСl буфер, рН 7.4, 0.4 М сахароза, 2.5 мМ ЭДТА, 1 мМ КСl, 4 мМ MgCl, 0.05% Тритон X-100, после чего центрифугировали при 14000 г. Осадок, содержащий фракцию митохондрий, разрушали осмотическим шоком в среде, содержащей 0.15 М Трис-НСl буфер, рН 7.4. Все манипуляции проводили при температуре 4°C.

Скорость реакции аминирования измеряли по изменению оптической плотности раствора, содержащего 2.5 мМ 2-оксоглутарата, 0.25 мМ НАДН,

50 мМ хлорида аммония, 100 мМ Трис-НСl буфер, рН 8.0 [12]. Реакцию инициировали добавлением фермента.

Активность ГДГ в реакции дезаминирования определяли путём измерения оптической плотности раствора, содержащего 100 мМ Трис-НСl буфер рН 8.5, 3 мМ НАД, 1.0 мМ хлорид кальция, 50 мМ глутамат натрия [13]. Реакцию инициировали добавлением фермента.

Для определения субклеточной локализации ГДГ в листьях кукурузы мембранные фракции выделяли из клеточного гомогената методом изоплотностного центрифугирования на центрифуге Beckman (США) при 100000 г 90 мин при 0°C в градиенте плотности сахарозы: 2.5 М, 2.3 М, 1.8 М, 1.5 М, 1.3 М. Листья кукурузы (5 г) гомогенизировали в среде выделения (1:5), следующего состава: 0.15 М Трис-НСl буфер, рН 7.4, 0.4 М сахароза, 2.5 мМ ЭДТА, 1 мМ хлорид калия, 4 мМ хлорид магния, 0.05% Тритон X-100, затем центрифугировали 3 мин при 1000 г. Супернатант центрифугировали при 11000 г. Осадок растворяли в 10 мл той же среды выделения и наносили для разделения на ступенчатый градиент сахарозы [14].

Фракции митохондрий, хлоропластов, пероксисом осторожно отбирали, разбавляли буфером до концентрации сахарозы 0.4 М, центрифугировали 30 мин при 11000 г для осаждения органелл. Мембранные органоиды разрушали осмотическим шоком в растворе 50 мМ Трис-НСl буфера, рН 7.5.

Перекрестное загрязнение митохондриальной фракции идентифицировали по величине активности маркерного фермента митохондрий – сукцинатдегидрогеназы [15]. Загрязнение цитоплазматической и пероксисомальной фракциями определяли, измеряя активности маркерных ферментов цитозоля – алкогольдегидрогеназы [16] и пероксисом – пероксидазы [17].

Выделение тотальной РНК из растительных образцов осуществляли методом гуанидинтиоцианат-фенолхлороформной экстракции [18]. Обратную транскрипцию мРНК проводили с использованием обратной транскриптазы MMLV (“Евроген”, Россия), согласно инструкции производителя. Подбор праймеров осуществляли на основе нуклеотидных последовательностей, представленных в международной базе GeneBank, с помощью программы Primer-BLAST. Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием специфичных праймеров на приборе LightCycler96 (“Roche”, Швеция), с использованием SybrGreen I в качестве красителя. Количество матрицы контролировали с помощью параллельной амплификации фактора элонгации *ef-1α* с ген-специфичными праймерами [19]. Относительный уровень экспрессии исследуемых генов определяли с применением 2<sup>-ΔΔCt</sup>-метода как описано в работе [20].

Очистку ГДГ проводили в четыре стадии при постоянной температуре 4°C. Листья кукурузы гомогенизировали в среде выделения в соотношении 1:5. Фракционирование сульфатом аммония проводили в две стадии: от 0 до до 35% насыщения раствора и от 35 до 70%. Полученный осадок ресуспендировали в 50 мМ Трис-НСl буфере, рН 7.8, в объеме 2 мл. Соли аммония удаляли гель-фильтрацией через колонку с сефадексом G-25. Элюцию белков проводили 50 мМ Трис-НСl буфером, рН 8.0. Последующую ионообменную хроматографию осуществляли на колонке с ДЭАЭ-Sephacel ("Sigma-Aldrich", США). Десорбцию белка проводили линейным градиентом концентрации NaCl от 0.15 до 0.35 М [21]. Десорбция фермента происходила при концентрации NaCl 115 мМ для ГДГ1, 220 мМ для ГДГ2 и 275 мМ для ГДГ3.

Электрофоретические исследования белков проводили в 7.5%-ном полиакриламидном геле [22]. Универсальное окрашивание белков в гелях осуществляли с помощью AgNO<sub>3</sub> [23]. Специфическое проявление ГДГ осуществляли с помощью тетразолиевого метода [24].

Белок определяли по методу Лоури [25]. Содержание белка рассчитывали по формуле:

$$B = EK V_{\text{общ}} / V_{\text{проб}}$$

где,  $E$  — оптическая плотность;  $K$  — перерасчетный коэффициент;  $V_{\text{общ}}$  — общий объем раствора, мл;  $V_{\text{проб}}$  — объем взятой на белок пробы, мл.

Влияние величины рН на скорость ферментативной реакции полученных молекулярных форм ГДГ определяли путем проведения серии измерений скорости ферментативной реакции при различных значениях рН. Константы Михаэлиса полученных ферментных препаратов определяли с использованием в качестве субстрата 2-оксоглутарата.  $K_m$  определяли по графику Лайнуивера—Бэрка методом двойных обратных координат.

Опыты проводили в 3–4-кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Предварительная оценка характера распределения проводилась по асимметрии и эксцессу (Excel, Microsoft Office), а также с помощью критерия Колмогорова—Смирнова. Полученные значения позволили оценить характер распределения как нормальный. Критерий Стьюдента использовался с применением поправки на множественные сравнения (поправка Бонферрони) [26]. Дополнительно применялся однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, который показал, что исследуемый в работе фактор действительно оказывал влияние (влияние фактора достоверно при  $p < 0.05$ ).

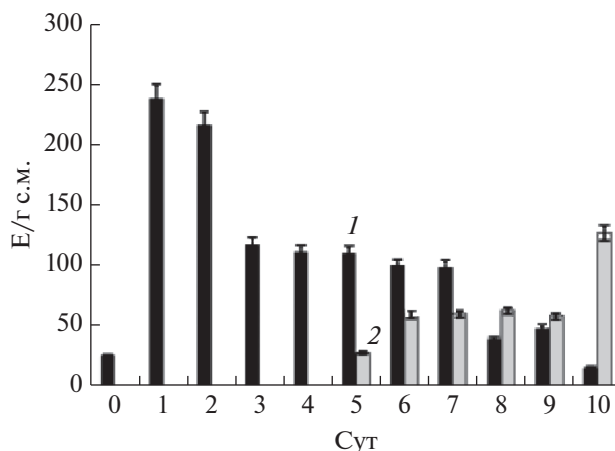


Рис. 1. Ферментативная активность ГДГ в листьях (2) и щитках (1) кукурузы при прорастании.

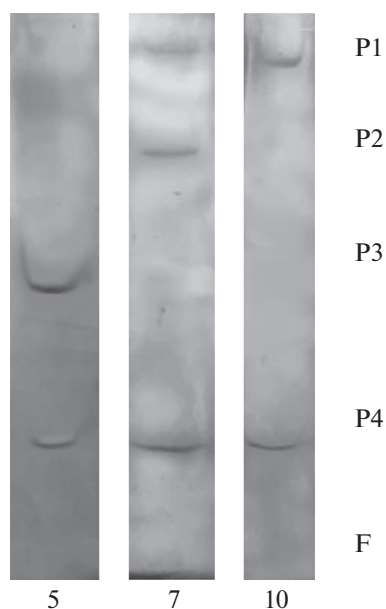
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Измерение активности ГДГ по реакции аминирования в щитках и листьях кукурузы показало, что активность фермента в щитках можно было определить в сухих семенах (рис. 1). В первый же день прорастания активность ГДГ достигала максимального значения в 236.3 Е/г сухой массы и в дальнейшем постепенно снижалась. Появление зеленых проростков кукурузы отмечалось на 5 день прорастания семени. Активность исследуемого фермента с ростом проростков увеличивалась, достигая на 10 сут прорастания максимального значения — 125.9 Е/г. Активность ГДГ в проростках кукурузы по сравнению с щитками несколько ниже, что, вероятно может быть связано с присутствием в зеленых листьях глутаминсинтетазной активности, доминирующей в световых условиях [3].

Из результатов исследования субклеточной локализации ГДГ в листьях кукурузы видно, что ее активность обнаруживалась в цитозоле (9.53%), хлоропластах (3.92%) и наибольшая часть в митохондриях 86.54%, что в целом согласовывалось с имеющимися литературными данными (табл. 1) [22]. В пероксисомальной фракции активности ис-

Таблица 1. Субклеточная локализация активности ГДГ в листьях кукурузы ( $n = 3$ ;  $p \leq 0.05$ )

Фракция органоидов	Общая активность, Е/г сырой массы	Активность фермента, % от общего содержания
Пероксисомы	—	—
Цитоплазма	15.50	9.53
Хлоропласты	6.38	3.92
Митохондрии	140.70	86.54



**Рис. 2.** Изоферментный состав глутаматдегидрогеназы в проростках кукурузы на 5, 6 и 10 сут прорастания: P1, P2, P3, P4 – белковые полосы, F – фронт красителя.

следующего фермента обнаружено не было. Как уже упоминалось, согласно данным, полученным Яковлевой с соавт. [27], ГДГ в корнях кукурузы большей частью локализована в митохондриях. Данные о субклеточной локализации фермента в листьях кукурузы в литературе не было найдено.

Степень перекрестного загрязнения для цитоплазматической фракции не превышала 4.5%, для хлоропластной и митохондриальной фрак-

ций – 10%, для пероксисомальной фракции – 1% (табл. 2).

В связи с тем, что в листьях кукурузы ГДГ в клетке имела различную локализацию, исследовали суммарную активность всех трех субклеточных фракций фермента. Исследование фракции хлоропластов не проводили, так как в них функционирует глутамин-синтетазный путь [28].

При исследовании изменения изоферментного спектра ГДГ при прорастании кукурузы установлено наличие до четырех изоформ ГДГ в разные периоды прорастания со значениями  $R_f = 0.7, 0.4, 0.26, 0.13$  (рис. 2).

Исследование изоферментного состава ГДГ показало, что в щитках в течение 10 сут происходило изменение общей ферментативной активности, в том числе, и за счет появления дополнительных молекулярных форм исследуемого фермента. На 7 сут прорастания в щитках кукурузы наблюдали три молекулярные формы фермента, с различными значениями электрофоретической подвижности, в то время как на 5 и 10 было обнаружено только по две изоформы, обладающие ГДГ активностью.

Из зеленых листьев кукурузы были выделены в результате четырехстадийной очистки высокоочищенные препараты изоформ ГДГ (табл. 4).

Фракционирование сульфатом аммония (до 70% насыщения) и гель-фильтрация на сефадексе G-25 позволили получить препарат с удельной активностью 5.19 Е/мг белка. Проведение ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-Sephacel позволило обнаружить 3 пика активно-

**Таблица 2.** Активность маркерных ферментов, используемых для определения чистоты фракций ( $n = 3; p \leq 0.05$ )\*

Фракция	Активность СДГ		Активность АДГ		Активность каталазы		Содержание хлорофилла	
	Е/мл	%	Е/мл	%	Е/мл	%	мг/мл	%
Цитоплазма	0.03	4.05	5.20	86.52	н/о	н/о	2.08	2.49
Хлоропласты	0.07	9.50	0.40	6.65	0.01	7.69	80.70	96.54
Митохондрии	0.64	86.50	0.35	5.82	0.01	7.69	0.81	1.51
Пероксисомы	н/о	н/о	0.06	1.00	0.11	84.60	н/о	н/о

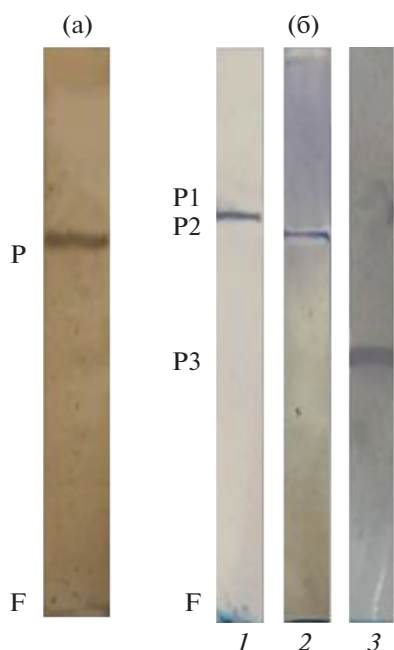
\* н/о – не обнаружено.

**Таблица 3.** Праймеры к генам ГДГ

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, °С
<i>gdh-1</i>	Прямой	GCGGAGAACAAGGGGATCAA	58
	Обратный	ACAGGATCTCGTCTGCCTCT	
<i>gdh-2</i>	Прямой	TGATCCAGAGGCAGACGAGA	60
	Обратный	GTAATGCGCGGTCAATGGTC	

**Таблица 4.** Стадии очистки изоформ глутаматдегидрогеназы из листьев кукурузы

Стадия		Объем, мл	Белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат		110.0	241.0	478.0	1.9	100.0	1.0
Фракционирование сульфатом аммония, 70% насыщения		3.0	72.7	313.0	4.3	65.4	2.2
Гель-фильтрация через сефадекс G-25		6.0	57.5	298.6	5.2	62.0	2.6
ДЭАЭ- сефадекс	ГДГ1	2.5	0.2	38.6	195.0	8.0	98.0
	ГДГ2	2.5	0.9	156.2	166.0	32.0	83.0
	ГДГ3	2.0	0.8	101.3	122.2	21.0	61.0

**Рис. 3.** Электрофореграмма очищенного препарата ГДГ (а): Р – белковая полоса, окраска ГДГ1 с использованием нитрата серебра, б – специфическое проявление ГДГ. Р1, Р2, Р3 – белковые полосы для препаратов ГДГ1 (1), ГДГ2 (2) и ГДГ3 (3), F – фронт красителя.

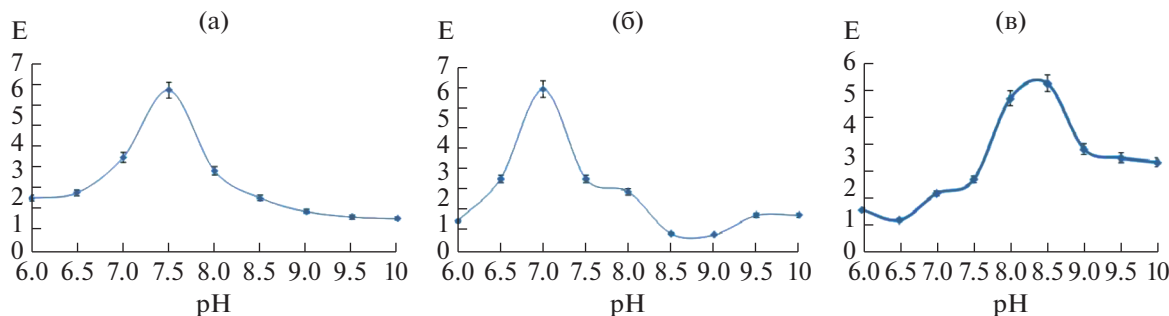
сти ГДГ, которые десорбировали хлористым натрием.

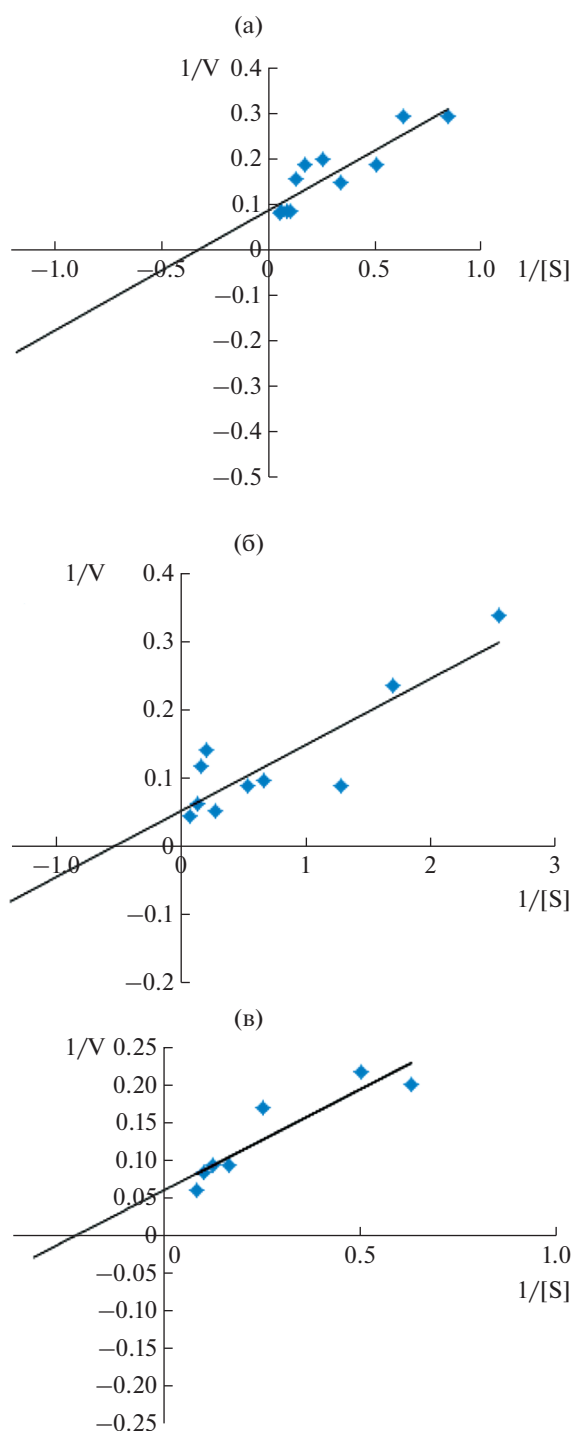
Очищенная ГДГ1 имела удельную активность 195 Е/мг белка, при этом степень очистки составила 98 раз с выходом 8%. Вторая форма (ГДГ2) имела удельную активность 166 Е/мг белка, степень очистки – 83 и выход 32%. Ферментный препарат ГДГ3 имел удельную активность 122.2 Е/мг белка, степень очистки 61 и выход 21%.

Проведение электрофореза в ПААГ с универсальным окрашиванием белков нитратом серебра позволило установить, что ГДГ1 была получена в гомогенном состоянии, в то время как две других формы ГДГ2 и ГДГ3 являлись высокоочищенными, так как присутствовали сопровождающие белки (рис. 3а). Модифицированным тетразолиевым методом окрашивания была показана принадлежность полученного очищенного белка к ГДГ (рис. 3б). Значения  $R_f$  для трех форм фермента составили: для ГДГ1 – 0.26, для ГДГ2 – 0.3 и ГДГ3 – 0.7.

Для очищенных изоферментов были определены оптимумы pH: для ГДГ1 – 7.5, ГДГ2 – 7.0 и ГДГ3 – 8.5 (рис. 4).

Все три ферментных препарата имели различные значения  $K_m$  при использовании в качестве

**Рис. 4.** Зависимость активности полученного препарата глутаматдегидрогеназы от значения pH для реакции восстановительного аминирования 2-оксоглутарата: а – ГДГ1; б – ГДГ2; в – ГДГ3.



**Рис. 5.** Определение константы Михаэлиса полученного ферментного препарата: а – ГДГ1; б – ГДГ2; в – ГДГ3 по 2-оксоглутарату.

**Таблица 5.** Значения констант Михаэлиса и оптимальных значений рН для изоферментов глутаматдегидрогеназы ( $n = 3, p \leq 0.05$ )

Изоформа ГДГ	рН оптимум	$K_m$ по 2-ОГ, мМ
ГДГ1	7.5	$0.34 \pm 0.01$
ГДГ2	7.0	$0.60 \pm 0.01$
ГДГ3	8.5	$0.22 \pm 0.01$

субстрата 2-оксоглутарата (рис. 5, табл. 5), что указывало на различные скорости протекания реакции восстановительного аминирования, катализируемого различными изоформами ГДГ.

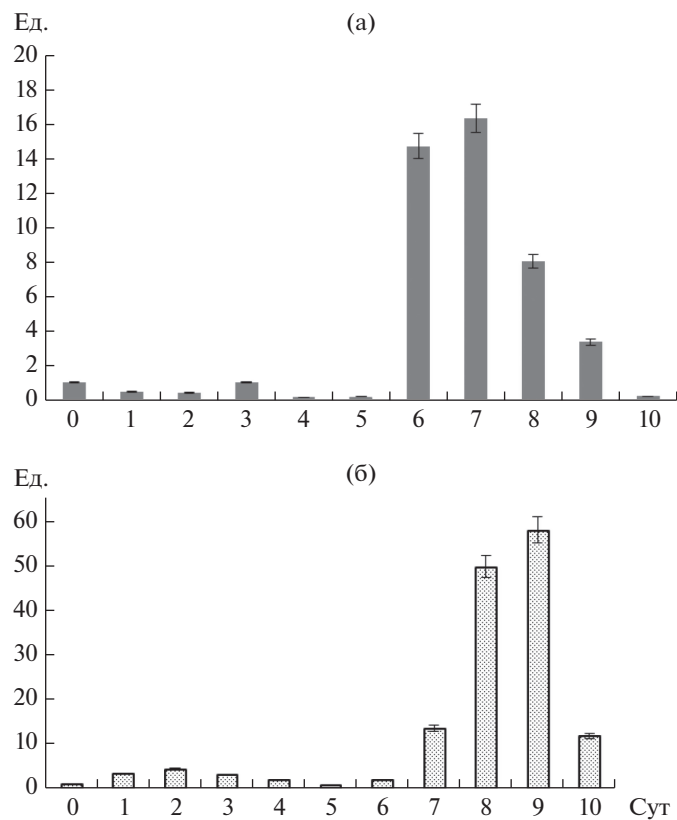
Можно предположить, что субъединичный состав полученных изоформ ГДГ также различен, поскольку полипептиды ГДГ кодируются различными генами – *gdh-1* и *gdh-2*.

Из литературных данных известно, что активация ферментов при набухании семени возможна двумя способами: путем пост-трансляционной модификации и синтезом *de novo* с помощью активации работы соответствующих генов [29–33]. В связи с этим, были исследованы молекулярные аспекты функционирования генов, кодирующих ГДГ в клетках кукурузы. Количественную оценку уровня транскриптов генов осуществляли путём проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием специфических праймеров (табл. 3). Изменение относительного уровня транскриптов гена *gdh-1* в щитках при прорастании семян кукурузы показало, что начиная с момента их набухания в щитках кукурузы наблюдалась значительная транскрипционная активность, которая постепенно снижалась вплоть до 3 сут прорастания, после чего на 6 сут восстанавливалась (рис. 6а). Максимум значений относительного уровня транскриптов гена *gdh-1* отмечался на 7 сут прорастания семян. В последующие дни транскрипционная активность гена снижалась более чем в 7 раз.

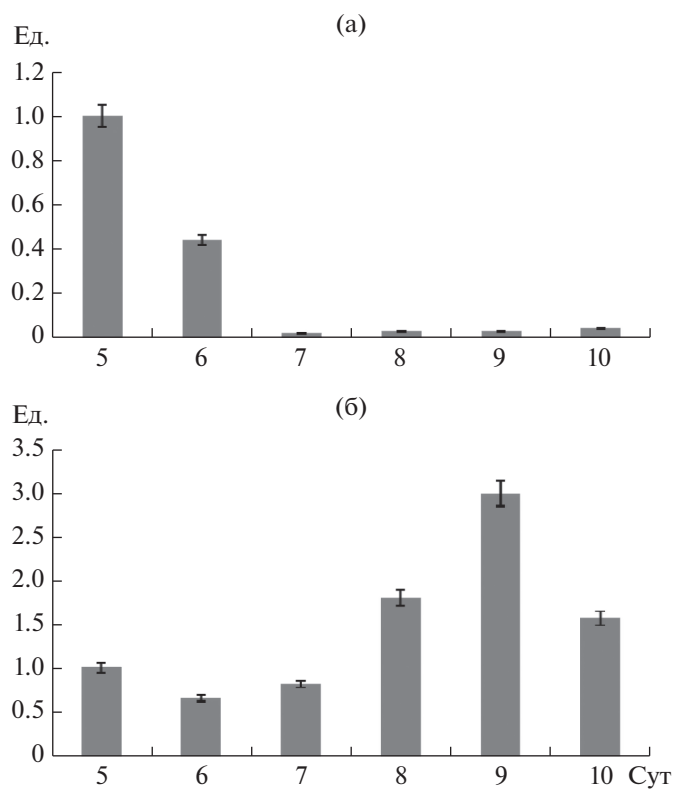
Транскрипция гена *gdh-1* приводит к синтезу  $\beta$ -субъединиц ГДГ, что в свою очередь способствует смещению равновесия ферментативной реакции в сторону аминирования, то есть образования глутамата. Исследование транскрипционной активности гена *gdh-1* показало, что в первые 5 сут прорастания семян активность этого гена минимальна. Начиная с шестого дня прорастания отмечается скачок относительного уровня транскриптов гена *gdh-1*, что, вероятно, связано с включением фотосинтезирующей системы, обеспечивающей приток глутамата через глутаминсинтетазную систему [28].

Известно, что ген *gdh-2* в геноме кукурузы кодирует  $\alpha$ -субъединицу ГДГ, преобладание которой в структуре фермента приводит к смещению равновесия в сторону реакции дезаминирования глутамата [4]. Исследование относительного уровня транскриптов гена *gdh-2* в щитках показало, что в первые 5 сут прорастания транскрипционная активность гена минимальна (рис. 6б). Однако, начиная с седьмых суток прорастания концентрация мРНК гена *gdh-2* увеличивалась более чем в 13 раз относительно значений, зарегистрированных для семян через несколько часов после набухания.





**Рис. 6.** Относительный уровень транскриптов гена *gdh-1* (а) и гена *gdh-2* (б) глутаматдегидрогеназы в щитках при прорастании семян кукурузы.



**Рис. 7.** Относительный уровень транскриптов *gdh-1* (а) и гена *gdh-2* (б) глутаматдегидрогеназы при прорастании в проростках кукурузы.

При набухании и прорастании семян активация метаболических процессов происходит по каскадному механизму. Еще до наступления момента набухания и последующего прорастания в семени содержится определенный набор ферментов, обеспечивающих в первое время нормальное развитие растения. Активация этого “минимального набора” в семени происходит в момент его набухания [33].

Исследование транскрипционной активности генов ГДГ в прорастающих растениях показало, что транскрипционная активность гена *gdh-1*, кодирующего  $\beta$ -субъединицу ГДГ, имела нисходящий характер (рис. 7а). Однако, следует отметить, что относительный уровень транскриптов другого гена *gdh-2*, кодирующего  $\alpha$ -субъединицу, наоборот, возрастал, что свидетельствовало об увеличении роли ГДГ в листьях прорастающей кукурузы как поставщика 2-оксоглутарата (рис. 7б). Полученные результаты измерения относительного уровня транскриптов исследуемого гена полностью согласовывались с результатами измерения общей ферментативной активности (рис. 1).

Таким образом, исследование активности ГДГ в щитках и листьях кукурузы показало его важную роль в качестве первого фермента, участвующего в прорастании семени. Изменение относительного уровня транскриптов генов *gdh-1* и *gdh-2* показало, что активация ГДГ при прорастании семени происходит путем посттрансляционной модификации пре-ГДГ, находящейся в семени в состоянии покоя. Фермент менее активен в листьях, что связано, в первую очередь, с наличием в них доминирующего глутаминсинтетазного пути. Следует обратить внимание на изменение транскрипционной активности обоих генов в кукурузе в процессе прорастания. Клетки растений снижают синтез полипептидов  $\beta$ -субъединицы, пропорционально увеличивая синтез  $\alpha$ -субъединиц, что обуславливает увеличение скорости дезаминирования, обеспечивающего синтез 2-оксоглутарата.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bown A.W., Shelp B. // Plant Science. 2016. V. 21. № 10. P. 811–813.
2. Hudson R.C., Daniel R.M. // Comp. Biochem. Physiol. 1993. V. 106. № 4. P. 767–792.
3. Santero E., Ana B. Hervás, Canosa I. and Govantes F. // INTECH. 2012. P. 289–318. <https://doi.org/10.5772/47767>
4. Purnell M.P., José R. Botella // Plant Physiol. 2007. V. 143. № 1. P. 530–539.
5. Consalvi V., Chiaraluce R., Millevoi S., Pasquo A., Politi L., De Rosa M., Scandurra R. // Comp. Biochem. Physiol. B. 1994. V. 109. P. 691–699.
6. Grabowska A., Zdunek-Zastocka E., Kutryn E., Kwinta J. // Acta Physiol Plant. 2017. V. 24. doi.org/ <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2322-4>
7. Hudson R.C., Daniel R.M. // Comp Biochem Physiol. 1993. V. 106. P. 767–792.
8. Dubois F., Tercé-Laforgue T., Gonzalez-Moro M.B., Estavillo J.M., Sangwan R., Gallais A., Hirel B. // Plant. Physiol. Biochem. 2003. V. 41. P. 565–576
9. Anderson B.M. // Arch. Biochem. Biophys. 1993. V. 300. P. 483–488.
10. Fontaine Jean-Xavier, Tercé-Laforgue T., Bouton S., Pageau K., Lea P., Dubois F., Hirel B // Plant Signaling and Behavior. 2013. V. 8. № 10. P. 4161–4163.
11. Флоренская Т.Г., Космачевская О.В, Топунов А.Ф. // Изд-во Науч.-исслед. ин-т сел. хоз-ва Крыма. Симферополь. 2017. № 4(12). С. 18–30.
12. Sarasketa A., Gonzalez-Moro M.B., Gonzalez-Murua C., Marino D. // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 1–12.
13. Yamaya T., Oaks A., Matumoto H. // Plant Physiology. 1984. V. 76. P. 1009–1013.
14. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981. 288 с.
15. Попов В.Н., Епринцев А.Т., Федорин Д.Н. // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 3. С. 409–415.
16. Pathuri I.P., Reitberger I.E., Hückelhoven R., Proels R.K. // J. Exp. Bot. 2011. V. 10. P. 3449–3457.
17. Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений. Л.: Колос, 1972. С. 107–108.
18. Chomczynski P., Sacchi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 156–159.
19. Livak K.J., Schmittgen T.D. // Methods. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408.
20. Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 2907–2914.
21. Hudson R.C., Daniel R.M. // Comp. Biochem. Physiol. 1993. V. 106. P. 767–792.
22. Davis B.J. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1994. V. 121. P. 404–427.
23. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. // Anal. Chem. 1996. V. 68. P. 850–858.
24. Magalhaes J.R., Ju G.C., Rich P.J., Rhodes D. // Plant Physiol. 1990. V. 94. P. 647–656.
25. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
26. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 351 с.
27. Яковлева В.И., Кретович В.Л., Гильманов М.К. // Биохимия. 1964. Т. 29. №3. С. 463–469.
28. Измайлов С.Ф. Азотный обмен в растениях. М.: Наука, 1986. 320 с
29. Kruger J.E., La Berge D.E. // Cereal Chem. 1974. V. 51. № 5. P. 578–585.
30. Anstine W., Jacobsen J.V., Scandalios J.G., Varner J.E. // Plant Physiol. Lancaster. 1970. V. 45. P. 148–152.
31. Tao K.L., Khan A.A. // Plant Physiology. 1975. V. 56. № 6. P. 797–800.
32. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Karabutova L.A., Igamberdiev A.U. // J. Plant Physiol. 2016. V. 205. P. 33–40.
33. Томас Г. Жизнеспособность семян. М.: Колос, 1978. С. 341–373.

## Catalytic and Molecular Aspects of Functioning of Glutamate Dehydrogenase Isoform in Corn *Zea mays* L.

A. T. Eprintsev<sup>a,\*</sup>, G. B. Anokhina<sup>a</sup>, P. S. Оуа<sup>a</sup>, and Ya. I. Dedov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Voronezh State University, Voronezh, 394006 Russia

\*e-mail: bc366@bio.vsu.ru

The dynamics of the activity of glutamate dehydrogenase (GDH, EC 1.4.1.2) during germination in leaves and scutes of corn has been studied. It was found that changes in activity are due to both biochemical and molecular aspects of the enzyme functioning, which is confirmed by the results of a study of the relative level of transcripts of the *gdh-1* and *gdh-2* genes encoding GDH subunits. It was shown that this enzyme in leaves is mainly localized in mitochondria (86.54%), and to a lesser extent in the cytosol (9.53%) and chloroplasts (3.92%). Four-stage purification made it possible to isolate three GDH enzyme preparations from corn leaves with different purification levels. One form (GDH1) was purified to a specific activity of the enzyme preparation of 195 U/mg protein with a purification rate of 98 times and a yield of 8%. The second form (GDH2) was obtained with a specific activity of 166 U/mg protein, a purification rate of 83 times and a yield of 32%. The GDH3 preparation had a specific activity of 122.2 U/mg protein, a purification rate of 61 times, and a yield of 21%. The pH optimum was determined by the amination reaction. For GDH1, the optimum of the pH values is 7.5, for GDH2 and GDH3, 7.0 and 8.5, respectively. The obtained isoforms of GDH have different  $K_m$  values for 2-oxoglutarate: 0.34 mM for GDH1, and for GDH2 and GDH3, 0.6 mM and 0.22 mM, respectively.

**Keywords:** glutamate dehydrogenase, maize, germination, purification, isozymes, subcellular localization, expression

УДК 581.1

## РЕАКЦИЯ РАСТЕНИЙ *Nicotiana tabacum*, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ГЕНОМ ХОЛИНОКСИДАЗЫ (*codA*), НА ДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

© 2021 г. И. Г. Широких<sup>1,2, \*</sup>, С. Ю. Огородникова<sup>2</sup>, Я. И. Назарова<sup>1</sup>, О. Н. Шуплецова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого, Киров, 610007 Россия

<sup>2</sup>Институт биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, 167982 Россия

\*e-mail: irgenal@mail.ru

Поступила в редакцию 04.06.2020 г.

После доработки 30.09.2020 г.

Принята к публикации 02.11.2020 г.

Генная инженерия синтеза глицинбетаина (ГБ) предлагает новый подход к повышению продуктивности и стресс-устойчивости культурных растений. Для выяснения возможного влияния бактериальной гетерологичной последовательности на реакцию растений при окислительном стрессе (ОС), индуцированном 3 мМ пероксидом водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), использовали независимые трансгенные линии табака (*Nicotiana tabacum* L.) Cod 16 и Cod 45 с геном холиноксидазы (*codA*) из *Arthrobacter globiformis*, отвечающим за синтез глицинбетаина. Трансгенные линии отличались от исходных растений меньшей устойчивостью к действию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, что выразилось в более значительном снижении пула фотосинтетических пигментов, большей интенсивности перекисного окисления липидов, динамике активности супероксиддисмутазы (СОД) и пероксидазы (ПО). По показателям, характерным для проявления ОС, трансгенные линии с первоначально близкими значениями накопления ГБ (0.825–0.910 мкмоль/г) имели между собой существенные различия. У линии Cod 16 реакция на индукцию ОС заключалась в более раннем (через 1 ч после обработки H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и более значительном, чем у Cod 45 и исходного сорта, повышении активности ПО и содержания пролина. У линии Cod 45 наблюдали значительное увеличение активности ПО и СОД, содержания пролина в ответ на индукцию ОС через 24 ч после обработки и, в отличие от исходного сорта и линии Cod 16, сопровождавшемся существенным повышением содержания в листьях каротиноидов. При использовании методов генной инженерии для повышения продуктивности и стрессоустойчивости растений необходимо учитывать функциональное взаимодействие антиоксидантов и осмопротекторов.

**Ключевые слова:** окислительный стресс, глицинбетаин, малоновый диальдегид, пролин, антиоксидантные ферменты, пластидные пигменты

**DOI:** 10.31857/S0555109921020148

Воздействие на растения таких стрессовых факторов, как засуха, повышенная соленость или кислотность почвы, ионная токсичность, экстремальные температуры, существенно снижает продуктивность сельскохозяйственных культур. Потери, обусловленные различными абиотическими стрессами, составляют в общих потерях сельского хозяйства США и России порядка 70–80% [1]. Актуальность изучения механизмов устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды обусловлена также прогнозируемым увеличением площади территорий, подверженных стрессовым воздействиям, в связи с постоянным ростом народонаселения и глобальными изменениями климата [2].

Воздействия на растения различных абиотических стрессов имеют между собой много общего. Как известно, у растений разных видов в ответ на действие стресс-факторов различной природы происходит избыточное образование активных

форм кислорода (АФК), что принято рассматривать как окислительный стресс (ОС), приводящий к повреждению практически всех компонентов клетки [3, 4]. Исследования последних двух десятилетий показали, что различные стрессы также влекут за собой снижение в клетках содержания воды и связанное с этим нарушение водного баланса. При этом большинство адаптационных реакций у растений направлено на стабилизацию и защиту клеточных структур путем синтеза соединений со стресс-протекторными свойствами, в частности, различных антиоксидантов (АО) и совместимых осмолитов.

В литературе есть сведения о связи между функционированием систем ионного гомеостатирования и антиоксидантной защиты растений [5, 6], однако до конца связь между активностью антиоксидантных ферментов и устойчивостью растений к действию стрессоров остается пока не

выясненной. Это объясняется сложностью и взаимозависимостью различных механизмов устойчивости, а также функциональным взаимодействием различных компонентов антиоксидантной системы, в том числе скорее, ферментативных и низкомолекулярных АО. Помимо АО белковой природы и низкомолекулярных, способность прямо и косвенно взаимодействовать с АФК проявляют и многие другие соединения, накапливающиеся в растительных клетках в большом количестве, например, пролин и другие осмопротекторы. Эти соединения и ранее хорошо известные “классические” АО находятся в сложном функциональном взаимодействии [3]. Несмотря на то, что механизмы антиоксидантной защиты растений в стрессовых условиях активно исследуются, до сих пор влияние одних ее звеньев на функционирование других остается слабо изученным. Таковым остается вопрос о том, что происходит с ферментами антиоксидантной защиты и низкомолекулярными АО при повышении содержания в растениях глицинбетаина (триметилглицина) — одного из эффективных осмопротекторов, который накапливается в значительных количествах в клетках некоторых растений в ответ на высокую соленость, холод и засуху. Знание особенностей такого взаимодействия необходимо для установления связи между показателями функционирования антиоксидантной системы растений и их стресс-устойчивостью.

У большинства растений, включая культурные виды, уровень естественного накопления глицинбетаина (ГБ) бывает слишком низким для адекватной регуляции осмотического давления в условиях стресса. Однако трансгенные формы, содержащие бактериальный ген холиноксидазы, способны к сверхнакоплению ГБ и проявляют устойчивость к различным абиотическим стрессам, связанном с нарушением водного обмена [7–10]. Описаны примеры снижения активности отдельных антиоксидантных ферментов и окислительных повреждений при генетических трансформациях, увеличивающих накопление ГБ [6, 11].

Известно, что ключевым событием при действии водного дефицита, солевого стресса и других повреждающих факторов, является образование пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) [4, 12]. Как сигнальный посредник  $H_2O_2$  задействован в активации системы антиоксидантной защиты, индукции накопления совместимых осмолитов, а также в регуляции ионного гомеостаза растительных клеток [13]. В связи с этим систему антиоксидантной защиты растения можно активировать посредством его обработки экзогенным  $H_2O_2$ , как модулятором окислительного стресса.

Цель работы — изучение реакции пула фотосинтетических пигментов и отдельных компонентов антиоксидантной системы на воздействие ОС, индуцированный пероксидом водорода, у расте-

ний табака исходного сорта и линий, трансформированных геном бактериальной холиноксидазы.

## МЕТОДИКА

В работе использовали растения *Nicotiana tabacum* L. исходного сорта Самсун и линии Cod 16 и Cod 45, независимо трансформированные геном *codA*, кодирующим холиноксидазу (КФ 1.1.3.17) бактерии *Arthrobacter globiformis*. Целевой ген *codA* был снабжен сигнальной последовательностью, которая обеспечивала доставку фермента холиноксидазы внутрь пластидного компартмента [14]. Пробирочные растения с молекулярно подтвержденной экспрессией гена *codA* были предоставлены Г.Н. Ралдугиной (ИФР им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия). Растения табака микроклонально размножили на среде МС [15] без гормонов и витаминов, а при достижении возраста 6 нед. (хорошо сформированная корневая система) перенесли в почву и выращивали в климатической камере “Пка” при 25/18°C (день/ночь), освещении 4000 лк и фотопериоде 16 ч [16]. Через 7 нед. после адаптации к почвенным условиям растения подвергали ОС. В качестве модулятора ОС применяли обработку листьев табака пероксидом водорода в концентрации 3.0 мМ  $H_2O_2$ .

Для биохимических анализов использовали пластинки зрелых листьев от шести растений в каждом варианте. Сырую биомассу листьев определяли обычным гравиметрическим методом, для определения сухой биомассы — листья высушивали при 103°C до постоянного веса.

Содержание в листьях малонового диальдегида (МДА), активность антиоксидантных ферментов определяли дважды — через 1 и 24 ч после обработки растений экзогенным  $H_2O_2$ , фотосинтетические пигменты и пролин определяли однократно, через 24 ч, ГБ — однократно, до обработки растений  $H_2O_2$ .

Содержание фотосинтетических пигментов после экстракции ацетоном определяли на спектрофотометре Specol (“Analytik Jena”, Германия) при длинах волн 662, 644 (хлорофиллы) и 440.5 нм (каротиноиды) [17] и выражали в мг/г сухой массы. Значения коэффициентов вариации для содержания в листьях хлорофиллов *a* и *b*, каротиноидов не превышали 8%.

Содержание ГБ определяли спектрофотометрически с солью Рейнеке [18], как описано в руководстве [19].

Содержание МДА определяли спектрофотометрически по образованию окрашенного комплекса с тиобарбитуровой кислотой при нагревании [20].

Экстракцию свободного пролина и его определение проводили по методу [21].

Определение общей активности СОД (КФ 1.15.1.1) проводили по методу [22], основанному на ингибировании СОД фотохимического восстановления нитросинего тетразолия до формазана.

Активность пероксидазы (ПО, КФ1.11.1.11) определяли спектрофотометрически по скорости окисления гваякола [23]. Все данные выражали в пересчете на сухую массу растений.

Полученные данные обрабатывали методами параметрической статистики Microsoft Excel 2007 и выражали как средние арифметические величины из трех биологических повторностей  $\pm$  стандартная ошибка средней величины.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В листьях растений исходного сорта ГБ не был обнаружен, тогда как у трансгенных линий Cod 16 и Cod 45 его концентрации составили соответственно 0.825 и 0.910 мкмоль/г, что можно объяснить конститутивной экспрессией *codA* трансгена под контролем 35S CaMV промотора. Известно, что даже в небольших (субмиллимолярных) концентрациях ГБ эффективен при снятии стрессов, связанных с нарушением обводненности тканей растения [24].

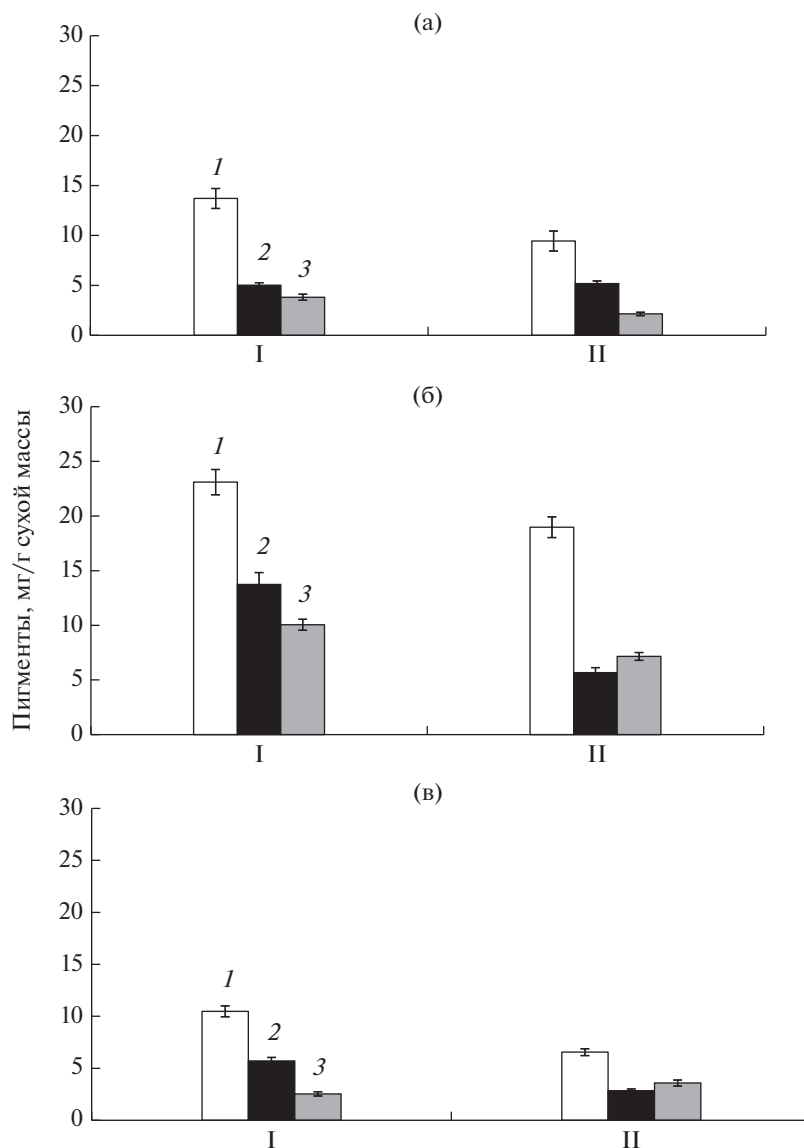
Одним из проявлений окислительного стресса для растений является нарушение функционирования фотосинтетического аппарата. В нормальных условиях линии табака, экспрессирующие ген *codA* из *A. globiformis*, существенно различались между собой по величине пула фотосинтетических пигментов. Так, линия Cod 16 характеризовалась существенно более высоким, а линия Cod 45 более низким, чем растения исходного генотипа, содержанием фотосинтетических пигментов. В результате обработки листьев табака 3 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> наблюдали резкое сокращение в течение суток количества пластидных пигментов по сравнению с интактными растениями (рис. 1). Суммарное содержание хлорофиллов *a* и *b* у растений сорта Самсун, линий Cod 16 и Cod 45 снизилось на 22, 33 и 42% соответственно. При этом у трансформированных линий сократилось содержание хлорофиллов обоих типов, в отличие от исходного сорта, у которого содержание хлорофилла *b* практически не изменилось в результате обработки H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Окислительный стресс приводит к повреждению практически всех компонентов клетки, вызывает усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ), в результате чего накапливается продукт их распада – МДА. Под влиянием пероксида водорода у растений табака исходного сорта содержание МДА в листьях возрастало в течение 1 ч на 60%, но через сутки снижалось, и превышение над интактными растениями составляло не более 9% (рис. 2). Иная динамика в накоплении МДА

прослеживалась в листьях трансформированных растений. В первый срок наблюдений (через 1 ч) увеличение интенсивности ПОЛ у них было гораздо менее значительным, чем у исходного сорта и составило всего 22–24%. Через сутки содержание МДА в обработанных пероксидом водорода листьях увеличилось в 1.9 (линия Cod 16) и 2.2 (линия Cod 45) раза по сравнению с интактными растениями. Эти результаты хорошо согласовывались с данными о более значительном повреждении пигментного комплекса при индукции ОС у трансформантов по сравнению с растениями исходного сорта. Возможной причиной снижения устойчивости к ОС у линий, трансформированных геном бактериальной холиноксидазы, могло быть косвенное влияние ГБ, пока мало изученное, на экспрессию нескольких эндогенных генов в трансгенных растениях [25–27]. Возможно также участие ГБ в работе сразу нескольких метаболических путей: фотосинтез, репликация ДНК, трансдукция сигналов и биосинтез растительных гормонов, недавно установленное при секвенировании транскриптомов томатов, трансформированных геном *codA* и исходной линии [28]. Во многих исследованиях показана положительная корреляция между накоплением ГБ и стресс-устойчивостью растений, однако полученные в настоящей работе результаты с ними не вполне согласуются. В то же время, некоторые авторы отмечают существование в отношении действия ГБ на АФК возрастной периодизации и тканевой специфичности [6]. Например, положительные эффекты, связанные с локализацией ГБ в трансгенных по *codA* растениях томата, были наиболее выраженными в тканях генеративных органов (цветки, плоды), а не в листьях [24, 26].

Известно, что для регулирования уровня АФК и избегания окислительных повреждений у растений выработана система антиоксидантной защиты, состоящая из ферментов и низкомолекулярных веществ. При их скоординированной работе АФК не накапливаются в токсичных количествах, и опасность возникновения окислительных повреждений значительно снижается. К числу эффективных низкомолекулярных АО принадлежат каротиноиды. Содержание каротиноидов в ответ на обработку листьев табака пероксидом водорода снизилось на 44% у исходного сорта Самсун и на 29% у линии Cod 16 (рис. 1). В тех же условиях у линии Cod 45, напротив, наблюдали увеличение содержания каротиноидов на 41% по сравнению с интактными растениями.

Имеются сведения об антиоксидантных свойствах известных осмопротекторов, в частности пролина, что указывает на полифункциональность этого соединения [3]. В обычных условиях содержание пролина в листьях табака линии Cod 16 в 3.7 раз выше содержания у исходного сорта, а у линии Cod 45 в 3.9 раз ниже, чем у исходного

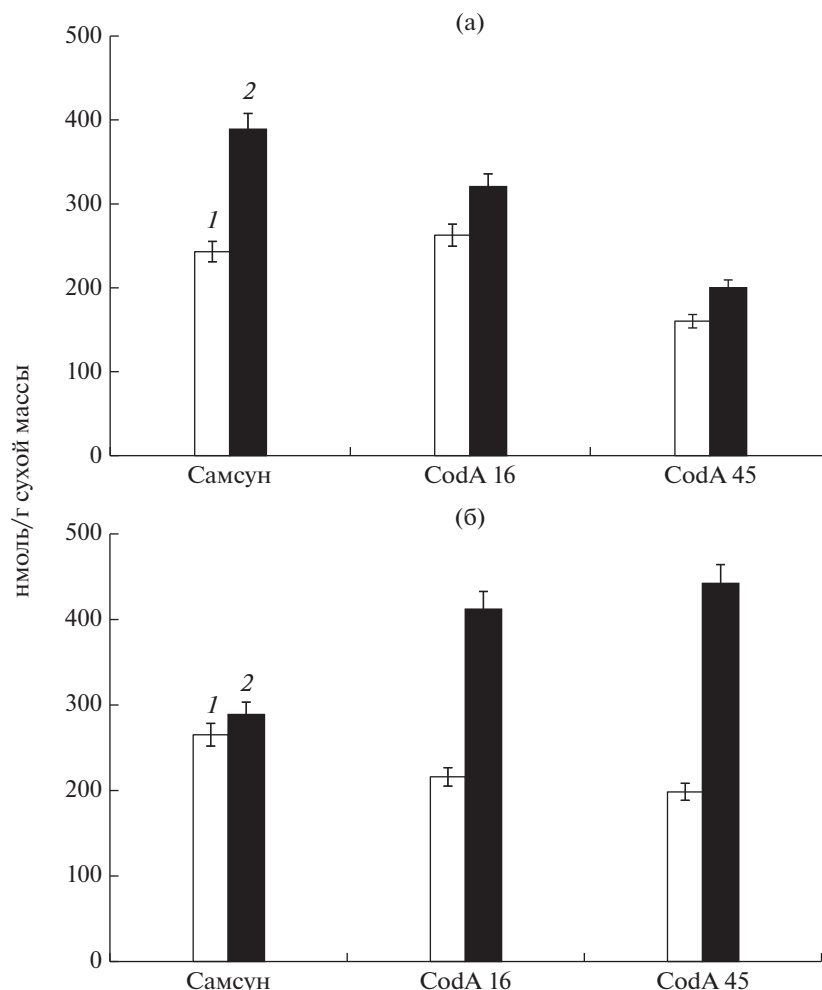


**Рис. 1.** Изменение пула фотосинтетических пигментов (мг/г сухой массы) в листьях табака исходного сорта (а) и трансгенных линий Cod 16 (б) и Cod 45 (в) в результате обработки перексидом водорода: 1 – хлорофилл а, 2 – хлорофилл b, 3 – каротиноиды. I – контроль, II – обработка 3 мМ Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>.

сорта (рис. 3). Под влиянием пероксида водорода содержание пролина увеличивалось в листьях линии Cod 16 в 1.9 раза, а линии Cod 45 – в 4.4 раза по сравнению с интактными растениями. В литературе уже сообщалось о способности ГБ вызывать в растениях сверхнакопление других осмолитов, включая пролин [29]. Опираясь на эти данные и собственные результаты, можно предположить, что значительные различия в содержании пролина между линиями трансформантов объяснялись более стабильной экспрессией встроенного гена у линии Cod 16 по сравнению с Cod 45. В пользу этого предположения свидетельствует также более высокая у линии Cod 16 сохранность пула фотосинтетических пигментов (рис. 1) и менее значи-

тельное, чем у линии Cod 45, накопление МДА (рис. 2).

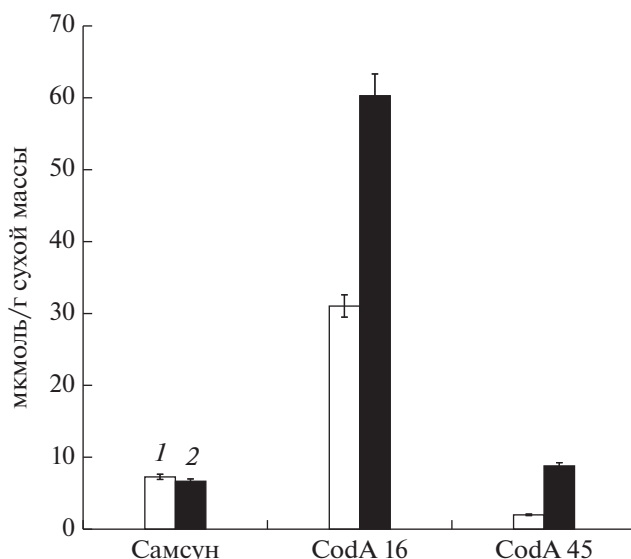
Важным механизмом поддержания гомеостаза подвергнутых окислительному стрессу клеток является активация антиоксидантных ферментов, в частности – СОД, которая превращает супероксидные анион-радикалы в Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>, и ПО, которая обезвреживает Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> [3, 4]. У табака исходного сорта показатели активности СОД и ПО через 1 ч после индукции ОС имели значения более низкие, чем у интактных растений (рис. 4а и 4в). Лишь спустя 24 ч после обработки листьев Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> наблюдали повышение на 64% активности СОД (рис. 4б) и на 16% активности ПО (рис. 4г). У трансформированных геном холиноксидазы рас-



**Рис. 2.** Изменение содержания МДА (нмоль/г сухой массы) в листьях табака через 1 (а) и 24 ч (б) после обработки пероксидом водорода: 1 – контроль, 2 – обработка 3 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

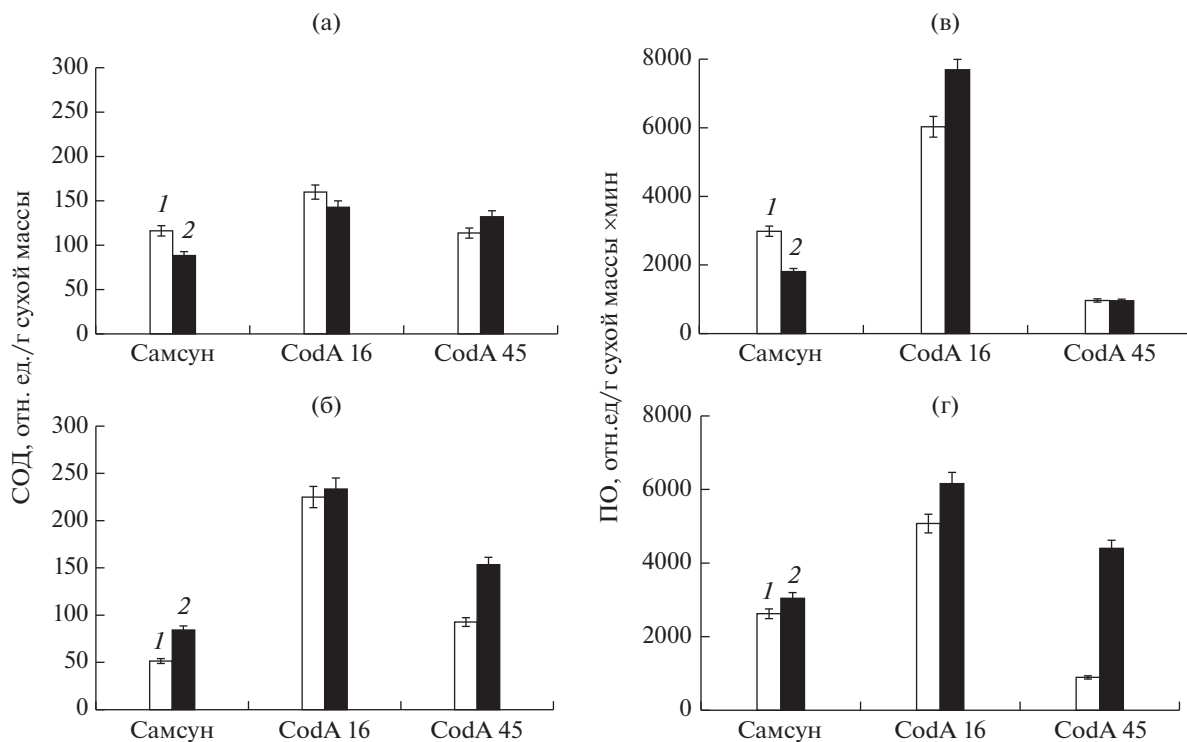
тений активность ПО при обработке H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> изменялась различным образом. В листьях растений линии Cod 16 ПО активировалась сразу и в течение суток сохранялась на уровне, превышающем уровень у интактных растений на 21–28%, тогда как у линии Cod 45 нарастание активности ПО было постепенным, но более значительным (рис. 4в и 4г). Через сутки уровень активности ПО в листьях линии Cod 45 был в 4.9 раза выше уровня ПО у контрольных растений. Также постепенно повышалась под воздействием агента ОС у этой линии и активность СОД, которая через 1 ч после обработки превысила на 16%, а через 24 ч – на 66% уровень контрольных растений (рис. 4а и 4б). У линии Cod 16, напротив, обработка H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> существенных изменений в активности СОД по сравнению с интактными растениями, не вызвала.

Таким образом, степень окислительных повреждений возрастала в ряду исследованных генотипов: Самсун < Cod 16 < Cod 45. Трансформированные бактериальным геном холиноксидазы *codA* растения табака отличались меньшей устой-



**Рис. 3.** Содержание пролина (мкмоль/г сухой массы) в листьях табака исходного сорта и трансгенных линий Cod 16 и Cod 45 через 24 ч после обработки пероксидом водорода: 1 – контроль, 2 – обработка 3 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.





**Рис. 4.** Активность СОД (а, б, отн. ед./г сухой массы) и ПО (в, г, отн. ед./г сухой массы · мин) через 1 (а, в) и 24 ч (б, г) после обработки листьев табака пероксидом водорода: 1 – контроль, 2 – обработка 3 мМ Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>.

чивостью к действию пероксида водорода по сравнению с растениями исходного сорта, что выразилось в более значительном снижении пула фотосинтетических пигментов и накоплении продуктов ПОЛ, изменении активностей ПО и СОД после обработки агентом ОС. Различия в ответных реакциях на воздействие Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> между линиями трансформантов были не менее существенными, чем различия между ними и исходным сортом. У растений линии Cod 16 активность ПО и содержание пролина повышались в ответ на действие агента ОС гораздо раньше (через 1 ч после обработки), чем у линии Cod 45, и имели более выраженный характер, тогда как изменений в активности СОД у данной линии не выявлено. У линии Cod 45 в ответ на индукцию ОС повышалось содержание пролина и происходило значительное увеличение активности как ПО, так и СОД, но только спустя 24 ч после обработки, и сопровождалось, в отличие от исходного сорта и линии Cod 16, существенным повышением (на 41%) содержания в листьях каротиноидов, выполняющих у растений, наряду с фотосинтетической функцией, функцию низкомолекулярных антиоксидантов.

Существенные различия между двумя линиями трансформантов, очевидно, связаны с местом встраивания транслоцируемого участка ДНК. Дифференциальная локализация трансгена в различных линиях табака, может объяснить разницу как в накоплении ГБ, так и в его участии в сиг-

нальных путях трансдукции [30] и активации некоторых связанных со стрессом генов [27].

Полученные результаты позволили сделать вывод о различном вкладе в ответную реакцию табака на действие агента ОС отдельных компонентов антиоксидантной системы (ферментов ПО и СОД) и низкомолекулярных протекторов (пролина и каротиноидов), в зависимости от генотипических особенностей растения, связанных с наличием и стабильностью экспрессии гетерологичного гена холиноксидазы и накоплением ГБ. Функциональное взаимодействие классических антиоксидантов и осмопротектора ГБ необходимо учитывать при повышении стрессоустойчивости растений путем генетической инженерии, а также при регуляции их роста физиологически активными соединениями.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 19-016-00207\_а “Влияние измененного окислительного и осмотического статуса клеток на морфологические особенности надземной и подземной части растений и на преобразование микробиоты, ассоциированной с корневой системой”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. FAO World Resources Report 90. Land Resource Potential and Constraints at Regional and Country Levels. Rome, 2000. 122 p.
2. Bellard C., Bertelsmeier C., Leadley P., Thuiller W., Courchamp F. // Ecology Letters. 2012. V. 15. № 4. P. 365–377.

3. Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Kabashnikova L.F. // Appl. Biochem. Microbiol. 2019. V. 55. № 5. P. 441–459.
4. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Ястреб Т.О. // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія: Біологія. 2017. № 3. С. 23–45.
5. Zhao X., Wei P., Liu Z., Yu B., Shi H. // Acta Physiologiae Plantarum. 2017. V. 39. P. 19.
6. Shahzad B., Fahad S., Tanveer M., Saud S., Khan I.A. Approaches for Enhancing Abiotic Stress Tolerance in Plants. / Ed. M. Hasanuzzaman, K. Nahar, M. Fujita, H. Oku, T. Islam Boca Raton: CRC Press, 2019. P. 61–77.
7. Sakamoto A., Murata N. // Plant Cell and Environment. 2002. V. 25. P. 163–171.
8. Tran N.H.T., Oguchi T., Matsunaga E., Kawaoka A., Watanabe K.N., Kikuchi A. // Plant Biotechnology. 2018. V. 35. № 3. P. 215–224.
9. You L., Song Q., Wu Y., Li S., Jiang C., Chang L., Zhang J. // Planta. 2019. V. 249. № 6. P. 1963–1975.
10. Zhang T., Li Z., Li D., Li C., Wei D., Li S., Yang X. // Plant Cell Reports. 2020. P. 1–14. doi.org/https://doi.org/10.1007/s00299-020-02581-5
11. Chen T.H.H., Murata N. // Plant Cell and Environment. 2011. V. 34. № 1. P. 1–20.
12. Вайнер А.А., Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О. // Вісник Харківського національного аграрного університету. Сер.: Біологія. 2013. № 2. С. 32–38.
13. Yastreb T.O., Kolupaev Y.E., Lugovaya A.A., Dmitriev A.P. // Appl. Biochem. Microbiol. 2017. V. 53. № 6. P. 719–724.
14. Gulevich A.A., Kurenina L.V., Baranova E.N. // Russian Agricultural Sciences. 2018. № 1. P. 7–12.
15. Murachige T., Skoog F.A. // Physiologia Plantarum. 1962. V. 15. № 3. P. 473–497.
16. Широких И.Г., Назарова Я.И., Огородникова С.Ю., Шуплецова О.Н., Блинова А.Л., Ралдугина Г.Н., Евсюков С.В., Баранова Е.Н. // Теоретическая и прикладная экология. 2020. № 2. С. 72–79.
17. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев / Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971. С. 154–171.
18. Cromwell B.T., Rennie S.D. // Biochem J. 1954. V. 58. № 2. P. 322–326.
19. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. Руководство Р 4.1.1672-03. М.: Минздрав РФ 2003. https://www.rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/33e/r-4.1.1678\_03.pdf
20. Лукаткин А.С., Голованова В.С. // Физиология растений. 1988. Т. 35. № 4. С. 773–780.
21. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. // Plant and Soil. 1973. V. 39. P. 205–207.
22. Beauchamp C., Fridovich J. // Anal. Biochem. 1971. V. 44. № 1. P. 276–287.
23. Живетьев М.А., Граскова И.А., Войников В.К. // Журн. стресс-физиологии и биохимии. 2013. Т. 9. № 3. С. 326–332.
24. Giri J. // Plant Signaling and Behavior. 2011. V. 6. № 11. P. 1746–1751.
25. Einset J., Nielsen E., Connolly E. L., Bones A., Sparstad T., Winge P., Zhu J. K. // Physiol. Plant. 2007. V. 130. № 4. P. 511–518.
26. Park E.J., Jeknic Z., Chen T.H., Murata N. // Plant Biotechnol. J. 2007. V. 5. P. 422–430.
27. Kathuria H., Giri J., Nataraja K.N., Murata N., Udayakumar M., Tyagi A.K. // Plant Biotechnol. J. 2009. V. 7. P. 512–526.
28. Zhang T., Liang J., Wang M., Li D., Liu Y., Chen T. H., Yang X. // Plant Sci. 2019. V. 280. P. 355–366.
29. Лян К., Чжан С.Я., Ло И., Ван Г.П., Цзо Ц., Ван В. // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 3. С. 410–417.
30. Subbarao G.V., Nam N.H., Chauhan Y.S., Johansen C. // J. Plant Physiol. 2000. V. 157. P. 651–659.

## Reaction to the Action of Hydrogen Peroxide in Plants of *Nicotiana tabacum* Transformed by the Gene of Cholinoxidase (*codA*)

I. G. Shirokikh<sup>a, b, \*</sup>, S. Yu. Ogorodnikova<sup>b</sup>, Ya. I. Nazarova<sup>a</sup>, and O. N. Shupletsova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Federal Agricultural Research Center of the North-East named N.V. Rudnitsky, Kirov, 610007 Russia

<sup>b</sup>Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Branch of RAS, Syktyvkar, 167982 Russia

\*e-mail: irgenal@mail.ru

Genetic engineering of glycine betaine (GB) synthesis offers a new approach to improving the productivity and stress resistance of cultivated plants. The possible effect of the bacterial heterologous sequence on the reaction of plants under oxidative stress (OS) induced by 3 mM hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was determined. Independent transgenic tobacco lines (*Nicotiana tabacum* L.) Cod 16 and Cod 45 with the choline oxidase (*codA*) gene from *Arthrobacter gloiformis* responsible for GB synthesis were used. Transgenic lines differed from wild type plants with lower resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which led to a more significant decrease in the pool of photosynthetic pigments, a greater intensity of lipid peroxidation, and dynamics of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (PO) activity. In terms of OS manifestation, transgenic lines with initially similar values of GB accumulation (0.825–0.910 mmol/g) had significant differences among themselves. In the Cod 16 line, the reaction to OS induction was earlier (1 h after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment) and a more significant increase in PO activity and proline content than in the Cod 45 line and the original variety. In the Cod 45 line, there is a significant increase in SOD activity and proline content in response to OS induction 24 h after treatment, and, in contrast to the wild type plants and the Cod 16 line, it is accompanied by a significantly higher content of carotenoids in the leaves. When using genetic engineering methods to increase the productivity and resistance of plants to stress, it is necessary to take into account the functional interaction of antioxidants and osmoprotectors.

**Keywords:** oxidative stress, glycinbetain, malondialdehyde, proline, antioxidant enzymes, plastid pigment

УДК 77.19.591.21

## ИЗМЕНЕНИЯ В СОСТАВЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ЛИПИДОВ ПЕЧЕНИ И ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ ПРИ ПРИЕМЕ НАНОЛИПИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ

© 2021 г. Н. П. Пальмина<sup>1</sup>, \*, Т. А. Мишарина<sup>1</sup>, Н. И. Крикунова<sup>1</sup>, А. С. Антипова<sup>1</sup>, Е. И. Мартыросова<sup>1</sup>, М. Г. Семёнова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики РАН, Москва, 119334 Россия

\*e-mail: npalm@mail.ru

Поступила в редакцию 02.09.2020 г.

После доработки 02.10.2020 г.

Принята к публикации 02.11.2020 г.

Методом газовой хроматографии исследовали изменения в содержании жирных кислот (ЖК) в липидах печени и головного мозга 6 групп мышей в зависимости от состава липосомных наноконплексов, введенных в напиток, заменяющие воду во время длительной (3 мес.) диеты. Компонентами 6 видов наноконплексов, кроме фосфатидилхолина (ФХ), в разном сочетании служили: эфирное масло гвоздики (ЭМГ), рыбий жир (РЖ) и казеинат натрия (Каз-Na). Установлено, что, использование напитков с липосомальными наноконплексами сложного состава, включающими в себя как эссенциальные полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), так и природный антиоксидант ЭМГ и пищевой белок (Каз-Na), модифицирует состав ЖК печени и головного мозга, увеличивает содержание декозагексаеновой кислоты и значительно уменьшает отношение суммы омега-6 к сумме омега-3 ( $\Sigma \omega\text{-}6/\Sigma \omega\text{-}3$ ) ПНЖК. Такие изменения могут обеспечить повышение устойчивости организма к воспалительным процессам, снизить риск возникновения онкологических и нервно-психических заболеваний. Полученные результаты могут быть использованы при разработке современных систем доставки ПНЖК на основе ФХ-липосом.

**Ключевые слова:** нанолипосомальные комплексы, полиненасыщенные жирные кислоты,  $\omega\text{-}3$ - and  $\omega\text{-}6$ -полиненасыщенные жирные кислоты,  $\Sigma \omega\text{-}6/\Sigma \omega\text{-}3$  отношение, эфирное масло гвоздики

**DOI:** 10.31857/S0555109921020100

Биологически активные липиды, такие как полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК, омега-3 и омега-6) играют важную роль в поддержании многих физиологических функций в организме млекопитающих: они необходимы для нормального роста и развития; обеспечивают энергетические потребности; входят в состав фосфолипидов клеточных мембран; являются предшественниками синтеза эндогормонов и эйкозаноидов [1–6]. ПНЖК не синтезируются в организме человека и должны поступать с пищей в достаточном количестве и в наиболее полезном для здоровья (по данным доказательной медицины) соотношении (омега-6 : омега-3 ПНЖК = 1 : 1–2 : 1) [7, 8]. Чрезмерное употребление насыщенных жиров и критическое превышение омега-6 над омега-3 ПНЖК, достигающее 15 : 1–25 : 1 в высокоиндустриальных странах, являются одной из главных причин лишнего веса и сопутствующих алиментарно-зависимых заболеваний [7]. Таким образом, включение дополнительного количества ПНЖК в рацион питания в профилактиче-

ских целях, наряду с общим снижением насыщенных жиров, является актуальным для большинства населения и может быть осуществлено с помощью функциональных продуктов питания. Серьезная проблема, с которой сталкиваются исследователи, заключается в том, что высокое содержание в ПНЖК ненасыщенных углеродных связей связано с их высокой способностью к окислению и, как следствие, накоплению пероксидов и гидропероксидов, а также токсичных продуктов их разложения, таких как летучие карбонильные продукты, снижающие вкусовые качества продуктов. Кроме того, липофильная природа ПНЖК затрудняет их введение в продукты с низким содержанием жиров. Для преодоления этих ограничений предлагается вводить ПНЖК в нужном соотношении в виде липосом с добавками природных антиоксидантов и инкапсулированием в белки или биополимеры [9, 10]. В результате комплекса исследований, выполненных *in vitro*, были получены липосомы на основе фосфатидилхолина (ФХ) или лизофосфатидилхолина (ЛФХ), со-

**Таблица 1.** Состав жирных кислот рыбьего жира в виде их метиловых эфиров (отн. %)

Кислота	Формула	Содержание, %
Миристиновая	$C_{13}H_{27}COOH$	5.10 +\ -0.26
Пальмитиновая	$C_{15}H_{31}COOH$	12.42 +\ -0.62
Стеариновая	$C_{17}H_{35}COOH$	3.88 +\ -0.19
Ундеценовая	$C_{10}H_{21}COOH$	7.30 +\ -0.37
Олеиновая	$C_{17}H_{33}COOH$	8.14 +\ -0.41
Октадеценовая	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$	3.87 +\ -0.19
Эйкозеновая	$C_{19}H_{37}COOH$	1.86 +\ -0.09
13-Докозеновая	$C_{21}H_{41}COOH$	1.32 +\ -0.07
Линолевая	$C_{17}H_{35}COOH$	1.07 +\ -0.05
Октадекатриеновая	$C_{17}H_{28}COOH$	2.34 +\ -0.12
Арахидоновая	$C_{19}H_{31}COOH$	1.67 +\ -0.08
Докозатетраеновая	$C_{21}H_{33}COOH$	3.40 +\ -0.17
Эйкозопентаеновая	$C_{19}H_{29}COOH$	27.63 +\ -1.38
Докозагексаеновая	$C_{21}H_{31}COOH$	20.00 +\ -1.00

держающие ПНЖК в соответствующем отношении, с растительными антиоксидантами (эфирное масло гвоздики (ЭМГ), кориандра, лимона; экстракты имбиря, черного перца, корицы, душистого перца), а также казеинат натрия (Каз-Na) и мальтодекстрины. Были изучены физико-химические свойства этих сложных липосом (размер и форма, плотность, архитектура, заряд, микровязкость липидного бислоя; способность к окислению; термодинамические параметры) [11–15]. Определена биодоступность инкапсулированных липидов в процессе ферментативного гидролиза комплексов в условиях их модельного переваривания в желудочно-кишечном тракте (ротовая полость, желудок, тонкий кишечник) *in vitro* [16]. Были установлены основные взаимосвязи между структурными, а также термодинамическими параметрами супрамолекулярных комплексов и их функциональными свойствами [12, 16, 17]. Однако для того, чтобы предложить использование этих комплексов в качестве пищевых добавок необходимо проведение экспериментов *in vivo*, подтверждающих обогащение липидов органов и тканей живых организмов ПНЖК при потреблении этих продуктов.

Цель работы – установить, как введение разработанных комплексов влияет на состав жирных кислот в различных органах животных при их длительном потреблении.

## МЕТОДИКА

**Материалы.** В работе использовали фосфатидилхолин (ФХ) (Lipoid GmbH, Германия) следующего химического состава по данным фирмы (%): фосфолипиды – фосфатидилхолин 94, фосфатидилэтаноламин 0.6, лизофосфатидилхолин 3; фосфатидилинозит 0.1; триглицериды 2; свобод-

ные жирные кислоты 0.5;  $\alpha$ -токоферол 0.15. Содержание жирных кислот (ЖК) к общему их количеству составило (%): пальмитиновая 12–17, стеариновая 2–5; олеиновая 11–15; линолевая 59–70; линоленовая 3–7. Использовались также Каз-Na фирмы “Sigma” (Новая Зеландия); органические растворители фирмы “Merk” (Германия); ЭМГ (Plant Lipids Ltd., Индия); рыбий жир (РЖ, концентрат омега-3 “Омега-3 дети”, “Рускапс”, Россия). Содержание и состав ЖК рыбьего жира приведен в табл. 1.

**Приготовление растворов липосомальных наноконструкций.** В экспериментах были использованы водные растворы 6 видов липосомальных наноконструкций в качестве напитков, заменяющих воду в диете экспериментальных животных.

Диета 1: липосомы из ФХ (концентрация в растворе – 2.50 мг/мл);

диета 2: липосомы из ФХ (концентрация в растворе 2.50 мг/мл) с добавлением ЭМГ (2% от веса ФХ), весовое отношение компонентов липосомального наноконструкта: ФХ : ЭМГ = 1 : 0.02;

диета 3: липосомы из ФХ (концентрация в растворе – 1.66 мг/мл), инкапсулированные Каз-Na (концентрацией в растворе – 16.6 мг/мл), весовое отношение компонентов в липосомальном наноконструкте: ФХ : Каз-Na – 1 : 10;

диета 4: липосомы из ФХ ([ФХ] = 2.50 мг/мл) с добавлением ЭМГ (2% от веса ФХ), инкапсулированные Каз-Na ([Каз-Na] = 25.0 мг/мл), весовое отношение компонентов в липосомальном наноконструкте ФХ : ЭМГ : Каз-Na – 1 : 0.02 : 10;

диета 5: липосомы из ФХ ([ФХ] – 1.66 мг/мл) с добавлением рыбьего жира, ([РЖ] = 1.66 мг/мл), инкапсулированные Каз-Na ([Каз-Na] в растворе – 33.3 мг/мл), весовое отношение компонентов в липосомальном наноконструкте ФХ : РЖ : Каз-Na = 1 : 1 : 20;

диета 6: липосомы из ФХ ([ФХ] = 1.66 мг/мл) с добавлением рыбьего жира [РЖ] = 1.66 мг/мл) и ЭМГ (2% от веса ФХ + РЖ), инкапсулированные Каз-На ([Каз-На] 33.3 мг/мл). Весовое отношение компонентов в липосомальном наноконплексе: ФХ : РЖ : ЭМГ : Каз-На – 1 : 1 : 0.02 : 20.

**Приготовление липосом.** Липосомы ФХ с добавлением ЭМГ и/или РЖ готовили по следующей методике. В стерилизованную при 110°C (30 мин) стеклянную емкость вносили необходимые навески ФХ, ЭМГ, РЖ, добавляли расчетное количество бидистиллированной воды. Смесь диспергировали в воде при помощи трехкратной механической гомогенизации, используя гомогенизатор (Heidolph, Германия), в течение 2 мин при 20000 об./мин. Полученную водную дисперсию ФХ/ЭМГ/РЖ дополнительно обрабатывали ультразвуком для получения наноразмерных липосомных комплексов, используя при этом ультразвуковой гомогенизатор VCS-130 (“Sonics & Materials”, США) в предварительно подобранном режиме: озвучивание в течение 5 мин при 40% мощности сигнала (отношение времени озвучивания к времени без озвучивания 30 : 30 с). При обработке образец охлаждали во льду. Для получения наноразмерных липосомных комплексов такой режим обработки ультразвуком повторяли 7 раз. После этого полученные водные растворы липосомных комплексов ФХ/ЭМГ/РЖ центрифугировали в стерильных центрифужных пробирках в течение 30 мин при 1800 g для удаления металлической стружки от ультразвукового зонда. Инкапсулирование белком Каз-На приготовленных липосом (ФХ/ЭМГ/РЖ) проводили смешиванием их растворов в стерильных (110°C, 30 мин) бутылочках для кормления с последующим их встряхиванием (165 об./мин) в шейкер-инкубаторе GFL 3032 (GFL, Германия) при 40°C в течение 1 ч. После этого повышали температуру в шейкер-инкубаторе до 63°C и пастеризовали все приготовленные растворы в течение 30 мин при продолжающемся встряхивании (165 об./мин).

Все растворы липосомных наноконплексов готовили на 2 сут из расчета их потребления одной мышью в объеме 7 мл ежедневно.

**Животные и дизайн эксперимента.** 50 мышей линии F1(C57blxDBA2\6) весом (18–20) г из вивария питомника “Столбовая” (филиал Столбовая ФГУ НЦ биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства, Московская область, Чеховский район, Россия) были разделены на 8 групп по 6–7 мышей в каждой группе. Мыши содержались на диете в течение 92 сут. Первая группа животных (7 шт.) получала общевиварный рацион, печень и головной мозг были взяты в первый день эксперимента; 2 группа (6 шт.) получала диету 1; 3 группа (6 шт.) – диету 2; 4 группа (6 шт.) – диету 3, 5 группа (6 шт.) – диету

4; 6 группа (6 шт.) – диету 5; 7 группа (6 шт.) – диету 6; 8 группа (7 шт.) содержалась на общевиварном рационе все 92 сут эксперимента. Через 92 сут после начала приема различных диет животные были подвергнуты декапитации, а ткани печени и головного мозга были взяты для исследования состава их ЖК.

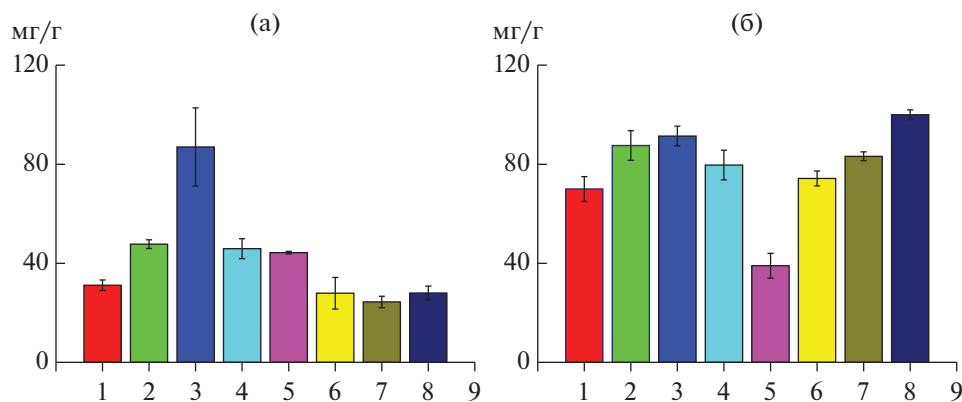
**Выделение липидов из печени и мозга.** Экстракцию липидов из тканей печени и головного мозга проводили по методу Фолча в модификации Кейтса [19]. Хлороформенные экстракты липидов хранили при температуре –18°C под аргоном. Перед определением состава ЖК хлороформ удаляли в вакууме и получали чистые липиды, которые далее использовали для анализа.

**Определение состава жирных кислот.** Определение жирнокислотного состава клеток печени и мозга проводили методом газожидкостной хроматографии [19]. Из выделенных липидов получали метиловые эфиры жирных кислот путем метанолиза. К липидам (около 100 мг), помещенным в стеклянные пробирки с герметично закручивающейся пробкой, добавляли по 5 мл метанола, оставляли в холодильнике на 1 ч, затем при охлаждении и интенсивном перемешивании добавляли 200 мкл ацетилхлорида и кипятили на водяной бане 1 ч. К образцу добавляли 5 мл 6%-ного водного раствора K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, встряхивали, добавляли 2 мл гексана и экстрагировали метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) встряхиванием в течение 5 мин, затем центрифугировали при 750 g 5 мин. Гексановую фазу, содержащую МЭЖК, анализировали на хроматографе “Кристалл 2000 М” (Кристалл, Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой DB-1 (50 м × 0.32 мм, слой фазы 0.25 мкм (Supelco, США). Анализ проводили при программировании температуры колонки от 120 до 270°C со скоростью 4°C/мин при температуре инжектора и детектора 270°C. Количественное содержание МЭЖК в образцах рассчитывали по отношению площади пика соответствующей кислоты к сумме площадей выбранных пиков (%).

**Математическая обработка результатов.** Математическую обработку проводили с помощью программ Microsoft Excel 2007 и Origin Pro 8. Стандартное отклонение средних величин из 3 измерений не превышало 5% (относительных). Достоверность различий между группами оценивали по критерию Манна-Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основная задача работы состояла в изучении изменения состава жирных кислот липидов печени и головного мозга мышей после приёма ими в течение 3 мес. различных липосомальных наноконплексов, содержащих ПНЖК, в виде напит-



**Рис. 1.** Изменение содержания общих липидов (мг/г) в ткани печени (а) и головного мозга (б) мышей линии F1(CBAx57b1)6 в зависимости от поддерживаемой в течение 3 мес. диеты. По оси X – номера групп животных, получавших различную диету (см. раздел Методика).

ков. Основным источником ПНЖК служил РЖ, для доставки которого использовали липосомы из ФХ, защищенные от окисления ЭМГ, антиокислительные свойства которого обусловлены наличием полифенола эвгенола и были хорошо изучены ранее [13, 14]. Растворимость в водной среде обеспечивали инкапсулированием липосом Каз-На. Ранее было установлено, что ЭМГ в сочетании с Каз-На способен защищать ПНЖК в составе липосом от окисления даже при температуре 60°C [13]. В эксперименте использовали 50 мышей – самок линии F1(CBAx57b1)6 из питомника “Столбовая” (филиал Столбовая ФГУ Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства, Московская обл., Россия), которые получали следующую диету: 1 группа – контроль, возраст 2 мес., вес 20–22 г (7 шт.); 2 – мыши, получавшие липосомы из ФХ (6 шт.); 3 – мыши, получавшие липосомы из ФХ с ЭМГ (6 шт.); 4 – мыши, получавшие липосомы из ФХ, инкапсулированные Каз-На (6 шт.); 5 – мыши, получавшие липосомы (ФХ + ЭМГ) инкапсулированные Каз-На (6 шт.); 6 – мыши, получавшие липосомы (ФХ + РЖ) инкапсулированные Каз-На (6 шт.); 7 группа – мыши, получавшие липосомы (ФХ + РЖ + ЭМГ), инкапсулированные Каз-На – 6 шт.; 8 – мыши, получавшие воду в течение 3 месяцев (7 шт.). Через 3 мес. животные были подвергнуты декапитации, из печени и головного мозга были проэкстрагированы липиды, в которых методом газовой хроматографии был определен состав жирных кислот. На рис. 1 приведены данные о среднем количестве общих липидов/г исследованной ткани печени (а) и головного мозга (б).

Из рис. 1 следует, что у контрольных мышей по мере увеличения их возраста (группа 1-животные в возрасте 2 мес., группа 8 – в возрасте 5 мес.) достоверно не изменялось содержание общих липидов печени и увеличивалось в головном мозге в

расчете на 1 г сырой ткани. Так как животные остальных опытных групп были использованы в эксперименте через 3 мес. после его начала, то полученные величины следует сравнивать с группой 8. В печени наибольшие и статистически достоверные различия ( $p < 0.05$ ) получены для 2, 3, 4 и 5 групп, в которых наблюдалось увеличение содержания общих липидов как по сравнению с 8, так и с 1 группами. Показатели для 6 и 7 групп достоверно не отличались от 1 и 8 групп. То есть, диеты с липосомами, не содержащими РЖ, увеличивали содержание общих липидов в ткани печени, в то время как липосомы, состоящие из тех же ингредиентов и РЖ (6 и 7 группы) имели такое же содержание общих липидов, как контрольные животные в 1 и 8 групп. Таким образом, мы установили, что старение животных сопряжено со статистически достоверным ( $p < 0.05$ ) увеличением в головном мозге содержания общих липидов (8 группа по сравнению с 1), а использование диет, содержащих липосомы с РЖ (6 и 7 группы), снижает эту величину и приближает ее к норме контрольных 2-месячных мышей. Наибольшие отклонения от значений для 8 и даже 1 групп были получены при использовании липосом из ФХ с ЭМГ, инкапсулированных Каз-На (5 группа). Можно заключить, что использование липосом, содержащих РЖ, благоприятно сказывается на общем содержании липидов в печени и головном мозге животных.

Основная же задача эксперимента заключалась в ответе на вопрос о том, как изменяется состав ЖК в липидах печени и головного мозга мышей после длительного получения различных липосомальных диет. Состав ЖК липидов печени приведен в табл. 2. Из таблицы видно, что увеличение возраста опытных животных с 2 до 5 мес. (1 и 8 группы, соответственно) сопровождалось возрастанием суммы мононенасыщенных жирных кислот ( $\Sigma$  МНЖК) на 9.5%; уменьшением со-

**Таблица 2.** Состав и содержание жирных кислот в виде их метиловых эфиров (отн. %) в липидах печени в контрольной и в опытных группах мышей (1–8)

Кислота	1	2	3	4	5	6	7	8
16:0	23.8	25.9	23.8	21.4	23.8	27.2	26.0	23.2
17:0	0.2	0.2	0.3	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2
18:0	11.4	8.1	8.5	8.3	7.8	9.8	9.7	8.5
20:0	0.2	0.2	0.2	0.9	0.3	0.2	0.2	0.2
22:0	0.2	0.2	0.1	3.5	0.1	0.3	0.9	1.3
23:0	0.1	0.1	0.2	0.3	0.4	0.1	0.2	0.1
24:0	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1
Σ НЖК	36.1	34.9	33.2	35.0	32.8	38.0	37.4	33.6
16:1ω9	0.2	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3
16:1ω7	2.4	2.7	2.3	2.0	3.0	1.8	1.9	2.5
18:1ω9	23.3	31.8	32.4	25.6	31.9	26.3	25.2	31.6
18:1ω7	3.7	4.0	3.9	3.7	4.3	3.1	3.5	4.2
20:1ω9	0.4	1.3	0.9	0.9	1.2	0.3	0.2	1.0
20:1ω7	0.1	0.3	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
24:1ω9	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.1	0.3
Σ МНЖК	30.5*	40.7*	40.2*	33.1**	41.2*	32.3**	31.3**	40.0* **
18:3ω6	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
18:2ω6	13.7	12.3	13.9	14.3	11.2	13.7	14.2	11.7
20:4ω6	9.7	7.0	7.2	8.9	6.2	6.1	6.6	8.2
20:3ω6	1.2	0.7	0.6	1.3	0.8	1.2	0.9	1.5
20:2ω6	0.2	0.2	0.3	0.4	0.2	0.1	0.3	0.2
22:5ω6	0.1	0.1	0.1	1.8	3.0	3.5	0.3	0.2
22:6ω3	6.7 *	3.6	4.0	4.5	4.1	4.3	8.6 **	4.2 * **
22:4ω6	1.6	0.3	0.2	0.4	0.2	0.3	0.2	0.2
22:5ω3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.4	0.1	0.1
Σ ПНЖК	33.4*	24.4*	26.6*	31.9**	26.0	29.7	31.3**	26.4* **
Σ ω3	6.8*	3.7	4.1	4.6	4.2	4.7	8.8**	4.3* **
Σ ω6	26.6	20.7	22.5	27.3	21.8	25.0	22.6	22.1
Σ ω6 \ ω3	3.9118*	5.5946	5.4878	5.9348	5.1905	5.3192	2.5682***	5.1396* **

Примечание: 1-контрольные животные в возрасте 2 мес.; 2–7-опытные животные, получавшие различную нанолипосомальную диету в течение 92 дней (см. раздел Методика); 8 – контрольные животные в возрасте 5 мес. \**p* < 0.05 при сравнении с контролем 1 группы; \*\**p* < 0.05 при сравнении с контролем 8 группы.

держания суммы полиненасыщенных жирных кислот (Σ ПНЖК) на 7%, в том числе докозагексаеновой (ДГК 22:6 ω-3) кислоты в 1.5 раза. Аналогичные данные были получены в работах [20, 21]. Использование липосомальных комплексов в группах 4 и 7 приближало содержание Σ МНЖК и Σ ПНЖК к норме, соответствующей 2-месячным животным. Особенно значительными являются изменения в содержании Σ ω-3 ПНЖК, которое увеличивалось в 7 группе, принимающей нанокомплексы из ФХ + РЖ + ЭМГ + Каз-На, в 2 раза по сравнению с контрольной 8 группой и в 1.3 раза по сравнению с молодыми животными (1 группа). Столь же большое увеличение в этих же группах зафиксировано и для ДГК. Таким образом, можно констатировать, что использование сложных нанокомплексов, содержащих наряду с ФХ и РЖ как ЭМГ, так и Каз-На, дает наилучший результат по обогащению липидов печени Σ ω-3 ПНЖК.

В табл. 3 представлены данные по составу ЖК липидов головного мозга мышей в зависимости

от использованной липосомальной диеты. Из таблицы следует, что, в отличие от липидов печени, в головном мозге мышей возрастные изменения практически не выражены, что неудивительно, так как известно, что липидный обмен в головном мозге идет более медленно [22, 23]. Однако и в этом органе прием нанолипосомальных комплексов оказывал влияние на состав ЖК: в группах 3, 5 и 7 снижалась Σ НЖК, в группах 3 и 5 увеличивалась Σ ПНЖК, а также ДГК. Так как высокое содержание Σ НЖК и низкое – Σ ПНЖК и ДГК приводит к ожирению, сердечно-сосудистым и нервно-психическим заболеваниям [24–28], корректирующее влияние приёма водорастворимых нанолипосомальных комплексов, особенно содержащих ЭМГ, следует признать благоприятным фактом. Поскольку исходно мы ставили перед собой задачу увеличения относительного содержания ДГК в липидах, можно сказать, что она выполнена для липидов печени, в головном мозге также отмечена тенденция к желаемым изменениям.

**Таблица 3.** Состав и содержание жирных кислот в виде их метиловых эфиров (отн. %) в липидах головного мозга в контрольной и в опытных группах мышей (1–8)

Кислота	Группы животных							
	1	2	3	4	5	6	7	8
16:0	21.1	19.8	16.3	17.6	13.9	19.3	18.6	18.4
17:0	0.3	0.8	0.2	0.3	0.6	0.4	0.2	0.5
18:0	21.2	18.8	16.2	17.7	16.0	19.9	16.4	19.6
20:0	0.6	0.6	0.6	0.6	0.9	0.6	0.5	0.5
22:0	0.4	0.2	0.9	0.7	0.5	0.6	0.3	1.9
23:0	0,4	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1
24:0	0.8	1.2	1.3	1.3	0.6	1.6	1.9	0.4
Σ НЖК	44.8	41.5	38.9**	41.2	34.6**	42.5	38.0	41.4**
16:1ω9	0.6	0.4	0.4	0.5	0.5	0.7	0.5	2.5
18:1ω9	16.2	14.2	13.2	15.6	14.6	17.0	13.8	16.3
18:1ω7	4,0	2.9	2.8	4.1	3.1	3.8	3.2	3.8
20:1ω9	1.6	2.4	2.4	2.6	2.8	2.2	2.0	2.3
20:1ω7	0.3	0.5	0.6	0.5	0.8	0.2	1.8	0.2
22:1ω9	0.4	4.9	5.8	3.4	7.3	0.5	1.6	0.2
22:1ω7	0.4	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
24:1ω9	1.8	4.0	4.1	3.9	3.0	4.9	4.9	2.8
Σ МНЖК	25.3	29.5	29.1	30.8	32.2	29.4	27.9	28.2
18:2ω6	0.8	0.9	0.9	0.7	0.8	1.2	0.6	0.6
20:4ω6	9.5	8.4	8.5	8.4	9.6	7.7	7.0	9.9
20:3ω9	0.4	0.4	0.4	0.3	0.4	0.1	0.2	0.5
20:2ω9	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
20:2ω6	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
22:6ω3	16.2	13.5	18.5	14.7	18.9	16.1	14.4	16.4
22:4ω6	3.3	2.7	3.5	3.7	3.1	2.6	2.4	3.2
Σ ПНЖК	30.4	29.3	32.0	28.0	33.2	27.3	24.8	30.9
Σ ω3	16.2	13.5	18.5	14.7	18.9	16.1	14.4	16.4
Σ ω6	13.7	12.1	13.0	12.9	13.7	11.6	10.1	13.20
Σ ω6/Σ ω3	0.8457	0.8963	0.7027	0.8476	0.7249**	0.7205**	0.7014**	0.8049**

Примечание: 1–контрольные животные в возрасте 2 мес.; 2–7–опытные животные, получавшие различную нанолипосомальную диету в течение 92 сут (см. “Методика”); 8 – контрольные животные в возрасте 5 мес.  $p < 0.05$  при сравнении с контролем 1 группы; \*\* $p < 0.05$  при сравнении с контролем 8 группы.

Учитывая более низкий метаболизм липидов в этом органе, можно полагать, что при более длительном приеме липосомальных комплексов можно достигнуть более выраженных изменений и здесь. Необходимо при этом подчеркнуть, что те увеличения в содержании ДГК, которые были получены нами для липидов печени, сопоставимы с результатами, полученными другими авторами при использовании диет, обогащенных ДГК в гораздо большей степени [29, 30]. По-видимому, это может быть связано с использованием именно липосомальных нанокомплексов, так как по результатам, полученным в работе [31], ФХ увеличивает включение ДГК в липиды мембран. Значительного увеличения ДГК в головном мозге не удавалось достичь и тем экспериментаторам, которые использовали высокие концентрации ДГК в применяемой диете [24, 32, 33].

Необходимой стадией при развитии ряда заболеваний: атеросклероза, сердечно-сосудистых и когнитивных нарушений, злокачественных ново-

образований [34–37] является воспаление и окислительный стресс. Установлено, что ω-6-ПНЖК являются предшественниками провоспалительных гормонов [38], а ω-3-ПНЖК участвуют в формировании противовоспалительного ответа организма [36, 38], поэтому для оценки потенциальной способности противовоспалительной активности тех или иных воздействий на организм используется такой критерий, как влияние этих воздействия на соотношение  $\Sigma \omega-6/\Sigma \omega-3$  в органах и тканях [30, 37–39]. На основании полученных результатов по анализу состава ЖК липидов печени и головного мозга для всех групп животных, использованных в эксперименте, были вычислены эти соотношения. Результаты приведены в табл. 2 и 3. Из них видно, что увеличение возраста животных приводило к увеличению этого соотношения в липидах печени в 1.3 раза и не влияло на него в липидах головного мозга. Использование нанокомплексов на 15% снижало это отношение в липидах головного мозга мышей



в группах 3, 5, 6 и 7. В липидах печени использование липосомального наноконплекса (ФХ + РЖ + ЭМГ + Каз-На) уменьшало этот показатель в 2 раза. Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать заключение о том, что наибольшим эффектом обладал сложный липосомальный наноконплекс (ФХ + РЖ + ЭМГ + Каз-На), который сочетает в себе сразу целый ряд полезных свойств: высокое содержание длинноцепочечных ПНЖК, хорошую защищённость от окисления природным антиоксидантом и белком, водорастворимость и хорошую всасываемость в желудке и кишечнике. Особенно следует подчеркнуть, что наряду с сопоставимым эффектом на уровень индивидуальных ПНЖК и биодоступность, применение данного липосомального комплекса значительно превышало влияние ранее используемых пищевых диет на соотношение  $\Sigma \omega\text{-}6/\Sigma \omega\text{-}3$  [37–39]. Можно полагать, что использование такого наноконплекса будет способствовать повышению противовоспалительного статуса организма, а, следовательно, снижать риск целого ряда заболеваний.

Таким образом, показано, что, используя напитки с липосомальными наноконплексами сложного состава, включающими в себя как эссенциальные ПНЖК, так природный антиоксидант и пищевой белок, можно модифицировать состав ЖК печени и головного мозга, увеличить содержание ДГК и значительно уменьшить  $\Sigma \omega\text{-}6/\Sigma \omega\text{-}3$  ПНЖК, что обеспечит повышение устойчивости организма к воспалительным процессам, снизит риск возникновения онкологических и нервно-психических заболеваний. Полученные результаты могут быть использованы при разработке современных систем доставки различных нутрицевтиков на основе ФХ-липосом, так как помимо основного влияния на состав ПНЖК способ введения их в организм млекопитающих в виде водорастворимых напитков более удобен, чем применение масел.

Работа выполнена в рамках Госзадания № 1201253307.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации, в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasburg, 1986) согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со стандартными операционными процедурами исследователя (СОП), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских ис-

следованиях [40]. Люди в качестве объектов исследования не выступали.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saini R.K., Keum Y.S. // Life Sciences. 2018. V. 203. № 1. P. 255–267.
2. Fuentes Natividad R., Kim Eunjio, Fan Yang-Yi, Chapman Robert S. // Molecular Aspects of Medicine. 2018. V. 64. № 1. P. 79–91.
3. Mensink R.P., Zock P.L., Kester A.D., Katan M.B. // Am. J. Clin. Nutr. 2003. V. 77. № 5. P. № 1146–1155.
4. Calder P.C. // Eur. J. Pharmacol. 2011. V. 668. Suppl. 1.1. P. 50–58.
5. Banni S., Di Marzo V. // Mol. Nutr. Food Res. 2010. V. 54. № 1. P. 82–92.
6. Wassall S.R., Stillwell W. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1788. № 1. P. 24–32.
7. Candela G.C., Bermejo L.L. M., Loria K.V. // Nutr. Hosp. 2011. V. 26. № 2. P. 323–330.
8. Максимов В.И. // Пища и дегенеративные болезни. М.: Миклош, 2004. С. 232.
9. Semenova M.G., Dickinson E. // Biopolymers in Food Colloids: Thermodynamics and Molecular Interactions. Leiden, Boston: Brill, 2010. P. 356.
10. McClements D.J. // Nanoparticle- and Microparticle-based Delivery Systems. Encapsulation, Protection and Release of Active Compounds. London, N.Y.: Taylor & Francis Group, 2015. P. 548.
11. Semenova M.G., Antipova A.S., Zelikina D.V., Martirosova E.I., Plashchina I.G., Palmira N.P., Binyukov V.I., Bogdanova N.G., Kasparov V.V., Shumilina E.A., Ozerova N.S. // Food Research International. 2016. V. 88. № 1. P. 70–78.
12. Semenova M.G., Zelikina D.V., Antipova A.S., Martirosova E.I., Grigorovich N.V., Obushaeva R.V., Shumilina E.A., Ozerova N.S., Palmira N.P., Maltseva E.L., Kasparov V.V., Bogdanova N.G., Krivandin A.V. // Food Hydrocolloids. 2016. V. 52. № 1. P. 144–160.
13. Сажина Н.Н., Антипова А.С., Семенова М.Г., Пальмина Н.П. // Биоорганическая химия. 2019. Т. 45. № 2. С. 193–201.
14. Семёнова М.Г., Антипова А.С., Пальмина Н.П., Мишарина Т.А., Мартыросова Е.И., Зеликина Д.В., Крикунова Н.И., Каспаров В.В., Бинюков В.И., Богданова Н.Г., Чеботарёв С.А., Гуреева М.Д. // Химическая физика. 2019. Т. 38. № 12. С. 38–43.
15. Semenova M.G., Zelikina D.V., Antipova A.S., Martirosova E.I., Palmira N.P., Chebotarev S.A., Samuseva Y.V., Bogdanova N.G., Kasparov V.V. // Food Hydrocolloids. 2020. V. 105. № 1. 105803.
16. Semenova M.G., Antipova A.S., Anokhina M.S., Belyakova L.E., Polikarpov Y.N., Gigorovich N.V. et al. // Food & Function. 2012. V. 3. № 3. P. 271–282.
17. Semenova M.G., Antipova A.S., Belyakova L.E., Polikarpov Y.N., Anokhina M.S., Grigorovich N.V. et al. // Food Hydrocolloids. 2014. V. 42. № 1. P. 149–161.

18. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир., 1975. 322 с.
19. Мишарина Т.А., Теренина М.Б., Крикунова Н.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 5. С. 534–543
20. Бурлакова Е.Б., Мишарина Т.А., Фаткуллина Л.Д., Теренина М.Б., Крикунова Н.И., Ерохин В.Н., Воробьёва А.К. // Доклады Академии наук. 2011. Т. 437. № 3. С. 409–412.
21. Gao F., Kim H.W., Igarashi M., Kiesewetter D., Chang L., Ma K., Rapoport S.I. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1811. № 7–8. P. 484–489.
22. Igarashi M., Chang L., Ma K., Rapoport S.I. // Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 2013. V. 83. № 2. P. 403–412.
23. Chappus-McCendie H., Chevalier L., Roberge C., Plourde M. // Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry. 2019. V. 94. № 1. P. 1–12.
24. Hosomi R., Fukunaga K., Nagao T., Shiba S., Miyauchi K., Yoshida M., Takahashi K. // J. Oleo Sci. 2019. V. 68. № 8. P. 781–792.
25. Russo G.L. // Biochem. Pharmacol. 2009. V. 77. № 6. P. 937–46.
26. Soderberg M., Edlund C., Kristensson K., Dallner G. // Lipids. 1991. V. 26. № 6. P. 421–425.
27. Ailhaud G., Massiera F., Weill P., Legrand P., Alessandri J.M., Guesnet P. // Prog. Lipid Res. 2006. V. 45. № 3. P. 203–236.
28. Mocking R.J.T., Assies J., Ruhé H.G., Schene A.H. // J. Inherited Metabolic Disease. 2018. V. 41. № 4. P. 597–611.
29. Greupner T., Kutzner L., Nolt F., Strangmann A., Heike Kohrs H., Hahn A., Schebb N.H., Schuchardt J.P. // Food Funct. 2018. V. 9. № 3. P. 1587–1600.
30. Valenzuela R., Espinosa A., Llanos P., Hernandez-Rodas M.C., Barrera C., Vergara D., Romero N., Pérez F., Ruza M., Videla L.A. // Food Funct. 2016. V. 7. № 1. P. 140–150.
31. van Wijk N., Balvers M., Cansev M., Maher T.J., Sijben J.W.C., Broersen L.M. // Lipids. 2016. V. 51. № 7. P. 833–846.
32. Lim S.Y., Suzuki H. // Int. J. Vitam. Nutr. Res. 2002. V. 72. № 1. P. 77–84.
33. Valentini K.J., Wiesinger C.A.P., Fenton J.A. // Int. J. Food Sci. and Nutr. 2018. V. 69. № 6. P. 705–717.
34. Simopoulos A.P. // Exp. Biol. Med. 2008. V. 233. № 6. P. 674–688.
35. Mocking R.J.T., Assies J., Ruhé H.G., Schene A.H. // Inheri. Metab. Dis. 2018. V. 41. № 4. P. 597–611.
36. Joffre C., Rey C., Layé S. // Frontiers in Pharmacology. 2019. V. 10. № 9. P. 1–16.
37. Dydjow-Bendek D., Zagozdzon P. // In vivo. 2020. V. 34. № 1. P. 423–431.
38. Schmitz G., Ecker J. // Prog. Lipid Res. 2008. V. 47. № 2. P. 147–155.
39. Bali' A., Vlaši D., Žužul K., Marinovi' B., Bukvi' Mokos Z. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 2. P. 741–767.
40. Каркищенко Н.Н., Грачева С.В. // Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. М.: Профиль, 2010. 358 с.

## Changes in Liver and Brain Free Fatty Acid Profile of Mouse When Receiving Nanolipid Complexes

N. P. Palmina<sup>a,\*</sup>, T. A. Misharina<sup>a</sup>, N. I. Krikunova<sup>a</sup>, A. S. Antipova<sup>a</sup>,  
E. I. Martirosova<sup>a</sup>, and M. G. Semenova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Biochemical Physics named after N.M. Emanuel of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: npalm@mail.ru

The development of physiologically functional ingredients is one of the most optimal ways to introduce a balanced amount of essential polyunsaturated fatty acids and other nutraceuticals to the human body through food. Such ingredients may be micro- and nanocomplexes based on soybean phosphatidylcholine (PC) liposomes with nutraceuticals included. In this work, the method of gas chromatography was used to study the change in free fatty acid composition of liver and brain lipids of 6 groups of mice depending on the composition of liposome nanocomplexes introduced into drinks that replace water in their long-term (3 months) diet. The components of 6 types of liposomal nanocomplexes, except for PC, in different combinations were: clove essential oil (CEO), fish oil and sodium caseinate (Cas-Na). It has been shown, that, nanocomplexes, including both essential polyunsaturated free fatty acids (PUFA) and natural antioxidant (CEO) and food protein (Cas-Na), can modify the composition of the mammalian liver and brain lipids and increase the content of docosahexaenoic acid (DHA) and significantly reduce  $\Sigma \omega$ -6/ $\Sigma \omega$ -3 PUFAs. These effects will increase the body's resistance to inflammatory processes, reduce the risk of cancer and neuropsychiatric diseases. The results can be used in the development of modern PUFA delivery systems based on PC liposomes.

**Keywords:** nanoliposomal complexes, polyunsaturated fatty acids,  $\omega$ -3- and  $\omega$ -6-polyunsaturated fatty acids,  $\Sigma \omega$ -6/ $\Sigma \omega$ -3 ratio

УДК 543.55

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ *Gluconacetobacter sacrofermentas* ВКПМ В-11267 В БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТАХ

© 2021 г. С. Е. Тарасов<sup>1</sup>, Ю. В. Плеханова<sup>1</sup>, А. Г. Быков<sup>1</sup>, А. С. Казаков<sup>2</sup>, М. В. Вишневская<sup>3</sup>, Ю. М. Парунова<sup>3</sup>, П. М. Готовцев<sup>3</sup>, А. Н. Решетилов<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Московская обл., Пущино, 142290 Россия

<sup>2</sup>Институт биологического приборостроения РАН – обособленное подразделение “ФИЦ ПНЦБИ РАН”, Московская обл., Пущино, 142290 Россия

<sup>3</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

\*e-mail: anamol@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 24.09.2020 г.

После доработки 30.10.2020 г.

Принята к публикации 02.11.2020 г.

Изучали биоэлектрохимические и спектральные свойства иммобилизованных бактерий *Gluconobacter sacrofermentas* ВКПМ В-11267 в присутствии и отсутствии многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ). Полученные характеристики сравнивали с характеристиками филогенетически близких к ним и широко применяемых в биоэлектрохимии бактерий *Gluconobacter oxydans*. Показано, что модификация биоэлектрода углеродными нанотрубками приводила к значительному росту уровня тока (в 2.5–3 раза), а также к снижению общего сопротивления как в отсутствие субстратов, так и в их присутствии. Рассмотрена возможность использования иммобилизованных бактерий *G. sacrofermentas* в составе биотопливного элемента (БТЭ). Развиваемая удельная электрическая мощность БТЭ на основе иммобилизованных бактерий *G. sacrofermentas* оказалась ниже, чем у БТЭ на основе клеток *G. oxydans*. Тем не менее, полученные результаты свидетельствуют о том, что клетки *G. sacrofermentas* ВКПМ В-11267 могут служить основой для микробных топливных элементов.

**Ключевые слова:** биоэлектроды, уксуснокислые бактерии, *Gluconobacter oxydans*, *Gluconacetobacter sacrofermentas*, многостенные углеродные нанотрубки, микробный топливный элемент, спектральные методы анализа

**DOI:** 10.31857/S055510992102015X

Род бактерий *Gluconacetobacter*, относящийся к семейству *Acetobacteraceae*, имеет ряд ценных биотехнологических качеств. Одно из них, привлекающее внимание исследователей, состоит в том, что клетки осуществляют синтез бактериальной целлюлозы (БЦ) [1]. Известно, что один из штаммов рода *Gluconacetobacter*, *G. sacrofermentas* ВКПМ В-11267, является эффективным продуцентом бактериальной целлюлозы [2, 3]. БЦ широко применяется для решения различных научных и практических задач [4], в частности для создания анодов топливных элементов [5, 6]. Для повышения проводимости БЦ ее часто модифицируют, например, углеродными нанотрубками [7], палладием [8], платиной [9], наночастицами цинка [10] и др. При этом важно отметить, что не удалось найти публикаций, связанных с исследованием электрохимических свойств бактериальных клеток *G. sacrofermentas* ВКПМ В-11267, а также их сравнения со свойствами других штаммов. Оценка электрогенности данных бактерий и изучение

их электрохимических характеристик позволит получить новые сведения об их биотехнологической ценности и расширит области их возможного использования, например в качестве основы биотопливных элементов.

Необходимо отметить, что один из представителей семейства *Acetobacteraceae* – *Gluconobacter oxydans* – широко используется в биосенсорных устройствах и в составе анодов топливных элементов [11–14]. Для бактерий *G. sacrofermentas* характерно полное окисление углеродсодержащих субстратов до углекислого газа и воды. Отличительной чертой широко применяемого для создания биотопливных элементов штамма *Gluconobacter oxydans* является неспособность к полному окислению субстратов в связи с отсутствием замкнутого цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) [15]. Сравнение электрохимических свойств этих двух микроорганизмов позволит выяснить, каким образом метаболические особенности клеток могут сказываться на их биоэлектрохимических

свойствах. Ранее было показано, что бактерии *G. sacrofermentas* могут быть использованы в качестве рецепторного элемента биосенсоров первого поколения на основе кислородного электрода [16]. Кроме того, был показан стимулирующий эффект углеродных нанотрубок, проявляющийся в росте тока и снижении общего сопротивления биоэлектрода на основе этого штамма [17]. Были использованы МУНТ, так как они менее токсичны для бактериальных клеток, чем одностенные углеродные нанотрубки [18].

Цель работы – детальное исследование базовых биоэлектрохимических и спектральных характеристик штамма *Gluconacetobacter sacrofermentas* ВКПМ В-11267, направленное на оценку перспективы его использования в биотопливных элементах, а также сравнение их с аналогичными данными, известными для *Gluconobacter oxydans*.

## МЕТОДИКА

**Реагенты.** В работе использовали следующие реактивы: калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный, D-глюкоза, изопропиловый спирт 99.5% (“Рапгас”, Испания); натрия гидроокись, натрий хлористый, дрожжевой экстракт, агар-агар бактериологический, D-сорбит, пептон, глутаминовая кислота (“Диа-М”, Россия); метиловый спирт, этиловый спирт ректификат 96% (“ОкаБио-лаб”, Россия); уксусная кислота, лимонная кислота (“Мосреактив”, Россия); соляная кислота и гидрофосфат натрия (“Реахим”, Россия); натриевая соль 2,6-дихлорфенолиндофенола, гексацианоферрат калия(III), хитозан низкомолекулярный, трис(гидроксиметил)аминометан, L-арабиноза, L-ксилоза, D-фруктоза, сукцинат натрия (“Sigma”, США); D-лактоза (“Applichem GmbH”, Германия), лактат натрия (“BioChemica”, Финляндия). В качестве рабочих использовали спектральные графитовые электроды (СГЭ, С-3М, “Полипроф-Л”, Россия) и 3 – контактные электроды, полученные методом матричной печати (ЭМП, “КолорЭлектроникс”, Россия). В качестве модифицирующего материала использовали многостенные углеродные нанотрубки “Таунит-М” (МУНТ, “НаноТехЦентр”, Россия).

**Получение биоэлектродов.** В работе использовали штамм *Gluconobacter oxydans* sbsp. *industrius* ВКМ В-1280 (Всероссийская коллекция микроорганизмов). Выращивание проводили по методике, описанной в работе [19].

Культивирование бактериальных клеток *G. sacrofermentas* ВКПМ В-11267 (штамм предоставлен сотрудниками кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии Мордовского национального исследовательского университета им. Н.А. Огарева, Россия) описано в работе [16]. На рабочий графитовый электрод наносили смесь суспензии клеток

(1 мг/мкл) с 2%-ным раствором хитозана, растворенном в 1%-ной уксусной кислоте [13, 20]. Объемное соотношение в смеси “клетки-хитозан” составляло 1 : 1. Затем электрод подсушивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Концентрация клеток на поверхности электрода составляла 360 мкг/мм<sup>2</sup>. В случае модификации электрода нанотрубками вместо хитозана использовали суспензию МУНТ в хитозане (10 мг/мл). Суспензию МУНТ в хитозане обрабатывали ультразвуком с частотой 22 кГц при помощи генератора УЗГ13-0,1/22 (“УЗТ”, Россия) мощностью 100 Вт в течение 30 с. Затем смесь перемешивали в течение суток с помощью магнитной мешалки. Концентрация МУНТ на поверхности электрода составляла 3.6 мкг/мм<sup>2</sup>.

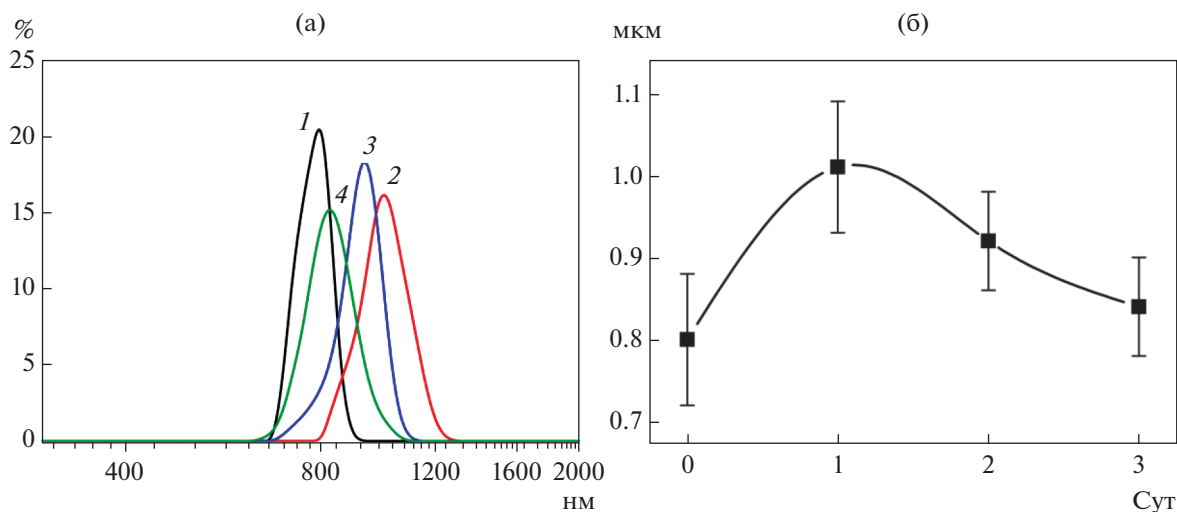
**Измерения электрохимических параметров иммобилизованных бактерий по двухэлектродной схеме.** В качестве измерительных электродов (анодов и катодов) использовали СГЭ площадью 75.3 мм<sup>2</sup>. Для получения мощностных характеристик создавали макет двухкамерного биотопливного элемента. Объемы анодного и катодного отделения составляли 5 мл и были разделены протонселективной мембраной МФ-4СК (“Пластполимер”, Санкт-Петербург, Россия) площадью 1.2 см<sup>2</sup>. В качестве фоновой электролита использовали 25 мМ калий-фосфатный буферный раствор, рН 6.5, содержащий 10 мМ хлорида натрия, а в качестве медиаторов использовали 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ, 0.14 мМ) в анодном отделении и гексацианоферрат(III) калия (ГЦФ, 5 мМ) в катодном. Регистрацию циклических вольтамперных характеристик (ЦВА) проводили при скорости развертки 3 мВ/с. Измерения выполняли при постоянном перемешивании растворов при комнатной температуре.

Мощностные характеристики биотопливного элемента рассчитывали по формуле, приведенной в работе [16], и нормировали на площадь поверхности электродов.

**Измерения электрохимических параметров иммобилизованных бактерий по трехэлектродной схеме.** В качестве измерительных электродов использовали ЭМП. Измерения проводили в 25 мМ калий-фосфатном буферном растворе (рН 6.5), содержащем 10 мМ хлорида натрия. В качестве редокс-медиатора использовали ДХФИФ в концентрации 0.14 мМ. Импедансные измерения проводили при приложенном потенциале 200 мВ в диапазоне частот от 40 кГц до 0.02 Гц при амплитуде модуляции напряжения в 10 мВ.

Измерения вольтамперных и импедансных характеристик выполняли на гальванопотенциостате VersaSTAT 4 (“Ametek Inc.”, США).

Результирующие вольтамперные и импедансные характеристики представляли собой усредненные значения 5 одиночных измерений.



**Рис. 1.** Распределение размеров (нм) частиц (а) в суспензии клеток *G. sucrofermentas* и средний размер частиц (б) в зависимости от времени инкубации (сут): 1 – исходные клетки, 2 – 1 сут инкубации, 3 – 2 сут инкубации, 4 – 3 сут инкубации.

**Оценка субстратной специфичности клеток.**

Оценку проводили по трехэлектродной схеме измерения с использованием ЭМП. Оценивали сигнал электродов на введение в измерительную ячейку субстратов в концентрации 1.0 мМ. Уровень сигнала электрода на введение 1.0 мМ глюкозы принимали за 100%, сигналы на остальные субстраты выражали в процентах относительно уровня сигнала на глюкозу [21].

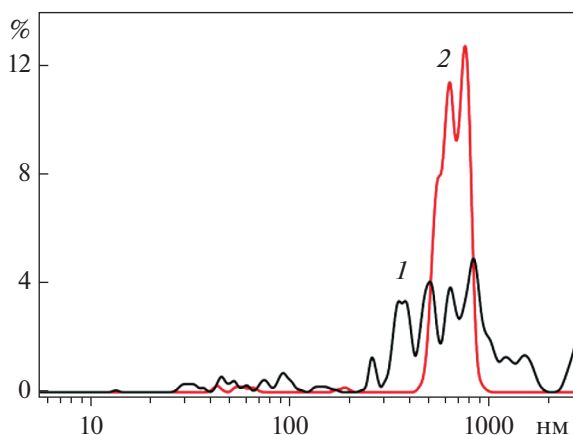
**Измерение размеров частиц.** Измерение выполняли на спектрометре динамического светорассеяния используя Zetasizer Nano ZS (“Malvern Instruments Ltd.”, Великобритания). Обратнорассеянный свет от 4 мВт гелий/неонового лазера собирали под углом 173°. Клетки и МУНТ находились в буферном растворе, рН 7.3, содержащем 20 мМ Трис-НСl и 100 мМ NaCl. Измерения проводили при температуре 25°C. Время накопления одиночной автокорреляционной функции составляло 15 с. Результирующая автокорреляционная функция представляла собой усреднение 40 одиночных измерений.

**Спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) в инфракрасной области с преобразованием Фурье.** НПВО-спектры клеток, хитозана и нанотрубок в инфракрасной области измеряли с помощью ИК-Фурье спектрометра Nicolet 6700, оснащенного приставкой Smart Orbit для измерения НПВО-спектров (“Thermo Scientific”, США). Регистрацию проводили в режиме НПВО на бриллиантовом НПВО-кристалле с длиной оптического пути 1 мкм, используя Hg<sub>1-x</sub>Cd<sub>x</sub>Te-детектор (охлаждение жидким азотом). Сканирование выполняли в диапазоне волновых чисел от 650 до 4000 см<sup>-1</sup> с разрешением 2 см<sup>-1</sup> и усреднением по 256 спектрам.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

**Эффективные размеры частиц в суспензии бактерий и кластеров МУНТ.** В процессе культивирования микроорганизмы проходят через ряд стадий (лаг-фаза, экспоненциальная и стационарная фазы и затем фаза отмирания). При глубинном культивировании клетки *G. sucrofermentas* синтезируют БЦ в виде сфер с различным диаметром, либо в виде волокон, причем инициирование процесса биосинтеза БЦ начинается в первые же сутки культивирования в экспоненциальную фазу роста. На рис. 1 показано изменение размеров частиц в суспензии в зависимости от времени культивирования клеток. Образование БЦ в среде оценивали с помощью измерения гидродинамического радиуса ( $R_h$ ) частиц в суспензии бактериальных клеток на разных стадиях роста. Было показано, что после первых суток инкубации общий размер частиц увеличивался приблизительно на 25% (с  $0.80 \pm 0.08$  до  $1.01 \pm 0.08$  мкм), на вторые сутки инкубации их размер постепенно начинал возвращаться к исходному. Можно предположить, что увеличение размера частиц обусловлено формированием на поверхности бактерий БЦ, которая в дальнейшем постепенно отделяется от клеток бактерий. При этом необходимо отметить, что дальнейшие измерения показали, что колебания гидродинамического радиуса бактериальных клеток не оказывало существенного влияния на электрохимические характеристики модифицированного ими электрода.

Для понимания возможности сорбции бактериальных клеток на поверхности углеродных нанотрубок при модификации ими рабочих электродов, оценили размеры кластеров МУНТ. Так, если размеры кластеров МУНТ будут превышать



**Рис. 2.** Интенсивность светорассеяния (%) в зависимости от гидродинамического радиуса частиц МУНТ (нм) до (1) и после (2) обработки ультразвуком.

размеры отдельных клеток, то их количество, сорбированное на кластер, не будет в высокой степени ограничиваться размером последнего. Если величины кластеров или одиночных волокон будут малы по сравнению с размерами клеток, то возможно ограничение количества ключевых контактов “бактериальная клетка - МУНТ”.

Обработка суспензии МУНТ ультразвуковым излучением должна приводить к равномерному распределению частиц наноматериала в матрице хитозана. На рис. 2 представлено распределение  $R_h$  частиц МУНТ до и после их обработки ультразвуком. Средний размер кластера МУНТ в исходном состоянии составлял  $0.80 \pm 0.26$  мкм, после обработки ультразвуком наблюдали изменение среднего размера и получение более однородной суспензии с размерами  $0.68 \pm 0.09$  мкм.

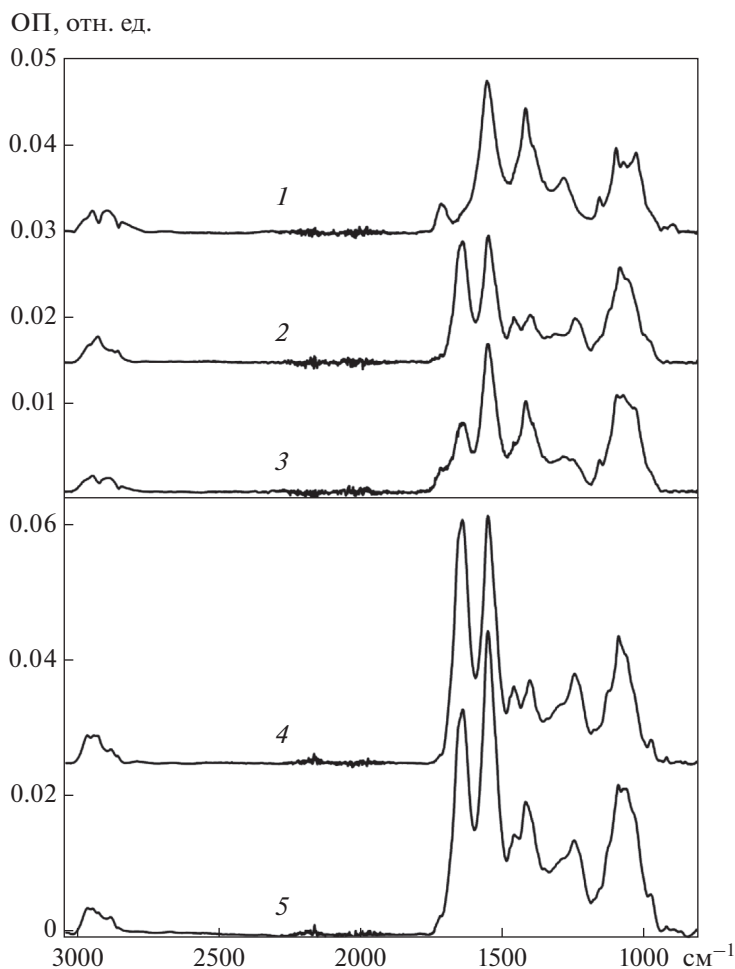
Таким образом, соотношение размеров бактериальных частиц и МУНТ находилось в пределах единицы, что не предполагало возникновение пространственных ограничений при их сорбции на поверхности электродов, модифицированных углеродными нанотрубками.

**Сравнение спектральных характеристик суспензий бактерий *G. sacrofermentas* и *G. oxydans*.** Два вида бактерий, рассматриваемых в работе, относятся к одному семейству *Acetobacteraceae*, поэтому они должны обладать схожими спектральными характеристиками. ИК-спектры для суспензий клеток двух типов и их смеси с хитозаном и МУНТ представлены на рис. 3. Видно что ИК-спектры суспензий клеток обладали характерными полосами поглощения для основных компонентов биологических объектов, таких как белки ( $1700-1500$  см $^{-1}$ ), сахара ( $1100$  см $^{-1}$ ), липиды ( $1000$  и  $1750$  см $^{-1}$ ) и нуклеиновые кислоты ( $1100$  и  $1240$  см $^{-1}$ ). Спектр смеси МУНТ и хитозана представлял собой суперпозицию отдельных спектров веществ с характерными полосами поглощения в

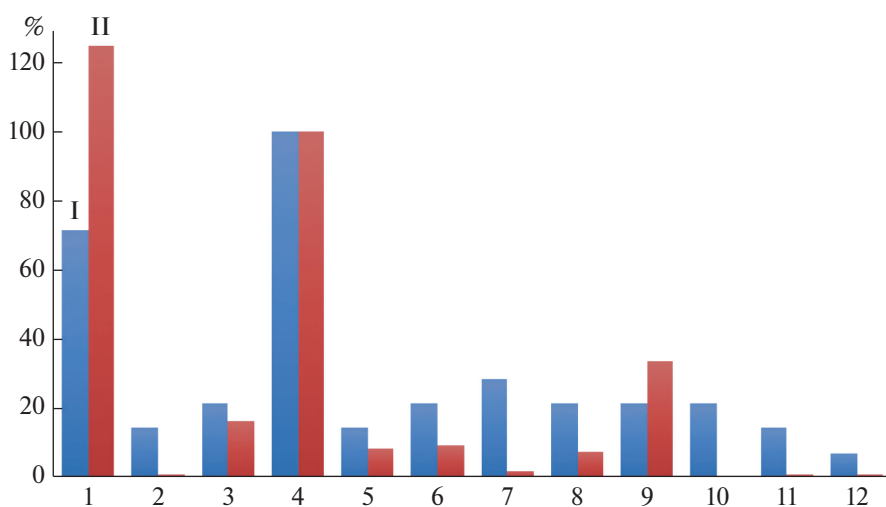
диапазоне волновых чисел от  $900$  до  $1750$  см $^{-1}$ . Суммарный спектр смеси бактериальных клеток, МУНТ и хитозана также являлся суперпозицией отдельных спектров, что говорит об отсутствии химических реакций между хитозаном, МУНТ и бактериями. Таким образом, все компоненты не должны оказывать отрицательного воздействия на активность бактериальных клеток в составе биоэлектродов.

**Субстратная специфичность.** Оценку субстратной специфичности биоэлектродов проводили с использованием нескольких типов субстратов — сахаров, низших спиртов, органических кислот и их солей (рис. 4). С помощью метода хроноамперометрии изучали изменение уровня тока электрода с иммобилизованными клетками при введении в измерительную кювету различных субстратов. Наиболее высокие сигналы для клеток *G. sacrofermentas* наблюдали в присутствии глюкозы, в то время как для клеток *G. oxydans* — в присутствии этанола. Для клеток *G. oxydans* это указывало на высокую активность алкогольдегидрогеназы, локализованной в клеточной мембране. Введение другого низкомолекулярного неразветвленного спирта — метанола — снижало уровень сигнала для *G. sacrofermentas* на 40%, а для *G. oxydans* — на 90%, как и при измерениях дыхательной активности клеток кислородным электродом типа Кларка [16]. В целом уровень сигналов электродов на основе клеток *G. oxydans* был выше для всех исследованных типов соединений. Это можно объяснить тем, что для клеток *G. sacrofermentas* характерно полное окисление субстратов до  $CO_2$  и  $H_2O$  и, скорее всего, большая часть электронов, выделяемых в процессе окисления субстратов, участвует в цикле трикарбоновых кислот, не выделяясь в окружающее клетки пространство. *G. oxydans* содержит большое количество мембраносвязанных дегидрогеназ и соответствующие продукты неполного окисления широкого спектра углеводов и спиртов (альдегиды, кетоны и органические кислоты) практически полностью выделяются в среду [22], благодаря этому электронный перенос в данной системе обеспечивает более высокий сигнал электрода.

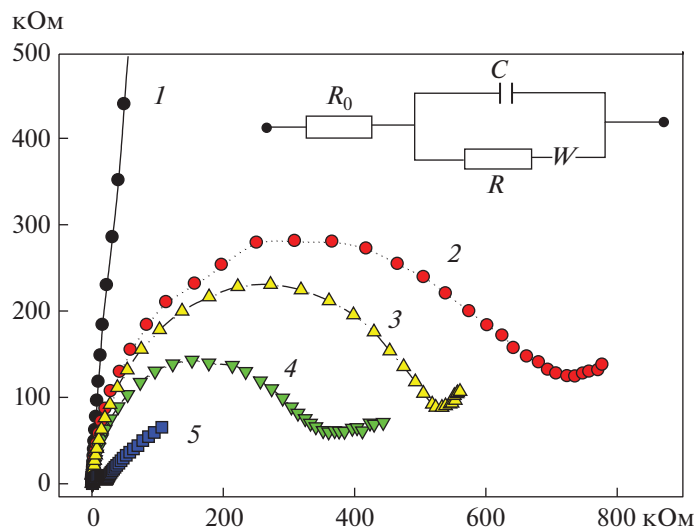
**Импедансные спектральные зависимости.** Наличие процессов электронного переноса в системе с бактериальными клетками *G. sacrofermentas* проверяли при помощи метода электрохимической импедансной спектроскопии (ЭИС), изучая значения внутреннего сопротивления биоэлектродов. Для этого были построены спектральные зависимости импеданса ЭМП с иммобилизованными клетками в присутствии и отсутствие субстрата (этилового спирта). Полученные результаты представлены в виде диаграмм Найквиста на рис. 5. Наблюдали значительное снижение общего сопротивления ЭМП для иммобилизованных



**Рис. 3.** ИК-спектры смеси хитозана и нанотрубок (1), клеток *G. oxydans* (2), их смеси с МУНТ и хитозаном (3), клеток *G. sucrofermentans* (4), их смеси с МУНТ и хитозаном (5). Спектры смещены по оси ординат для наглядности.



**Рис. 4.** Субстратная специфичность клеток штаммов *G. sucrofermentans* В-11267 (I) и *G. oxydans* В-1280 (II), иммобилизованных на графитовых печатных электродах. Субстраты: 1 – этанол, 2 – метанол, 3 – изопропанол, 4 – глюкоза, 5 – арабиноза, 6 – ксилоза, 7 – фруктоза, 8 – манноза, 9 – лактоза, 10 – лактат натрия, 11 – глутаминовая кислота, 12 – сукцинат натрия. Представлены усредненные данные по 5 измерениям для каждого субстрата, ошибка измерения составляла 2–4.8%.



**Рис. 5.** Диаграммы Найквиста для ЭМП с клетками *G. sacrofermentis* в присутствии и отсутствии субстрата. Ось X ( $Z_{re}$ ) – величина активного сопротивления, ось Y ( $Z_{im}$ ) – мнимого. 1 – без субстрата, 2 – 0.1 мМ этанола, 3 – 0.5 мМ этанола, 4 – 1.0 мМ этанола, 5 – 5.0 мМ этанола. Измерения проводились в присутствии 0.14 мМ 2,6-ДХФИФ. На вставке представлена использованная эквивалентная электрическая схема.

бактерий в присутствии данного субстрата. Следует отметить, что аналогичное изменение сопротивления наблюдали в присутствии глюкозы (не приведено). Характер изменения сопротивления был аналогичен наблюдаемому для бактерий *G. oxydans* В-1280.

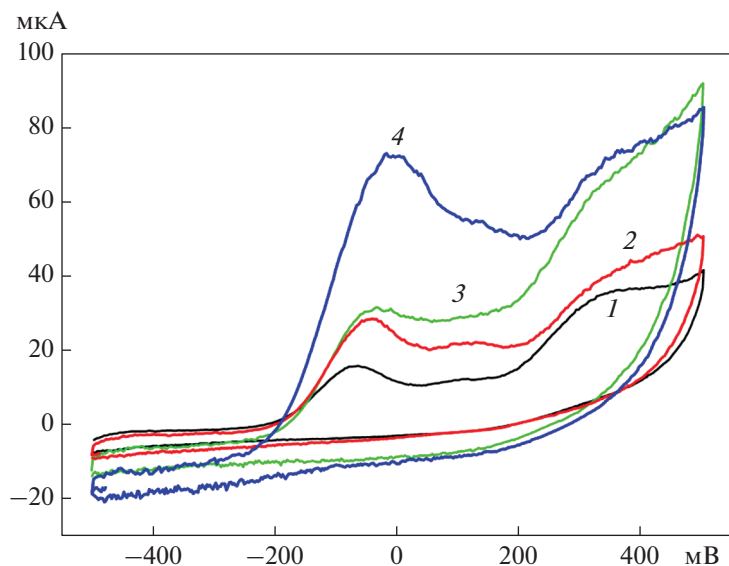
Эквивалентная схема для электрода, содержащего иммобилизованные клетки *G. sacrofermentis*, представлена на вставке к рис. 5. Сопротивление электролита в ячейке отражается параметром  $R_0$ ,  $C$  – емкость двойного электрического слоя на поверхности электрода,  $R$  – сопротивление переноса заряда,  $W$  – элемент Варбурга. В присутствии этилового спирта происходило резкое снижение значения параметра  $R$ , что указывало на появление медиаторного электронного переноса от бактериальных клеток к электроду. Кроме того, появление на эквивалентной схеме элемента Варбурга (который проявляется на диаграммах Найквиста как прямая линия с наклоном в 45 градусов в области низких частот) в присутствии субстрата показывало, что система в данном случае лимитируется диффузионными ограничениями (скоростью доставки субстрата к реакционному центру фермента), а не кинетическими. Это можно связать с наличием вокруг клеток *G. sacrofermentis* слоя бактериальной целлюлозы, которая замедляла поступление субстрата к ферментным комплексам клеток и лимитировала медиаторный электронный перенос.

**Вольтамперные зависимости и мощностные характеристики.** Для оценки потенциала практического применения клеток *G. sacrofermentis* был исследован макет БТЭ на их основе. В качестве анода и катода БТЭ использовали СГЭ.

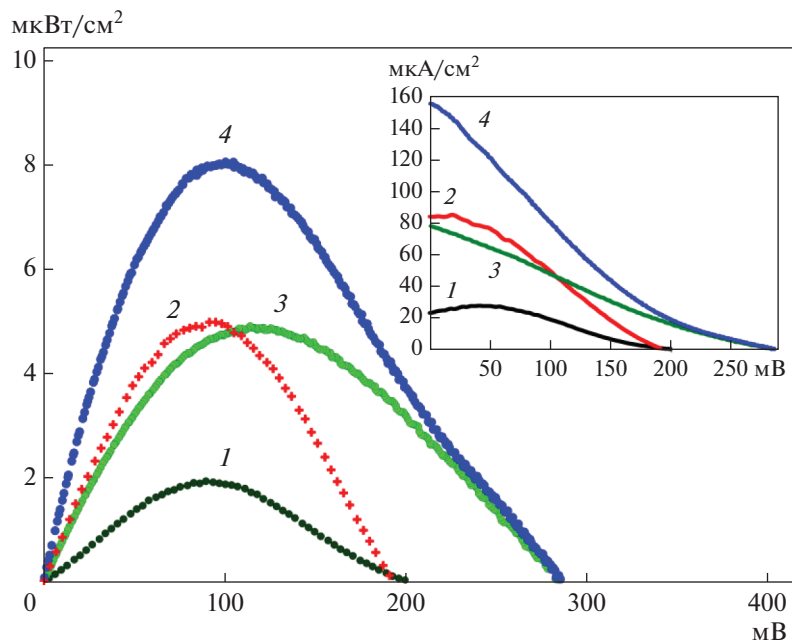
На рис. 6 представлены вольтамперные характеристики, которые характеризуют изменения токов в области отрицательных и положительных потенциалов анода, содержащего иммобилизованные бактерии *G. sacrofermentis* ВКПМ В-11267. Вольтамперные характеристики получены для контрольного состояния электрода, содержащего иммобилизованные в гель хитозана бактерии; для электрода, модифицированного МУНТ; для электрода, находящегося в среде, содержащей субстрат (этиловый спирт). Добавление в измерительную ячейку этилового спирта, выступающего в роли окисляемого компонента, приводит к росту токов в области положительных значений потенциала. Модификация анодов наноматериалом МУНТ вызывала дальнейший рост тока. Отметим, что аналогичные зависимости для данного субстрата наблюдали ранее для бактерий *G. oxydans* В-1280 [18], а также для биосенсоров на основе *G. sacrofermentis* [17]. Электрохимические характеристики БТЭ на основе клеток *G. sacrofermentis* сравнивали с аналогичными для БТЭ, содержащего клетки *G. oxydans*. Полученные поляризационные кривые и вычисленные на их основе мощностные характеристики БТЭ представлены на рис. 7.

Следует отметить, что модификация анодов обоих типов БТЭ углеродными нанотрубками повышала значение тока при данном потенциале, что отражалось на поляризационных кривых и мощностных характеристиках. Можно предположить, что каталитическая активность ферментов у *G. oxydans* выше, чем у *G. sacrofermentis*, что приводило к соответствующим различиям в генерируемой мощности (5 мкВт/см<sup>2</sup> для *G. oxydans* и 2 мкВт/см<sup>2</sup> для *G. sacrofermentis*). Тем не менее





**Рис. 6.** Циклические вольтамперные характеристики для ЭМП с клетками *G. sacrofermentas*. 1 – ЭМП с клетками, 2 – ЭМП с клетками и субстратом, 3 – ЭМП с клетками и МУНТ, 4 – ЭМП с клетками, МУНТ и субстратом. На оси X (мВ) обозначен приложенный потенциал, по оси Y (мкА) – уровень тока. Измерения проводились в присутствии 0.14 мМ 2,6-ДХФИФ. В качестве субстрата использовался 1 мМ этанол.



**Рис. 7.** Удельные мощностные характеристики (по оси X – напряжение, мВ; по оси Y – удельная мощность БТЭ, мкВт/см<sup>2</sup>) макетов БТЭ с клетками *G. sacrofermentas* и *G. oxydans*: 1 – анод с *G. sacrofermentas*, 2 – анод с *G. sacrofermentas* и МУНТ, 3 – анод с *G. oxydans*, 4 – анод с *G. oxydans* и МУНТ. Измерения проводили в присутствии 1 мМ этанола. В катодном отделении в качестве медиатора использовали ГЦФ, в анодном – ДХФИФ. На вставке – поляризационные кривые макетов БТЭ (ось X – напряжение, ось Y – плотность тока). Представлены усредненные данные по 3–5 измерениям для каждого макета БТЭ, ошибка измерения составляла 4–5%.

модификация анодов БТЭ углеродными нанотрубками вызывала рост мощности в 2.7 раза в случае *G. sacrofermentas*, в то время как для *G. oxydans* – в 1.6. Различие в мощностных характеристиках может быть связано с расположением фер-

ментных систем *G. oxydans* в мембранах клеток, что приводит к более быстрому медиаторному переносу электронов на электрод. Кроме того, наличие замкнутого ЦТК у *G. sacrofermentas*, по-видимому, приводило к переносу электронов преиму-

**Таблица 1.** Сравнение параметров макетов БТЭ, представленных в работе, с аналогами

Биоанод*		Стабильность, сут	Генерируемый потенциал, мВ	Внутреннее сопротивление БТЭ, кОм	Мощность	Ссылка
<i>G. oxydans</i> /МУНТ/хитозан		15	290	1.134	8 мкВт/см <sup>2</sup>	Данная работа
<i>G. sucrofermentas</i> /МУНТ/хитозан		7	195	1.353	5 мкВт/см <sup>2</sup>	Данная работа
Суспензия <i>G. oxydans</i> ВКМ В-1227		—	250	—	2.3 мкВт	[23]
Суспензия <i>G. oxydans</i> ВКМ В-1283		—	220	—	1.8 мкВт	[24]
<i>G. oxydans</i>	Суспензия	1	120	300	0.7 мкВт/см <sup>2</sup>	[25]
	Иммобилизованные в ПВС клетки бактерии	7	250	100	2 мкВт/см <sup>2</sup>	[26]
Смесь <i>Acetobacter aceti</i> и <i>Gluconobacter roseus</i> /никелевая пена/ПАНИ/карбид титана/хитозан		6	258	0.046	18.82 мкВт/см <sup>3</sup>	[27]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> /медь/метиленовый синий/		2	820	—	$4.48 \times 10^{-3}$ мкВт/см <sup>3</sup>	[28]
Смесь <i>Diaphorobacter</i> и <i>Paracoccus</i> /графитовая ткань		45	310	—	15.2 мкВт/см <sup>2</sup>	[29]

\* ПВС – поливиниловый спирт, ПАНИ – полианилин.

шественно внутри клетки бактерии и только часть электронов могла переноситься на электрод. Внешение в систему углеродных нанотрубок, предположительно, приводило к увеличению доли электронов, поступающих на поверхность электрода в процессе окисления субстрата.

Сравнение характеристик макетов БТЭ на основе клеток *G. sucrofermentas* и *G. oxydans* с аналогами, представленными в литературе, показало, что значения параметров полученных макетов сравнимы с параметрами БТЭ на основе других микроорганизмов (табл. 1). При этом необходимо отметить, что штамм *G. sucrofermentas* впервые был использован в качестве основы микробного топливного элемента.

Таким образом, детальное исследование базовых биоэлектрохимических и спектральных характеристик штамма *G. sucrofermentas* ВКПМ В-11267 показало возможность его использования в микробных топливных элементах. Была проведена оценка эффективного размера частиц в суспензии бактериальных клеток, получены их спектральные характеристики в присутствии и отсутствии углеродных нанотрубок, а также представлен ряд электрохимических зависимостей, отражающих поведение клеток в составе биоэлектродов различного типа. Показано, что бактерии этого штамма электрохимически активны и способны окислять как сахара, так и низшие спирты. Сопряжение клеток с МУНТ позволило добиться улучшения электрохимических параметров клеток, проявляющееся в росте тока и снижении общего сопротивления био-

электрода. При этом отметим, что БЦ, синтезируемая клетками в процессе роста, не блокирует процесс передачи заряда к электроду, однако ее наличие приводит к появлению в системе диффузионных ограничений. Получены биоэлектрохимические параметры для макетов БТЭ с иммобилизованными клетками *G. sucrofermentas* и проведено сравнение с аналогичными зависимостями для филогенетически близких микроорганизмов – *G. oxydans*. Обобщая результаты, можно отметить, что филогенетическая близость исследуемых микроорганизмов подтверждалась также сходством их биоэлектрохимических параметров.

Авторы выражают благодарность д. б. н., проф. Н.А. Кленовой (Самарский национальный исследовательский университет им. акад. С.П. Королёва) за помощь в работе со штаммом *G. sucrofermentas* В-11267.

Исследования, связанные с оценкой спектральных характеристик бактериальных клеток выполнены при финансовой поддержке РФФИ и ДНТ в рамках научного проекта № 19-58-45011. Получение электрохимических характеристик макетов БТЭ выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-23024.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Costa A.F.S., Almeida F.C.G., Vinhas G.M., Sarubbo A.L. // Front. Microbiol. 2017. V. 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02027>

2. Патент РФ. 2013. № 2536973
3. Патент РФ. 2013. № 2523606
4. Mohite B.V., Patil S.V. // Biotechnol. Appl. Biochem. 2014. V. 61. № 2. P. 101–110.
5. Nirmale T.C., Kale B.B., Varma A.J. // Int. J. Biol. Macromol. 2017. V. 103. P. 1032–1043.
6. Mashkour M., Rahimnejad M., Mashkour M., Soavi F. // J. Power Sources. 2020. V. 478. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2020.228822>
7. Lv P., Feng Q., Wang Q., Li D., Zhou J., Wei Q. // Fibers Polym. 2016. V. 17. I. 11. P. 1858–1865.
8. Evans B.R., O'Neill H.M., Malyvanh V.P., Lee I., Woodward J. // Biosens. Bioelectron. 2003. V. 18. P. 917–923.
9. Yang J., Sun D., Li J., Yang X., Yu J., Hao Q., Liu W., Liu J., Zou Z., Gu J. // Electrochim. Acta. 2009. V. 54. P. 6300–6305.
10. Costa S.V., Gonçalves A.S., Zaguete M.A., Mazon T., Nogueira A.F. // Chem. Comm. 2013. V. 49. I. 73. P. 8096. <https://doi.org/10.1039/c3cc43152e>
11. Gupta A., Singh V.K., Qazi G.N., Kumar A. // J Mol Microbiol Biotechnol. 2001. V. 3. I. 3. P. 445–56.
12. Šeřčovičová J., Filip J., Tkac J. // Chem. Pap. 2015. V. 69. P. 176–182
13. Plekhanova Y., Tarasov S., Kolesov V., Kuznetsova I., Signore M., Quaranta F., Reshetilov A. // Membranes. 2018. V. 8. № 4. P. 99. doi.org/<https://doi.org/10.3390/membranes8040099>
14. Plekhanova Y., Tarasov S., Bykov A., Prisyazhnaya N., Kolesov V., Sigaev V., Signore M.A., Reshetilov A. // Biosensors. 2019. V. 9. № 4. P. 137. doi.org/<https://doi.org/10.3390/bios9040137>
15. Macauley S., McNeil B., Harvey L.M. // Crit. Rev. Biotechnol. 2001. V. 21. № 1. P. 1–25.
16. Быков А.Г., Скрипачева О.В., Тарасов С.Е., Кленова Н.А., Решетилов А.Н. // Известия Тульского Государственного Университета. Естественные науки. 2020. № 1. С. 17–25.
17. Тарасов С.Е., Плеханова Ю.В., Быков А.Е., Кленова Н.А., Решетилов А.Н. // Российские нанотехнологии. 2020. Т. 15. № 1. С. 86–89.
18. Максимова Ю.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 1. С. 3–16.
19. Решетилов А.Н., Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Арляпов В.А., Колесов В.В., Гупоров М.А., Готовцев П.М., Васильев П.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 1. С. 1–8.
20. Wang X., Gu H., Yin F., Tu Y. // Biosens. Bioelectron. 2009. V. 24. № 5. P. 1527–1530.
21. Reshetilov A.N., Iliasov P.V., Fesay A.P., Ivashchenko G.V., Taranova L.A., Winther-Nielsen M., Emnéus J. // Appl. Biochem. Microbiol. 2005. V. 41. № 1. P. 56–62.
22. Sievers M., Swings J. The genus *Gluconobacter*. / Ed G.M. Garrity, D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley. N.Y.: Springer, 2005. P. 77–81.
23. Патент РФ. 2011. № 108217
24. Патент РФ. 2011. № 109758
25. Alferov S.V., Minaicheva P.R., Arlyapov V.A., Asulyan L.D., Alferov V.A., Ponomareva O.N., Reshetilov A.N. // Appl. Biochem. Microbiol. 2014. V. 50. № 6. P. 637–643.
26. Алфёров С.В., Арляпов В.А., Алфёров В.А., Решетилов А.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 6. С. 637–643.
27. Karthikeyan R., Krishnaraj N., Selvam A., Wong J.W.-C., Lee P.K.H., Leung M.K.H., Berchmans S. // Bioresour. Technol. 2016. V. 217. P. 113–120.
28. Permana D., Rosdianti D., Ishmayana S., Rachman S.D., Putra H.E., Rahayuningwulan D., Hariyadi H.R. // Procedia Chem. 2015. V. 17. P. 36–43.
29. Hou L., Yang Q., Li J. // Biotechnol. Bioprocess Eng. 2020. V. 25. I. 3. P. 470–476.

## Perspective of Using *Gluconacetobacter sucrofermentas* ВКПМ В-11267 in Biofuel Cells

S. E. Tarasov<sup>a</sup>, Yu. V. Plekhanova<sup>a</sup>, A. G. Bykov<sup>a</sup>, A. S. Kazakov<sup>b</sup>, M. V. Vishnevskaya<sup>c</sup>,  
Yu. M. Parunova<sup>c</sup>, P. M. Gotovtsev<sup>c</sup>, and A. N. Reshetilov<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Pushchino Biological Research Center, Stryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms Russian Academy of Sciences, Moscow oblast, Pushchino, 142290 Russia

<sup>b</sup>Pushchino Biological Research Center, Institute for Biological Instrumentation Russian Academy of Sciences, Moscow oblast, Pushchino, 142290 Russia

<sup>c</sup>National Research Center Kurchatov Institute, Moscow, 123182 Russia

\*e-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru

The bioelectrochemical and spectral properties of immobilized *Gluconacetobacter sucrofermentas* ВКПМ В-11267 bacteria were studied in the presence and absence of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs). The obtained characteristics were compared with the characteristics of *Gluconobacter oxydans*, which are phylogenetically close to them and widely used in bioelectrochemistry. It was shown that the modification of the bioelectrode with carbon nanotubes leads to a significant increase in the current level (by 2.5–3 times), as well as to a decrease in the total resistance both in the absence of substrates and in their presence. The possibility of using immobilized *G. sucrofermentas* cells as part of a microbial fuel cell (MFC) is considered. The specific electrical power of MFC based on immobilized *G. sucrofermentas* cells was lower than that of MFC based on *G. oxydans* cells. Nevertheless, the results obtained indicate that *G. sucrofermentas* ВКПМ В-11267 cells can serve as a biocatalyst in microbial fuel cells.

**Keywords:** bioelectrodes, Acetobacteria, *Gluconobacter oxydans*, *Gluconacetobacter sucrofermentas*, multi-walled carbon nanotubes, microbial fuel cell, spectral analysis

УДК 608.3.: 316.422.42

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАТЕМАТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ С ЦЕЛЬЮ ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

© 2021 г. Е. В. Коротков<sup>1</sup>, \*, И. В. Яковлева<sup>1</sup>, А. М. Камионская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: bioinf@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.06.2020 г.

После доработки 30.10.2020 г.

Принята к публикации 02.11.2020 г.

В России и в мире остро стоит вопрос относительно создаваемых генетическими технологиями потенциальных угроз национальной и биологической безопасности и необходимости совершенствования или введения новых, оправданных и адекватных мер контроля, регулирования для их предотвращения. В настоящее время значительный объем мирового рынка занимают 5 основных трансгенных культур, а их производители готовы к переходу на сельскохозяйственные культуры с редактированным геномом, одобренными в США, Аргентине и некоторых других странах. Предлагается качественно новый подход к оценке рисков отредактированных растительных организмов — “Безопасное проектирование”. Математический подход, крайне востребованный и принципиально новый подразумевает разработку методик, использующих сочетание полногеномного секвенирования и биформационных методов для оценки биобезопасности сельскохозяйственных культур. Он делает реальностью детальный анализ возможных вставок фрагментов ДНК в геном отредактированных сельскохозяйственных растений и выяснение их биологического значения. Разработанный метод может служить для быстрого скрининга растительных организмов на присутствие потенциально опасных генов, вирусных последовательностей и неспецифических промоторных последовательностей.

*Ключевые слова:* трансгенные растения, отредактированные культуры, безопасное проектирование, биобезопасность, полные геномы, вставки, мутации, выравнивание, динамическое программирование

DOI: 10.31857/S0555109921020069

Долгосрочная стратегия России в области генетических технологий требует проведения фундаментальных исследований для анализа потенциальных рисков получаемой новой продукции с точки зрения национальной и биологической безопасности, а также необходимости совершенствования или введения новых, оправданных и адекватных мер контроля и регулирования выявленных рисков. Масштабы биогенных угроз, сопровождающих перспективные новейшие технологии, с очевидностью, не имеют межгосударственных границ [1]. Современные геномные и постгеномные технологии вносят в биотехнологический “ландшафт” ранее не существовавшие биотехнологические продукты — новые биоагенты, в том числе антропогенного происхождения. Экономические оценки соотношения “преимущества–риски” использования постгеномных биотехнологий показывают правомочность их интенсивного внедрения, так как это обещает резко повысить эффективность агропромышленного комплекса, что стало необходимо в условиях эко-

номического кризиса, вызванного пандемией. Однако по мере нарастания объемов и спектра биотехнологических (генно-инженерных) продуктов разного назначения, опасения общества как за рубежом, так и в России [2] фокусируются на еще нерешенных наукой проблемах таких, как:

— недостижимость абсолютной биобезопасности инновационных технологий;

— угрозы непреднамеренного или несанкционированного выпуска биотехнологической продукции в окружающую среду (трансгенные растения и животные, рекомбинантные микроорганизмы);

— горизонтальный или вертикальный перенос трансгена от биотехнологических культур к немодифицированным аналогам;

— неконтролируемая утечка в окружающую среду генетических конструкций в ходе генно-инженерных экспериментов или производства рекомбинантных продуктов и другие биоугрозы [3].

Использование природоподобных генетических технологий для ускоренной селекции растений, на-

пример, технологии CRISPR/Cas, позволяет с недостижимой ранее точностью и эффективностью вносить мутации в первичную последовательность ДНК растительного генома, открывает широкие перспективы также и для эпигенетических изменений. Одновременно, эта технологическая новация ставит вопросы о неприменимости конкретных действующих нормативных положений, касающихся биобезопасности, к растениям с редактированным геномом.

Само понятие биологической безопасности в российском законодательном поле определено несколькими документами высокого уровня. Так, Указ Президента РФ N 683 (2015 г. <https://rg.ru/2015/12/31/nac-bezopasnost-site-dok.html>) рассматривает биобезопасность в составе нормы о национальной безопасности (статья 3). Определение биобезопасности дается в российском ГОСТ (ГОСТ Р 22.0.04-95 <http://www.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc&base=EXP&n=267373#042176372250623007>): **“Биологическая безопасность** – состояние защищенности людей, сельскохозяйственных животных и растений, окружающей природной среды от опасностей, вызванных или вызываемых источником биолого-социальной чрезвычайной ситуации”. Более узко, в части генно-инженерно-модифицированных организмов (ГМО), под **биобезопасностью ГМО** понимается отсутствие фактического или прогнозируемого нежелательного воздействия ГМО (в сравнении с исходным немодифицированным организмом) на окружающую среду, здоровье человека и животных.

Российское правовое поле в сфере обеспечения биобезопасности использования генетически модифицированных растений разрознено и весьма противоречиво. Так, Федеральный закон № 358-ФЗ (2016 г.), запрещает выращивание и разведение растений и животных, генетическая программа которых изменена с использованием методов геномной инженерии и которые содержат генно-инженерный материал, внесение которого не может являться результатом природных (естественных) процессов. А согласно статье 7 ФЗ-149 “О семеноводстве” (1997 г. [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_17121/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_17121/)), запрещается ввозить на территорию Российской Федерации и использовать для посева (посадки) семена таких растений. Однако этот запрет на производство на территории России не распространяется на импорт полученных с использованием геномной инженерии продовольственных культур с целью использования в качестве пищевых продуктов для населения и кормов для животных. Регистрационный процесс успешно функционирует в сфере пищевого использования для населения, а регистрация тех же генетически модифицированных (ГМ) сельскохозяйственных культур в качестве кормов для животных должна регулироваться

Правилами, утвержденными Постановлением правительства № 839, которые устарели, не вступив в действие с 2013 года. На настоящий момент ввоз ГМО растительного происхождения для использования в качестве кормов все еще регулируется отдельными решениями (ПП № 520, 2020 г. <http://www.garant.ru/hotlaw/federal/1362141/#ix-zz6PNkFMbJE>), обоснованными реальной потребностью агропромышленного комплекса, например, в ГМ сое как источнике белка.

**Методическая база и проблемы нормативно-правового регулирования оборота трансгенных/редактированных сельскохозяйственных растений.** Рассмотрение методической базы, используемой для выявления специфических последовательностей ДНК в растительных тканях, растительном сырье и продуктах их переработки, показывает, что она основана на методе полимеразной цепной реакции в различных вариантах: в режиме реального времени [4], в матричном формате (Приказ Минсельхоза России, 2017), а также на основе биологического микрочипа [5].

Данные Международной службы по коммерциализации достижений агроботехнологии (ISAAA [www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/article/default.asp?ID=18166](http://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/article/default.asp?ID=18166)) демонстрируют, что в 2018 г. 5 основных ГМ (трансгенных) культур занимали 99% мировых площадей генно-инженерно-модифицированных сельскохозяйственных культур: 38 линий ГМ сои – 95.9 млн. га, 137 линий ГМ кукурузы – 58.9 млн. га, 63 линии ГМ хлопчатника – 24.9 млн. га, 37 линий ГМ рапса – 10.1 млн. га, 5 линий ГМ люцерны – 1.3 млн. га. Учитывая, что в России за период 1999–2018 гг. зарегистрировано всего 25 линий ГМО растительного происхождения, большая часть ГМ линий остается за рамками регистрации, и, следовательно, отсутствуют системы их идентификации. Этим определяются следующие высокие риски: а) потери контроля за несанкционированным появлением на российском рынке не идентифицированных ГМО в связи отставанием/отсутствием референсных материалов и технологий обнаружения и идентификации ГМО; б) проникновения на продовольственный и кормовой рынки незарегистрированной ГМ продукции, поступающей по импорту.

Анализ достижений в области создания редактированных растений позволяет заключить, что возрастают риски трансграничного перемещения не классических трансгенных растений, а продукции новых технологий, например, редактированных культур SDN-1 и SDN-2, не содержащих трансгенов [6].

Так, в июне 2020 г. Инспекция здоровья животных и растений (APHIS) Государственного Департамента сельского хозяйства США (USDA) утвердила нерегулируемый статус для сои “HOLL” с высоким содержанием масла, состав

**Таблица 1.** Рейтинг нормативных ограничений геномного редактирования в сельском хозяйстве некоторых стран

Страна	Рейтинг, балл	Статус рейтинга
Бразилия	10	Определен: нет уникальных правил
Аргентина	10	Определен: нет уникальных правил
США	10	Определен: нет уникальных правил
Израиль	8	Слабо регулируемый
Чили	5	Правила в разработке
Парагвай	10	Определен: нет уникальных правил
Япония	8	Слабо регулируемый
Канада	8	Слабо регулируемый
Австралия	8	Слабо регулируемый
Индия	5	Правила в разработке
Россия	5	Правила в разработке
Китай	5	Правила в разработке
Великобритания	2	В основном запрещено
ЕС	2	В основном запрещено
Украина	1	Ограниченные исследования, нет четких правил

которой характеризуется низким содержанием линоленовой кислоты, компании Каликс (“Calyxt”, США <https://calyxt.com/calyxts-high-oleic-low-linolenic-soybean-deemed-non-regulated-by-usda/>). Соя “HOLL” – единственный коммерциализованный продукт, который относится к продуктам второго поколения, то есть обладает свойствами, важными для потребителя: более высокой стабильностью и улучшенным составом масла для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний. Соя “HOLL” была получена с использованием технологии TALENs® в варианте компании “Каликс” [7], она содержит генетический материал только исходного организма (сои) с делециями в пяти целевых генах. Это означает, что соя с отредактированным геномом может появиться на рынке США через два года, а затем – и на мировом рынке. Соя “HOLL” компании “Каликс” – один из 8 продуктов компании, находящихся на данный момент в стадии разработки, и, как предполагается, они все получают нерегулируемый статус USDA (i.7, part 340. <https://www.law.cornell.edu/cfr/text/7/part-340>).

Продукция геномного редактирования, во многом, отвечает на “большие вызовы” и в перспективе обеспечит множество практических приложений в самых разнообразных областях, включая традиционное и нетрадиционное агропроизводство, создаст принципиально новые продукты, не имеющие традиционных аналогов.

В России вопрос об исключении отредактированных нетрансгенных растений из законодательного поля, относящегося к ГМО, находится в стадии научного обсуждения, и рассматривается также в свете научно-технической политики, экономики, взаимодействия с обществом. За рубежом также развернута активная дискуссия по выяснению сходства и различия старых и новых

рисков, присущих уже привычным и новым биотехнологическим продуктам и способам их коммерциализации (выпуска). Основным аргументом за “освобождение” из-под ГМО регулирования не содержащих трансгенов отредактированных культур, является тот факт, что они не отличимы от растений, созданных традиционными способами [8, 9]. Можно предположить, что и любые риски, связанные с продуктами геномного редактирования, будут аналогичными, равными или меньшими, чем риски, связанные культурами, полученными известными методами селекции, или уже коммерциализованными продуктами [10, 11]. В табл. 1 приведен рейтинг стран по введению нормативных ограничений использования продуктов геномного редактирования в сельском хозяйстве в свете действующего в этих странах регулирования [12]. Из этих результатов видно, что страны-лидеры по производству трансгенных культур (Бразилия, Аргентина, США) вырвались и в мировые лидеры геномного редактирования растений, особенно это относится к Аргентине [13].

В табл. 2 приведены некоторые сельскохозяйственные культуры, полученные технологией геномного редактирования, которые проходят процедуры испытаний и находятся на той или иной стадии регистрации.

Таким образом, ясно, что в ближайшие годы в оборот на мировой рынок поступит широкий ассортимент отредактированных сельскохозяйственных культур. Чтобы раскрыть перспективы и потенциал геномного редактирования и проводить успешно политику ответственных инноваций, необходимо пересмотр методов идентификации, детекции и мониторинга новой биотехнологической продукции, в частности, переход к использованию методов высокопроизводительного секвенирования и биоинформатики. Потенциальным биоопас-

Таблица 2. Редактированные сельскохозяйственные культуры

Культура	Компания-разработчик, метод	Статус
Устойчивый к вирусам томат <a href="https://www.nexgenplants.com/">https://www.nexgenplants.com/</a>	Nexgen Plants (Австралия)	Одобен USDA для начала полевых испытаний в 2017 г.
Микро-томат <a href="https://thecounter.org/international-space-station-gene-edited-tomato/">https://thecounter.org/international-space-station-gene-edited-tomato/</a>	Университет Калифорнии, Риверсайд, США CRISPR	Для использования на Международной космической станции, а также в закрытых помещениях и других ограниченных пространствах
Виноград, устойчивый к вирусу скручивания листьев <a href="https://geneticliteracyproject.org/2018/09/21/are-we-ready-for-genetically-modified-wine/">https://geneticliteracyproject.org/2018/09/21/are-we-ready-for-genetically-modified-wine/</a>	Университет Рутгерс, США, CRISPR	
Яблоко, нечернеющее : Сорта Arctic Golden, Granny Smith и Fuji <a href="https://www.arcticapples.com/how-did-we-make-nonbrowning-apple/">https://www.arcticapples.com/how-did-we-make-nonbrowning-apple/</a>	Okanagan Specialty Fruits, РНК-интерференция	Одобрены USDA
Солеустойчивый рис <a href="https://www.forbes.com/sites/ariellasmike/2020/02/21/you-may-find-salt-tolerant-rice-growing-in-the-ocean-by-2021/?subId1=xid:fr1582662210931gjd#1c4569ce4133">https://www.forbes.com/sites/ariellasmike/2020/02/21/you-may-find-salt-tolerant-rice-growing-in-the-ocean-by-2021/?subId1=xid:fr1582662210931gjd#1c4569ce4133</a>	Agrisea, редактирование	Плавающие океанские фермы
Пшеница с высоким содержанием клетчатки <a href="https://calyxt.com/calyxt-harvests-high-fiber-wheat-field-trials/">https://calyxt.com/calyxt-harvests-high-fiber-wheat-field-trials/</a>	Calyxt, редактирование	Одобрена USDA для полевых испытаний в 2018 г.
Камелина (растение из семейства горчичных) с улучшенным составом масла (омега-3) <a href="https://www.nature.com/articles/nbt0118-6b.epdf?shared_access_token=SS4V7V5nwo6_VHeVnriWkNRgN0jAjWel9jnR3ZoTv0MwSccfXlkuLBSzumLMvCj9t-ForwjJaKkVVBMsLKWESjOw0sSf21kBJtFPCTmLUrUKqgSmVjPXProuCNHw0Ww98VQyz5Rr-Fyg2BDc5u16A%3D%3D">https://www.nature.com/articles/nbt0118-6b.epdf?shared_access_token=SS4V7V5nwo6_VHeVnriWkNRgN0jAjWel9jnR3ZoTv0MwSccfXlkuLBSzumLMvCj9t-ForwjJaKkVVBMsLKWESjOw0sSf21kBJtFPCTmLUrUKqgSmVjPXProuCNHw0Ww98VQyz5Rr-Fyg2BDc5u16A%3D%3D</a>	Yield10 Bioscience CRISPR	Одобрена USDA в 2017 г.
Засухоустойчивая и солеустойчивая соя <a href="https://www.nature.com/articles/nbt0118-6b.epdf?shared_access_token=SS4V7V5nwo6_VHeVnriWkNRgN0jAjWel9jnR3ZoTv0MwSccfXlkuLBSzumLMvCj9t-ForwjJaKkVVBMsLKWESjOw0sSf21kBJtFPCTmLUrUKqgSmVjPXProuCNHw0Ww98VQyz5Rr-Fyg2BDc5u16A%3D%3D">https://www.nature.com/articles/nbt0118-6b.epdf?shared_access_token=SS4V7V5nwo6_VHeVnriWkNRgN0jAjWel9jnR3ZoTv0MwSccfXlkuLBSzumLMvCj9t-ForwjJaKkVVBMsLKWESjOw0sSf21kBJtFPCTmLUrUKqgSmVjPXProuCNHw0Ww98VQyz5Rr-Fyg2BDc5u16A%3D%3D</a>	Университет Миннесоты, США, CRISPR	Одобрена USDA в 2017 г.
Высокоурожайный томат с увеличенным количеством плодов и уменьшенным ветвлением, и количеством листьев <a href="https://qz.com/989925/scientists-are-perfecting-salad-by-editing-mutated-tomato-genes/">https://qz.com/989925/scientists-are-perfecting-salad-by-editing-mutated-tomato-genes/</a>	Лаборатория Колд-Спринг-Харбор, редактирование	Разработан в 2017 г.
Люцерна улучшенного качества <a href="https://swseedco.com/press-release/calyxt-and-sws-gene-edited-alfalfa-plant-designated-as-non-regulated-by-usda/">https://swseedco.com/press-release/calyxt-and-sws-gene-edited-alfalfa-plant-designated-as-non-regulated-by-usda/</a>	Calyxt, TALEN	Нерегулируемый статус USDA в 2017 г.
Устойчивая к снежной плесени пшеница <a href="https://www.nature.com/news/gene-editing-surges-as-us-rethinks-regulations-1.19724">https://www.nature.com/news/gene-editing-surges-as-us-rethinks-regulations-1.19724</a>	Calyxt, TALEN	
Картофель не чернеющий <a href="https://geneticliteracyproject.org/2016/10/27/calyxts-bruise-resistant-non-browning-gmo-potato-cleared-sale/">https://geneticliteracyproject.org/2016/10/27/calyxts-bruise-resistant-non-browning-gmo-potato-cleared-sale/</a>	Calyxt, TALEN	Одобен USDA в 2016 г.

Таблица 2. Окончание

Культура	Компания-разработчик, метод	Статус
Кукуруза с высоким содержанием крахмала (восковая кукуруза) <a href="https://www.washingtonpost.com/news/wonk/wp/2017/06/13/how-one-company-plans-to-change-your-mind-about-genetically-edited-food/">https://www.washingtonpost.com/news/wonk/wp/2017/06/13/how-one-company-plans-to-change-your-mind-about-genetically-edited-food/</a>	DuPont, CRISPR	Нерегулируемый статус USDA в 2016 г.
Устойчивая к засухе кукуруза <a href="https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pbi.12603">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pbi.12603</a>	DuPont, CRISPR	Разработана в 2016 г.
Шампиньоны <a href="https://www.scientificamerican.com/article/gene-edited-crispr-mushroom-escapes-u-s-regulation/">https://www.scientificamerican.com/article/gene-edited-crispr-mushroom-escapes-u-s-regulation/</a>	Университет штата Пенсильвания, США, CRISPR	Нерегулируемый статус USDA в 2016 г.

ностям, связанным с новейшими технологиями, необходимо противопоставить качественно новый подход – “Безопасное проектирование”. Под этим термином имеется ввиду процесс, который можно определить как внедрение процедуры идентификации и оценки рисков на ранних этапах процесса проектирования, что позволит устранить или минимизировать риски в течение всего срока жизни создаваемого организма. Предлагаемый подход состоит во внедрении технической экспертизы в максимально ранний период планирования/проектирования/разработки создаваемой растительной культуры. Интересна в этом плане практика Аргентины, которая предлагает разработчикам консультации в “Офисе регулятора” на стадии планирования [13]. Превентивность оценки рисков новых редактированных растительных культур на основании накопленных достоверных научных данных, включая многолетний мониторинг и полевые испытания, сопоставима с оценкой безопасности в авиационной или ядерной промышленности, закладывает основу “культуры безопасности” в области биотехнологии растений.

Можно сформулировать ряд задач, требующих решения в связи с внедрением этого предложения.

1. Разработать методики детекции генно-инженерных манипуляций в геноме не трансгенных биотехнологических растительных культур, которые могли бы подтвердить отсутствие нецелевых мутаций, отсутствие экспрессии нового белка (белков), обладающих аллергенностью и/или токсичностью за счет сдвига рамки считывания.

2. Показать, могут ли новые биотехнологические растения представлять какие-либо типы рисков, в частности, иные типы рисков по сравнению с уже изученными трансгенными растениями.

3. Определить существуют ли новые области использования, в которых хорошо или недостаточно понятны новые риски.

4. Разработать модель ранней оценки рисков редактированных растений, используя принцип “Безопасного проектирования”. Повышение

уровня безопасности может быть достигнуто за счет включения параметров/функций безопасности в стандарт разработки протоколов по сертификации безопасности.

**Идентификация в геноме сельскохозяйственной продукции разнообразных искусственных вставок фрагментов ДНК.** В разделе будут рассмотрены возможности биоинформатики для идентификации искусственных перестроек в геноме. За последние 30 лет биоинформатика разработала разнообразные компьютерные методы для изучения последовательностей оснований ДНК и РНК. Самой первой задачей было парное сравнение двух последовательностей оснований ДНК, РНК или двух аминокислотных последовательностей. Эта задача в настоящее время имеет наиболее полное решение, которое получено с использованием динамического программирования [14]. В этом случае имеются две последовательности и нужно сделать вывод об их подобии в условиях замены нуклеотидов или аминокислот, а также их вставок или делеций в заранее неизвестных местах и неизвестной длины. В настоящее время разработаны методы глобального и локального сравнения последовательностей [15, 16]. При глобальном выравнивании две последовательности сравниваются от начала до конца. При локальном выравнивании происходит поиск фрагментов двух последовательностей, которые совпадают наилучшим образом. Разработаны также эвристические программы семейства Blast и программа Fasta [15, 17–19]. Несмотря на то, что эти программы используют эвристические алгоритмы, они достаточно точно могут находить парное подобие между аминокислотными последовательностями.

В дальнейшем эта задача была расширена для сравнения разнообразных геномов. Созданы так называемые геномные браузеры, которые позволяют сравнивать уже не сравнительно короткие последовательности, а полные геномы между собой. К самым популярным из них можно отнести UCSC Genome Browser и Ensembl Genome Browser



[20, 21]. Разработаны также специализированные программы для сравнения последовательностей полных геномов [22, 23]. Эти инструменты позволяют сравнить любой растительный или животный геном рассматриваемой продукции с тем геномом, который уже был секвенирован. Кроме того, можно провести множественное сравнение разнообразных геномов или определенных их участков. Такое сравнение геномов позволяет сравнительно просто обнаружить вставки или делеции фрагментов ДНК, которые есть в одном геноме и которых нет в другом геноме. Это позволяет четко выявлять также и точечные мутации (SNP).

Одновременно с развитием методов сравнения последовательностей оснований ДНК интенсивно развивались банки данных, которые содержат большую часть того, что было секвенировано в мире. Можно выделить два основных банка данных. Это банк данных EMBL [24], который был создан Европейской молекулярно-биологической лабораторией (образована 20 странами-участницами и страной-партнером Австралией) и Genbank [25]. В этих банках данных собраны не только последовательности различных фрагментов ДНК, но и последовательности разнообразных полных геномов. К этим геномам относятся геномы многих бактерий, вирусов, растений и животных. Созданы также банки данных, описывающие в деталях геномы отдельных организмов, например, видов пасленовых, среди которых важные для сельского хозяйства культуры томат *Solanum lycopersicum*, картофель *S. tuberosum*, перец *Capsicum annuum* (<https://www.solgenomics.net/>), включая дикорастущие родственные виды данных культур, которые являются донорами различных агрономически ценных признаков (например, устойчивость к абиотическим и биотическим стрессам) при селекции сортов.

Наличие такой информации может позволить найти для сельскохозяйственного растения (СР) референсный геном. Под референсным геномом будем понимать геном традиционного СР, который был уже ранее секвенирован и внесен в базу данных, поэтому далее можно рассмотреть две ситуации: ситуацию, когда присутствует референсный геном, и ситуацию, когда референсный геном для СР отсутствует.

*Референсный геном присутствует.* В этом случае, если будет определена последовательность ДНК генома СР, то можно сравнить его биоинформационными методами с референсным геномом. В результате этого сравнения можно выявить разнообразные вставки или делеции фрагментов ДНК, которые могли бы быть сделаны в геноме СР, а также точечные замены оснований в геноме. Таким образом, при наличии референсного генома и секвенированного генома СР, проблема поиска каких-либо незаявленных вставок или

делеций на сегодняшний день может быть решена. В этом случае можно обеспечить полный контроль за биобезопасностью СР на уровне генома.

Возникает также вопрос, какие виды вставок или делеций в геноме СР обладают наибольшей биологической опасностью. К наиболее потенциально опасным можно отнести некоторые вставки промоторных последовательностей, вставки потенциально опасных генов или вставки каких-либо вирусных последовательностей или их частей. При вставке промоторных последовательностей возможно изменение профиля экспрессии каких-либо генов в геноме СР, которое может привести к изменениям в процессах развития растения. В силу этого СР может получить новые биологические свойства, которых не было у растения с референсным геномом. Если вставляются какие-либо гены, то потенциальная опасность зависит от функционального значения введенного гена. Наиболее опасными являются гены, кодирующие разнообразные токсины. К не менее опасным вставкам в геном СР можно отнести и фрагменты ДНК, принадлежащие разнообразным вирусам как человека, так и сельскохозяйственных животных или растений. При этом даже вирусы растений не могут быть признаны полностью безопасными для человека и животных [26]. В этом случае использование таких СР может иметь серьезные последствия для населения или для сельского хозяйства РФ.

*Референсный геном отсутствует.* Далеко не всегда геном СР имеет референсный геном. В этом случае алгоритмы парного и множественного сравнения геномов не позволяют выявить сделанные искусственно перестройки генома нового продукта сельского хозяйства, так как сравнивать геном СР не с чем, поэтому кроме сравнительных методов анализа необходимо развивать математические методы и алгоритмы аннотации потенциально опасных геномных последовательностей. Под аннотацией понимается определение функциональной роли различных последовательностей СР. В геноме СР можно проводить поиск последовательностей по их функциональному значению. Для такого поиска необходимо создать множества (базу данных) биологически опасных последовательностей ДНК, которые не должны присутствовать в геноме СР. К таким последовательностям минимально можно отнести:

1. разнообразные вирусные последовательности как человека, так и сельскохозяйственных растений или животных;
2. последовательности генов, которые кодируют бактериальные токсины или токсины любого другого происхождения;
3. все промоторные последовательности, которые могут быть найдены около генов, которые перечислены в пункте 2.

Поиск промоторных последовательностей в геномах СР важен по двум причинам. Во-первых, обнаружение промоторных последовательностей указывает на местоположение возможных генов, что может помочь в их идентификации. Во-вторых, промоторные последовательности позволяют в ряде случаев отличить гены от псевдогенов и указывают на точки начала транскрипции (TSS). Это означает, что идентификация промоторных последовательностей может помочь выделить те гены, которые могут транскрибироваться в СР. Для такой идентификации нужна последовательность полного генома сельскохозяйственного растения. В настоящее время полногеномное секвенирование является достаточно финансово затратной технологией, однако стоимость секвенирования падает, и в ближайшие годы станет возможным его массовое применение.

Возникает вопрос – как можно найти последовательности, перечисленные в пунктах 1–3 в геноме СР, если референсный геном отсутствует? Для поиска таких последовательностей можно использовать стандартный подход, который состоит в том, чтобы создать множество последовательностей ДНК ( $M$ ), которые выполняют одну и ту же биологическую функцию. Это так называемая обучающая выборка. В обучающую выборку желательно включать такие подобию, которые приходится только на потенциально биологически опасные последовательности. Таким образом, необходимо проанализировать все существующие банки данных нуклеотидных последовательностей и создать для каждой потенциально опасной последовательности из пунктов 1–3 свое собственное множество  $M$ .

Затем для каждого множества  $M$  создается скрытая марковская модель (СММ), которая используется при поиске последовательностей ДНК, выполняющих те же биологические функции, что и последовательности множества из множества  $M$  [27–29]. Эта скрытая марковская модель “сканируется” по всему геному СР и таким способом находят последовательности, которые являются членами множества  $M$ . Это означает, что в геноме СР можно найти значительную часть потенциально опасных последовательностей, для которых было создано множество  $M$ . Таким способом были аннотированы многие гены и белковые семейства. Создать множества разнообразных патогенов, вирусных последовательностей сравнительно легко, если использовать существующие базы данных EMBL и Genbank. Однако на этом пути есть трудности, которые невозможно решить существующими математическими методами.

Проблема состоит в том, что использование СММ прекрасно работает, пока последовательности не накопили достаточное количество вставок и замен нуклеотидов, а также вставок или делеций

как отдельных нуклеотидов, так и протяженных последовательностей. Если же во множестве  $M$  число мутаций на нуклеотид между любой парой последовательностей будет больше чем 2.4 [30], то статистически значимое множественное выравнивание последовательностей построить не удастся. Это приведет к тому, что поиск последовательностей в геноме СР, которые имеют такое же функциональное значение, как и последовательности из множества  $M$ , будет невозможен, то есть, последовательность с данной биологической функцией, например, потенциальный токсин, будет существовать в геноме СР, однако выявить ее существующими подходами не удастся.

Это приводит к необходимости разработки новых математических методов для идентификации разнообразных последовательностей ДНК в геномах СР, которые не имеют референсного генома. Это означает, что полная биологическая безопасность сельскохозяйственных растений, которые не имеют референсного генома, в настоящее время достигнута быть не может.

Для решения задачи полного выявления возможных вставок или делеций в геноме СР предлагается использовать новый метод для построения множественного выравнивания для сильно различающихся нуклеотидных последовательностей (MAHDS). На сайте <http://victoria.biengi.ac.ru/mahds/auth> этим методом можно построить множественное выравнивание для нуклеотидных последовательностей. Под сильно различающимися последовательностями будем понимать последовательности, накопившие более 2.5 случайных замен ( $x$ ) на один нуклеотид относительно друг друга. MAHDS позволяет строить статистически значимые выравнивания для  $x$  в интервале от 2.4 до 4.4 (<http://victoria.biengi.ac.ru/mahds/auth>) [31]. Показано [31], что ранее разработанные алгоритмы могут строить статистически значимые множественные выравнивания до  $x < 2.4$ .

В настоящее время MAHDS был применен для построения множественного выравнивания промоторных последовательностей из генома *Arabidopsis Thaliana* и генома человека [32]. Эта работа показала, что статистически значимое множественное выравнивание для промоторных последовательностей невозможно рассчитать существующими методами, так как для них  $x = 3.6$  [31]. Множественное выравнивание для 4220 промоторных последовательностей из генома риса было построено методом MAHDS. Разработан также метод создания классов промоторов на основе проведенного множественного выравнивания. Всего удалось создать 5 классов промоторных последовательностей с объемом классов более 100 промоторов. Полученные классы промоторных последовательностей были использованы для поиска других промоторных последовательностей в геноме риса. Для

каждого класса была создана профильная матрица размером (16.600) [33, 34]. Поиск потенциальных промоторных последовательностей проводился для каждой матрицы с использованием глобального выравнивания. Всего удалось выявить 145277 потенциальных промоторов. Из них 18563 приходились на промоторы известных генов, что составило около 46% от аннотированных генов. Для расчета числа ложных позитивов был применен алгоритм, разработанный для анализа случайно перемешанных нуклеотидных последовательностей полного генома риса. Число ложных позитивов в этом случае составило около  $1 \times 10^{-8}$  на один нуклеотид. Если в качестве контроля брали инвертированную последовательность хромосом из генома риса и применяли к ней разработанный алгоритм, то число ложных позитивов составляло  $4 \times 10^{-7}$ . В любом случае это значительно меньше, чем у всех используемых методов для поиска промоторных последовательностей в эукариотических геномах.

Существующие алгоритмы для предсказания промоторных последовательностей не могут построить статистически значимое выравнивание для промоторных последовательностей и поэтому они используют другие математические подходы. Это такие алгоритмы как TSSW [35], PePPER [36], G4PromFinder [37] и многие другие. Лучшие алгоритмы предсказывают ложный позитив на уровне  $10^{-3}$ – $10^{-4}$  на нуклеотид, в то время как геном риса содержит  $\sim 4.3 \times 10^8$  оснований ДНК. В результате среди десятков тысяч ложных предсказаний невозможно выделить истинный промотор. Фактически, поиск промоторных последовательностей компьютерными методами в настоящее время возможен только методом MAHDS. Однако MAHDS – это только вычислительный метод, а полное подтверждение того, что выявляемые последовательности являются функциональными промоторами, возможно либо экспериментальными методами, либо путем изучения подобия найденных последовательностей с последовательностями различных транскриптом. В последнем случае можно попытаться найти TSS и провести поиск подобия последовательностей ДНК выше TSS с потенциальными промоторными последовательностями, которые обнаруживает разработанный математический метод.

Одновременно была изучена корреляция найденных потенциальных промоторных последовательностей с различными дисперсными повторами и транспозонами. Удалось показать, что  $\sim 87$  тыс. промоторных последовательностей коррелирует с различными дисперсными повторами и транспозонами, которые ранее были найдены в работе [38]. 20.654 промоторных последовательностей приходится на ранее аннотированные промоторы риса. При этом число ложных позитивов составляет не более 160 последовательностей. Осталь-

ные 37.390 потенциальных промоторных последовательностей могут представлять промоторы неизвестных генов (в частности, генов микроРНК [39]), промоторы, связанные с различными мобильными элементами генома, а также эволюционные следы расселения генов и их промоторов. Эти промоторные последовательности как раз наиболее интересны с точки зрения биобезопасности. Причина в том, что небольшое количество точечных мутаций в промоторной последовательности может перевести ген, находящийся за промоторной последовательностью, из неактивного состояния в активное, то есть может начаться активная транскрипция ранее молчащего гена. Фактически это означает, что некоторые биологические свойства сельскохозяйственного растения могут измениться, и из полностью безопасного оно может превратиться в потенциально опасное.

MAHDS-метод универсален и может быть использован для построения множественного выравнивания любых нуклеотидных последовательностей. В качестве таких последовательностей могут выступать перечисленные выше разнообразные вирусные последовательности, всевозможные гены токсинов, как животных и растений, так и человека. Необходимо только создать соответствующие множества  $M$  последовательностей и для них методом MAHDS построить множественные выравнивания. После этого геном CP “сканируется” каждым множеством  $M$  (таких множеств могут быть десятки тысяч) и выдается аргументированное заключение о присутствии потенциально опасных последовательностей, перечисленных в пунктах 1–3. После этого становится доступной быстрая идентификация возможных вставок фрагментов ДНК в геном CP даже для последовательностей, которые накопили существенно количество замен оснований и вставок или делеций.

**CRISPR/Cas9-редактированные растения.** Необходимо заметить, что полногеномное секвенирование и последующий биоинформационный анализ полученных данных, включая сборку генома и его аннотацию, является сегодня дорогостоящим и трудоемким подходом к сравнительной оценке геномов CP. Кроме того, недавно разработанные методы редактирования генома, такие как CRISPR/Cas9, в отличие от других известных методов (агробактериальная или баллистическая трансформация), позволяют вносить нужные модификации, не оставляя следов. Поэтому в настоящее время становится актуальной разработка новых подходов к определению возможных изменений генома искусственного происхождения. Основой для такого подхода может стать создание на базе имеющегося сегодня огромного количества информации Банка данных последовательностей, связанных с экономически ценными признаками видов и сортов агрокультур

[40, 41]. Далее, современными методами поиска [42, 43, <https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>] в отобранных последовательностях можно определить и собрать в отдельную базу данных сайты, которые с большой вероятностью могут быть использованы для дизайна так называемой гидовой РНК (определяет место CRISPR/Cas9-редактирования). Таким образом, поиск вставок, делеций, стоп-кодонов (исключающих экспрессию гена или продукцию корректного белка), несинонимичных однонуклеотидных замен может быть сужен до сравнительного анализа набора коротких последовательностей в ряде генов, ассоциированных с определенными характеристиками растений.

\* \* \*

Полногеномное секвенирование и бионформационные методы открывают новые уникальные возможности для оценки биобезопасности сельскохозяйственных культур. Становится возможным провести детальный анализ возможных вставок фрагментов ДНК в геноме СР и выяснить их биологическое значение. Также возможно провести быстрый скрининг СР на присутствие потенциально опасных генов, вирусных последовательностей и неспецифических промоторных последовательностей. Также можно будет почти полностью идентифицировать сельскохозяйственные растения, содержащие нежелательные или биологически опасные гены, онкогены и гены, продуктом которых являются токсины. Применение этих подходов на практике позволит значительно увеличить биобезопасность сельскохозяйственных растений.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 18-29-14067\18).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Korobko I.V., Georgiev P.G., Skryabin K.G., Kirpichnikov M.P.* // Acta Naturae. 2016. V. 8. № 4. P. 6–13.
2. *Yakovleva I.V., Zhuravleva E.V., Kamionskaya A.M.* // FEBS Open Bio. 2019. V. 9. № S1. P. 280–281. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12675>
3. Guidance on Risk Assessment of Living Modified Organisms // Convention on biological diversity. 64 p. UNEP/CBD/BS/COP-MOP/6/13/Add.1 30 July 2012.
4. Методические указания МУК 4.2.1903-04. “Продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с применением биологического микрочипа”, утвержденные Главным государственным санитарным врачом РФ 6 марта 2004 г. М.: Минздрав России, 2004. 10 с. с <http://base.garant.ru/4181368/#friends>; (Guidelines MUK 4.2.1903-04. “Food products. Method for the identification of genetically modified sources (GMI) of plant origin using a biological microchip”, approved by the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation, March 6, 2004. M.: Ministry of Health of Russia, 2004. 10 p.)
5. Методические указания МУК 4.2.1902-04. “Определение генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения методом полимеразной цепной реакции”, утвержденные Главным государственным санитарным врачом РФ 6 марта 2004 г. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 46 с. <http://base.garant.ru/4180376/>; (Guidelines MUK 4.2.1902-04. “Determination of genetically modified sources (GMI) of plant origin by the method of polymerase chain reaction”, approved by the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation, March 6, 2004. M.: Federal Center for Sanitary and Epidemiological Supervision of the Ministry of Health of Russia, 2004. 46 p.)
6. *Agapito-Tenfen S.Z., Okoli A.S., Bernstein M.J., Wikmark O.G., Myhr A.I.* // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. Article 1874. P. 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01874>
7. *Maher M.F., Nasti R.A., Vollbrecht M., Starker C.G., Matthew D.C., Voytas D.F.* // Nat. Biotechnol. 2020. V. 38. P. 84–89. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0337-2>
8. *Jones H.D.* // Nat. Plants. 2015. V. 1. Article 14011. <https://doi.org/10.1038/nplants.2014.11>
9. *Davidson J., Ammann K.* // GM Crops Food. 2017. V. 8. № 1. P. 13–34. <https://doi.org/10.1080/21645698.2017.1289305>
10. *Metje-Sprink J., Mens J., Dodrzejewski D., Sprink T.* // Front. Plant Sci. 2019. V. 9. Article 1957. P. 133–141. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01957>
11. *Globus R., Qimrom U.* // Cell Biochem. J. 2018. V. 119. № 2. P. 1291–1298. <https://doi.org/10.1002/jcb.26303>
12. *Yakovleva I.V., Vinogradova S.V., Kamionskaya A.M.* // Russian Journal of Genetics: Applied Research. 2016. V. 6. № 6. P. 646–656. <https://doi.org/10.1134/S2079059716060095>
13. *Whelan A.I., Lema M.A.* // GM Crops Food. 2015. V. 6. № 4. P. 253–265. <https://doi.org/10.1080/21645698.2015.1114698>
14. *Eddy S.R.* // Nat. Biotechnol. 2004. V. 22. № 7. P. 909–910. <https://doi.org/10.1038/nbt0704-909>
15. *Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J.* // J. Mol. Biol. 1990. V. 215. № 3. P. 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
16. *Needleman S.B., Wunsch C.D.* // J. Mol. Biol. 1970. V. 48. № 3. P. 443–453.
17. *Pearson W.R., Lipman D.J.* // PNAS. 1988. V. 85. № 8. P. 2444–2448. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.8.2444>
18. *Mount D.W.* // CSH protocols. 2007. V. 2007. <https://doi.org/10.1101/pdb.top16>
19. *States D.J., Gish W., Altschul S.F.* // Methods. 1991. V. 3. № 1. P. 66–70. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(05\)80165-3](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(05)80165-3)
20. *Herrero J., Muffato M., Beal K., Fitzgerald S., Gordon L., Pignatelli M., Vilella A.J., Searle S.M.J., Amodè R., Brent S., Spooner W., Kulesha E., Yates A., Flicek P.* // Database. 2016. V. 2016. Article bav096. <https://doi.org/10.1093/database/bav096>
21. *Kent W.J., Sugnet C.W., Faurey T.S., Roskin K.M., Pringle T.H., Zahler A.M., Haussler D.* // Genome Res. 2002. V. 12. № 6. P. 996–1006. <https://doi.org/10.1101/gr.229102>

22. *Derrien T., André C., Galibert F., Hitte C.* // *Bioinformatics*. 2006. V. 23. № 4. P. 498–499.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl618>
23. *Sinha A.U., Meller J.* // *BMC Bioinformatics*. 2007. V. 8. Article 82.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-82>
24. *Hingamp P., van den Broek A.E., Stoesser G., Baker W.* // *Mol. Biotechnol.* 1999. V. 12. № 3. P. 255–267.  
<https://doi.org/10.1385/MB:12:3:255>
25. *Benson D.A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W.* // *Nucleic Acids Res.* 2013 V. 41. № D1. P. D36–D42.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
26. *Nikitin N.A., Trifonova E.A., Karpova O.V., Atabekov J.G.* // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. V. 71. № 3. P. 128–134.
27. *Yoon B.J.* // *Current Genomics*. 2009. V 10. № 6. P. 402–415.  
<https://doi.org/10.2174/138920209789177575>
28. *Bateman A., Birney E., Durbin R., Eddy S.R., Finn R.D., Sonnhammer E.L.L.* // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. № 1. P. 260–262.  
<https://doi.org/10.1093/nar/27.1.260>
29. *Finn R.D., Mistry J., Tate J., Coggill P., Heger A., Pollington J.E., Gavin O.L., Gunasekaran P., Ceric G., Forslund K., Holm L., Sonnhammer E.L.L., Eddy S.R., Bateman A.* // *Nucleic Acids Res.* 2010. V. 38. № S1. P. 211–222.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkp985>
30. *Korotkov E.V., Korotkova M.A.* // *J. Physics: Conference Series*. 2019. V. 1205. Article 012025.  
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/1205/1/012025>
31. *Korotkov E.V., Suvorova Y.M., Kostenko D., Korotkova M.A.* // *Genes*. 2021. Under consideration.
32. *Korotkov E.V., Kamionskaya A.M., Korotkova M.A.* // *Biotekhnologiya*. 2020. V. 36. № 4. P. 7–14.  
<https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-7-14>
33. *Pugacheva V., Korotkov A., Korotkov E.* // *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*. 2016. V. 26. № 5. P. 381–400.  
<https://doi.org/10.1515/sagmb-2015-0079>
34. *Suvorova Y.M., Korotkova M.A., Skryabin K.G., Korotkov E.V.* // *DNA Res.* 2019. V. 26. № 2. P. 157–170.  
<https://doi.org/10.1093/dnares/dsy046>
35. *Solovyev V.V., Shahmuradov I.A., Salamov A.A.* // *Methods in Molecular Biology*. /Ed. I. Ladunga. N.J.: Humana Pres, 2010. V. 674. P. 57–83.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-60761-854-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-854-6_5)
36. *De Jong A., Pietersma H., Cordes M., Kuipers O.P., Kok J.* // *BMC Genomics*. 2012. V. 13. Article 299.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-299>
37. *Di Salvo M., Pinatel E., Tala A., Fondi M., Peano C., Alifano P.* // *BMC Bioinformatics*. 2018. V. 19. Article 36.  
<https://doi.org/10.1186/s12859-018-2049-x>
38. *Ou S., Su W., Liao Y., Chougule K., Agda J.R.A., Hellinga A.J., Lugo C.S.B., Elliott T.A., Ware D., Peterson T., Jiang N., Hirsch C.N., Hufford M.B.* // *Genome Biol.* 2019. V. 20. № 4. Article 275.  
<https://doi.org/10.1186/s13059-019-1905-y>
39. *Zhou X., Ruan J., Wang G., Zhang W.* // *PLoS Comput. Biol.* 2007. V. 3. № 3. e37. P. 0412–0423.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030037>
40. *Mohan V., Paran I.* *The Capsicum Genome. Compendium of Plant Genomes* // Ed. Ramchiary N., Kole C. N.Y.: Springer Cham., 2019. P. 105–109.
41. *Vemireddy L.R., Noor S., Satyavathi V.V., Srividhya A., Kaliappan A., Parimala S.R.N., Bharathi P.M., Deborah D.A., Rao K.V.S., Shobharani N., Siddiq E.A., Nagaraju J.* // *BMC Plant Biol.* 2015. V. 15. Article 207.  
<https://doi.org/10.1186/s12870-015-0575-5>
42. *Stemmer M., Thumberger T., del Sol Keyer M., Wittbrodt J., Mateo J.L.* // *PLoS ONE*. 2015. V. 10. № 4. e0124633.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124633>
43. *Labuhn M., Adams F.F., Ng M., Knoess S., Schambach A., Charpentier E.M., Schwarzer A., Mateo J.L., Klusmann J.H., Heckl D.* // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 46. № 3. P. 1375–1385.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx1268>

## Use of Mathematical Methods for the Biosafety Assessment of Agricultural Crops

E. V. Korotkov<sup>a,\*</sup>, I. V. Yakovleva<sup>a</sup>, and A. M. Kamionskaya<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

*\*e-mail: bioinf@yandex.ru*

In Russia and in the world, the questions are acute regarding the potential threats to national and biological safety created by genetic technologies and the need to improve or introduce new, justified and adequate measures for their control, regulation and prevention. The article shows that a significant volume of the global market is occupied by 5 major transgenic crops, and producers are ready to switch to crops with an edited genome, approved in the USA, Argentina and other countries. We propose a qualitatively new approach for risks assessment of edited plants—“Safe Design”, and we have also developed an extremely important fundamentally new approach for developing methods combined NGS and Bioinformatics for assessing the crop import biosafety. The proposed mathematical approach makes a reality the detailed analysis of possible insertions of DNA fragments into the genome of edited crops and a clarification of their biological significance. The developed method can be used for rapid screening of plants for the presence of potentially dangerous genes, viral sequences, and nonspecific promoter sequences.

**Keywords:** transgenic crops, gene-edited plants, safe by design, biosafety, alignment, dynamic programming, full genomes, insertions, mutations

ЮБИЛЕИ

**ПОЗДРАВЛЯЕМ ПРОФЕССОРА НИКОЛАЯ СЕРГЕЕВИЧА ЕГОРОВА  
СО 100-ЛЕТНИМ ЮБИЛЕЕМ**



Исполняется 100 лет выдающемуся отечественному микробиологу и биотехнологу, доктору биологических наук, профессору Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова Николаю Сергеевичу Егорову.

Николай Сергеевич родился 5 января 1921 г. в деревне Попадкино Владимирской (ныне – Ивановской) области. В 1939 г. он был призван на военную службу, служил сапером в г. Очаков, в роте, приписанной к Черноморскому флоту. В 1941–1942 гг. участвовал в Великой Отечественной войне в обороне Очакова, Одессы, Севастополя, Новороссийска. В 1942 г. был ранен и демобилизован.

В 1943 г. Николай Сергеевич поступил в Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, навсегда связав свою жизнь с университетом, пройдя путь от младшего науч-

ного сотрудника до заведующего кафедрой и заместителя декана. Став студентом биологического факультета, он выбрал кафедру микробиологии, на которой стал специализироваться сначала в области исследования антибиотиков, а позднее – и ферментов микроорганизмов. После окончания учебы в 1949 г. поступил в аспирантуру биологического факультета МГУ. Научным руководителем дипломной, а затем и кандидатской диссертации был академик В.Н. Шапошников. Тема кандидатской диссертации (1952 г.) – “Условия образования стрептомицина”, докторской (1965 г.) – “Образование микроорганизмами ряда антибиотиков и фибринолитических веществ”.

В 1951–1963 гг. Н.С. Егоров – сотрудник биолого-почвенного факультета МГУ, сначала в должности младшего научного сотрудника, затем – ассистента, старшего научного сотрудника, доцента кафедры микробиологии, а с 1959–1963 гг. – заместитель декана факультета по научной работе. В конце 1959 г. его направляют на стажировку в университет г. Лидс (Великобритания) в биохимическую лабораторию профессора Франка Хапполда (Frank Charles Happold). В последующие годы с 1963 по 1988 гг. Николай Сергеевич находился на государственной службе: был приглашен на работу в Управление делами ЦК КПСС, где проработал до 1967 г., сначала инструктором, а затем заведующим сектором ВУЗов Отдела науки и учебных заведений.

В 1967–1988 г. Н.С. Егоров – заместитель министра высшего и среднего специального образования СССР. На протяжении всей работы в министерстве курировал Главное управление ВУЗами, непосредственно подчиненными министерству, выполнял поручения общесоюзного уровня в качестве члена ряда государственных и межгосударственных комитетов и комиссий.

С августа 1967 г. по октябрь 1989 г. был заведующим кафедрой микробиологии МГУ (на общественных началах), а с мая 1995 по март 1996 г. исполнял обязанности заведующего кафедрой микробиологии МГУ.

В мае 1988 г., после упразднения Министерства высшего и среднего специального образования СССР Н.С. Егоров возвращается на постоянную работу в МГУ. В 1988–1993 он профессор на кафедре микробиологии биологического факультета, с июня 1993 г. – профессор Международно-

го биотехнологического центра МГУ, член Ученого Совета МГУ (1992–2002 гг., 2012–2015 гг.).

Н.С. Егоровым в Московском университете создано две научные школы: по исследованиям биосинтеза антибиотиков микроорганизмами и по изучению протеолитических ферментов микроорганизмов медицинского назначения. Николаем Сергеевичем с сотрудниками была показана роль соединений, входящих в состав питательных сред, а также некоторых других веществ в стимуляции образования антибиотиков микроорганизмами-продуцентами: гуанидина и инозита при образовании стрептомицина, диаминобензалдегида при образовании хлортетрациклина. Был установлен новый ферментативный путь превращения изоновобиоцина в новобиоцин, выделен фермент, инактивирующий грамицидин С. Под руководством Н.С. Егорова проведены масштабные исследования по изучению условий биосинтеза ценнейших антибиотиков, таких как стрептомицин, хлортетрациклин, новобиоцин, ристомидин, низин, бацитрацин, грамицидин С. Полученные результаты дали возможность разработать два лабораторных регламента на получение антибиотиков низина и грамицидина С для страны.

Был также проведен большой цикл исследований, связанный с изучением роли антибиотиков в жизнедеятельности образующих их продуцентов, который позволил разработать и экспериментально подтвердить теории о том, что антибиотики выступают в роли регуляторов определенных реакций биохимических путей в клетках микроорганизмов.

Николаем Сергеевичем был разработан оригинальный метод определения антибиотических свойств микроорганизмов. Метод основан на том, что в одной и той же чашке создавались благоприятные условия как для развития продуцента, так и для развития тест-микроорганизмов, т.е. оба типа тестируемых культур росли на своих средах (метод Н.С. Егорова), а также была предложена оригинальная методика выделения микроорганизмов-антагонистов из почвы высевам на выросшие газоны с тест-культурами.

Н.С. Егоровым в 1962 г. впервые в стране начаты исследования по изучению биосинтеза и свойств протеолитических ферментов медицинского назначения, синтезируемых микроорганизмами, проявляющих фибринолитическую и тромболитическую активность, а позднее – коагулазную и антикоагулянтную. В результате масштабных исследований совместно с коллегами была показана перспективность микроскопических грибов как продуцентов протеолитических ферментов, низкая чувствительность протеиназ микроорганизмов к ингибиторам (по сравнению с протеиназами животных), возможность усиления

действия микробных протеиназ гепарином при их внутривенном введении, участие протеиназ микроорганизмов в дифференциации клеток продуцентов, а также получен первый отечественный препарат-сырец внеклеточных протеиназ *Aspergillus oryzae* с высокой фибринолитической активностью, успешно прошедший доклинические испытания (“Аспергиллин М”).

В 1964 г. Н.С. Егоровым была введена в микробиологическую практику общепринятая классификация питательных сред по характеристике состава: натуральные среды неопределенного состава и синтетические среды.

В биотехнологии нашла широкое применение разработанная им концепция совместного культивирования микроорганизмов-продуцентов биологически активных веществ с другими микроорганизмами, не являющимися продуцентами, а также сформулированы принципы создания и управления искусственными ассоциациями микроорганизмов (смешанными культурами). Под его руководством экспериментально созданы совместные культуры с повышенным выходом (в 2.5 раза и более) антибиотиков и ферментов, а также впервые в мировой практике иммобилизованные смешанные культуры.

Под руководством Н.С. Егорова на кафедре микробиологии биофака МГУ была сформирована группа по изучению светящихся бактерий, были выделены чистые культуры морских светящихся бактерий, изучены и подобраны условия их культивирования, выделена и охарактеризована бактериальная люцифераза отдельных видов.

Н.С. Егоровым подготовлено 5 докторов наук и 60 кандидатов наук (в том числе 9 иностранных граждан). Он – автор и соавтор более 700 научных статей, имеет 98 авторских свидетельств и патентов, им опубликовано 13 книг, среди которых известный учебник для университетов “Основы учения об антибиотиках”, выдержавший 6 изданий (1 – в 1964 г. и 6 – в 2004 г.).

Долгие годы Николай Сергеевич был членом редколлегии журнала “Антибиотики и химиотерапия” (1979–2008 гг.).

За военные заслуги и заслуги в развитии высшего образования и научно-преподавательской деятельности Н.С. Егоров награжден орденами Отечественной войны I степени (1985 г.), Отечественной войны II степени (1966 г.), Трудового Красного знамени (1971 г., 1976 г.), “Знак Почета” (1967 г.), Дружбы народов (1980 г.), медалями “За оборону Одессы” (1942 г.), “За оборону Кавказа” (1944 г.), “За Победу над Германией в Великой Отечественной войне 1941-1945 гг.” (1946 г.), “За трудовую доблесть” (1961 г.), “За доблестный труд, в ознаменование 100-летия со дня рождения Владимира Ильича Ленина” (1970 г.), “Ветеран труда” (1983 г.), “Медаль Жукова” (1995 г.), юби-

лейными медалями “Двадцать лет Победы в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.” (1965 г.), “50 лет Вооруженных Сил СССР” (1968 г.), “Тридцать лет Победы в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.” (1975 г.), “60 лет Вооруженных Сил СССР” (1978 г.), “Сорок лет Победы в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.” (1985 г.), “70 лет Вооруженных Сил СССР” (1988 г.), “50 лет Победы в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.” (1995 г.), “В память 850-летия Москвы” (1997 г.), “60 лет Победы в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.” (2005 г.), “65 лет Победы в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.” (2010 г.), “70 лет Победы в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.” (2015 г.), “75 лет Победы в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.” (2020 г.), медалью “Дружба” Монгольской Народной Республики (1982 г.), Благодарностью Президента РФ (2001 г.) и Почетной грамотой Президента РФ (2012 г.).

Профессор Н.С. Егоров — лауреат Государственной премии СССР (1989 г.), премии Совета Министров СССР (1987 г.), премии им. М.В. Ломо-

носова I степени МГУ за научные работы (1977 г.), удостоен золотой медали ВДНХ (1979 г.), премии им. М.В. Ломоносова МГУ за преподавательскую деятельность (2001 г.), Заслуженный деятель науки РФ (1995 г.). Он — Заслуженный профессор Московского университета (1999 г.), Почетный работник высшего образования РФ (2015 г.), Почетный ветеран Москвы (2016 г.)

В 2015 г. Николаю Сергеевичу Егорову была присуждена высшая общественная награда МГУ — “Звезда Московского университета”.

От всей души поздравляем Николая Сергеевича со знаменательным юбилеем, желаем крепкого здоровья!

*Кафедра микробиологии  
биологического факультета  
Московского государственного университета  
им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва  
ФИЦ Биотехнологии РАН  
Редколлегия журнала*