

УДК 601.4, 579.64

Ч. Нямсурэн, Л. Р. Валеева, Л. Р. Нигматуллина, И. Б. Частухина,
Е. О. Михайлова, М. Р. Шарипова, Е. В. Шакиров

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФИТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В КЛЕТОЧНЫХ КОМПАРТМЕНТАХ КОРНЕЙ РАСТЕНИЯ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Ключевые слова: ферментативная активность, фитаза, фосфор, *Arabidopsis thaliana*.

Нами оптимизирован метод определения фитазной активности во внеклеточных компартментах корней генно-модифицированных растений *Arabidopsis thaliana*, экспрессирующих микробные фитазы. С помощью оптимизированного метода определили фитазную активность во внутриклеточных растворимых белковых фракциях и в белковых фракциях клеточной стенки корней растений. Показано, что на среде с фитатом у генно-модифицированных растений активность фитазы в клеточных стенах в среднем в 9,5 и 11,7 раз больше по сравнению с диким типом растений. Данный метод может быть использован при анализе как рекомбинантной фитазной активности, так и фитазной активности растительного происхождения, и в зависимости от локализации фермента.

Keywords: enzyme activity, assay, phytase, phosphorus, *Arabidopsis thaliana*.

*Phytases are specific phosphatase enzymes hydrolyzing phytate. Phytate is the main form of organic phosphorus in soil. Determining phytase activity in plant samples is very important for the analysis of plants in natural ecosystems, in plant biotechnology and for selection of new crop varieties. We have optimized the method to determine phytase activity in plant cell compartments in roots of transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing phytases of microbial origin. Using this method, we measured phytase activity both in intracellular soluble protein fractions and cell-wall extracts of roots. We show that phytase activity in cell-wall fractions of transgenic roots expressing *B. ginsengihumi* and *P. agglomerans* phytases is higher than in wild type plants by 9.5 and 11.7-fold, respectively.*

Введение

Фосфор является одним из жизненно важных макроэлементов в питании всех живых организмов. Животные получают необходимый фосфор из пищи, тогда как растения усваивают его непосредственно из окружающей среды – почвы и почвенного раствора. Однако запасы природного фосфора с каждым годом сокращаются и могут быть полностью исчерпаны уже к концу 21 века [1]. Проблема дефицита фосфора является не только проблемой для природных экосистем, но и для сельского хозяйства. Недостаток фосфора – основной фактор, лимитирующий рост и развитие культурных растений. Внесение фосфорных удобрений для решения проблемы фосфорного недостатка не является эффективным решением в долгосрочной перспективе, поскольку растениями усваивается лишь около 20% из них, тогда как остальные 80% переходят в труднодоступные для растений соединения [2]. Кроме того, фосфорные удобрения вымываются из почв в водоемы, что приводит к серьезным экологическим нарушениям, таким как эвтрофикация [3].

Значительная часть имеющегося в почвах фосфора представлена органическими соединениями, составляющими 20-80% от общего фосфора в поверхностных слоях почв [4]. Основной пул всего органического фосфора почв – до 50-60% - составляет труднорастворимое соединение фитат (миоинозитол гексакисфосфат) [4]. Фитат связывает такие ионы металлов, как кальций, железо, магний и цинк, делая их недоступными для использования растениями и животными. Многие почвенные микроорганизмы способны расщеплять фитат и высвобождать фосфаты благодаря экспрессии специфических ферментов – фитаз. Фитазы – особая группа фосфатаз, обладающих способностью гидролизовать

фитат с образованием мио-инозитола и остатков фосфорной кислоты. Хотя растения также обладают собственными фитазами, они активизируются или экспрессируются в основном лишь при прорастании семян [5]. В остальное время активность фитаз либо не обнаруживается, либо находится на очень низком уровне. Кроме того, для растений нехарактерны внеклеточные фитазы, поэтому они не способны к эффективной утилизации почвенного фитата [6,7].

Таким образом, присутствие большого количества неутилизируемого органического фосфора в почве в форме фитата, а также наличие активных фитат-гидролизующих ферментов у микроорганизмов, представляет большой практический интерес для решения проблемы фосфорного дефицита растений. Получение растений, экспрессирующих рекомбинантные активные внеклеточные фитазы бактериального или грибного происхождения, является перспективным способом использования фитата почв в качестве источника фосфора в питании растений.

Для оценки эффективности расщепления фитата рекомбинантными фитазами растений необходимы точные методы определения фитазной активности в тканях растений. Существуют различные колориметрические методы для определения фитазной активности. Однако, при определении фитазной активности в тканях растений возникают трудности, связанные как с локализацией рекомбинантного фермента и его физико-химическими свойствами, так и с загрязняющими соединениями растительного происхождения, присутствующими в исследуемых образцах. Поскольку рекомбинантная фитаза может экспрессироваться как внутри-, так и внеклеточно, а также переходить в различные компартменты клетки, использование одного универсального метода определения фитазной активности не всегда возможно. В работах по получению трансгенных рас-

тений используют методы определения фитазной активности как в цитозоле, так и за пределами клеток [8]. Также существуют методы по определению фитазной активности в различных компартментах клеток: в апопластах клетки люцерны (*Medicago sativa*) и в клеточных стенках корней клевера (*Trifolium subterraneum*) [9, 3] Однако данные методы не всегда применимы для других растений или тканей.

Целью данной работы является оптимизация метода определений фитазной активности в клеточных компартментах корней генно-модифицированных растений *Arabidopsis thaliana* с интегрированным геном бактериальной фитазы.

Экспериментальная часть

Растительные материалы. В работе использовали семена трех гомозиготных по трансгенной вставке T-ДНК линий растений *A. thaliana* с генами бактериальных фитаз под управлением индуцируемого растительного промотора *Pht1;2*: линия K1151 с интегрированным геном щелочной фитазы *B. ginsengihumi*, линия G214 с интегрированным геном кислой фитазы *P. agglomerans*, линия A125 с промотором *Pht1;2* без гена фитазы (отрицательный контроль). В качестве еще одного отрицательного контроля при определении фитазной активности также использовали растения дикого типа *A. thaliana*, экотип Columbia.

Растения выращивали на гидропонной установке [10] в климатической камере (SANYO, Япония). Условия роста растений: температура 22°C, влажность камеры – 60%, фотопериод – 16 ч день/ 8 ч ночь. Определение фитазной активности проводили через 25-28 дней роста, для чего корни растений отбирали и немедленно замораживали в жидким азоте.

Гидропонная система: Для сборки гидропонной системы использовали пластиковый светонепроницаемый контейнер высотой 20 см, диаметром 15 см, объемом 600 мл. Семена растений нестерильно укладывали на тонкий слой 0,7% агара в отверстиях крышки контейнера [10]. В качестве жидкой питательной среды в гидропонной системе использовали стандартный минеральный раствор в концентрациях: KNO_3 – 5 mM; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 1.01 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.498 mM; NH_4NO_3 – 0.0293 mM; NaOH – 0.0313 mM; EDTA – 0.0223 mM; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.0224 mM; H_3BO_3 – 0.00968 mM; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.0203 mM; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.00314 mM; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.00210 mM; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.000859 mM; NaMoO_4 – 0.00136 mM, pH 5.5-5.7 [10]. В качестве источника фосфора использовали фитат натрия ($\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6 \cdot x\text{Na} \cdot y\text{H}_2\text{O}$, Sigma) – 133 мкМ, неорганический фосфат (Na_2HPO_4) – 0.8 mM.

Выделение белкового экстракта из корней растений. Для выделения белкового экстракта использовали метод, описанный в статье George *et al.*, 2004, со следующими модификациями. Замороженные корни 2-х индивидуальных растений одной линии растирали пестиком в фарфоровой ступке в жидким азоте и переносили в предварительно охлажденный эппendorф, содержащий 1 мл гомогенизирующего MES/Ca буфера pH 5,5 (15 mM MES, 1mM EDTA, 0,5 CaCl₂, 100 mM PMSF, 5mM цистеин). Экстракты

центрифugировали 10 мин при 15 000 g при 4°C и отбирали супернатант (растворимая внутриклеточная белковая фракция). Для получения экстракта клеточной стенки осадок ресуспендировали в элюирующем буфере (15 mM MES (pH 8.5), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5 mM CaCl₂, 100 mM PMSF, 5 mM цистеин), центрифугировали 10 мин при 15 000 g при 4°C и отбирали супернатант [9].

Концентрацию белка в экстрактах измеряли с помощью набора Protein assay Dc (Bio-Rad). Белковый экстракт хранили при -80 °C. Полученные белковые экстракты использовали в качестве образцов для измерения фитазной активности.

Для определения фитазной активности использовали метод Jog *et al.*, 2005 с модификациями [11, 12]. Фитазную активность определяли по количеству высвобожденного неорганического фосфора при расщеплении молекул фитата под действием фитазы. Реакционная смесь состояла из 200 мкл 15 mM MES-буфера (pH 5.5), содержащего 1.25 mM фитат натрия, 0.5 mM CaCl₂ и 50 мкл раствора белкового экстракта. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 1 часа, ферментативную реакцию останавливали добавлением 50 мкл 50% ТХУ. Центрифугировали 5 мин при 13 000 об/мин. Далее проводили колориметрическую реакцию на высвобожденный фосфат. Для этого в лунку 96-луночного планшета отбирали 90 мкл супернатанта из проб ферментативной реакции и добавляли 210 мкл раствора молибдата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ с аскорбиновой кислотой (в соотношении 1 часть 10% аскорбиновой кислоты и 6 частей 0.42 % молибдата аммония, растворенного в 0.5 M серной кислоте). Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Оптическую плотность раствора мерили при 820 нм. Концентрацию неорганического фосфора измеряли с помощью калибровочной кривой по KH_2PO_4 . За единицу активности принимали количество фермента, освободившего 1 mM неорганического фосфора из фитата натрия за 1 минуту в 1 мг белка [13].

Результаты и обсуждение

Для анализа эффективности утилизации фитата из питательной среды растениями, экспрессирующими внеклеточные рекомбинантные фитазы, нами были выращены генно-модифицированные растения *A. thaliana* линий K1151 и G214 с генами бактериальных фитаз *B. ginsengihumi* и *P. agglomerans*, соответственно. В качестве отрицательного контроля фитазной активности использовали растения дикого типа и линию трансгенных растений A125, несущую трансформирующий вектор с промотором, но без гена фитазы. Важным этапом для определения фитазной активности является получение белковых экстрактов с минимально возможным разрушением белка. Для выделения белковых экстрактов нами был модифицирован метод, описанный George *et al.*, 2004. Выделение белковых фракций различных компартментов основано на использовании буферов разного состава, а также различных режимах центрифугирования образцов тканей. Для получения экстракта из клеточной стенки в MES/Ca буфер до-

бавлен тритон X-100 и NaCl, которые необходимы для элюции белка из клеточной стенки. Для получения экстрактов клеточной стенки растворы разрушенных тканей осаждают при высоких оборотах. Так, в статье Робинсона [14] предлагается использовать ультрацентрифугирование. Однако мы проводили обычное центрифугирование осадка клеток в элюирующем буфере при 15 000g, что оказалось достаточным для получения белковых экстрактов клеточной стенки. Концентрация белка в выделенных внутриклеточных белковых экстрактах корней растений варьировала от 0.32±0.22 до 0.69±0.07 мг/мл (табл. 1). Концентрация белка во фракциях клеточной стенки растений составляла от 0.14±0.20 до 0.52±0.01 мг/мл. (табл. 1).

Таблица 1 – Концентрация белка в белковых экстрактах корней

| | Внутриклеточный белковый экстракт корней, мг/мл белка | | Белковый экстракт клеточной стенки корней, мг/мл белка | |
|-----------|---|-----------|--|------------|
| | Na ₂ HPO ₄ | Фитат | Na ₂ HPO ₄ | Фитат |
| Дикий тип | 0.57±0.01 | 0.45±0.12 | 0.30±0.04 | 0.22±0.04 |
| A125 | 0.33±0.14 | 0.54±0.03 | 0.14±0.20 | 0.41±0.001 |
| K1151 | 0.32±0.22 | 0.54±0.10 | 0.16±0.20 | 0.52±0.01 |
| G214 | 0.43±0.05 | 0.69±0.07 | 0.35±0.03 | 0.44±0.09 |

В зависимости от pH-оптимума фитазы, для определения фитазной активности используют различные буфера, такие как натрий-ацетатный буфер, трисовый буфер и MES буфер [15, 16, 17, 8]. Так, натрий-ацетатный буфер использовался при определении активности кислых фитаз *P. agglomerans* и *P. vagans* [18, 19]. Тем не менее, данный буфер хуже поддерживает pH в диапазоне выше 6 (pK=4.75, pH от 3 до 6), поэтому нами был использован 15 mM MES/Ca буфер с добавлением PMSF (Фенилметилсульфонилфторид) в качестве ингибитора протеаз. Данный буфер хорошо поддерживает pH в пределах 5.5 – 6.7 (pK=6.15) и может быть использован как для щелочных, так и для кислых фитаз. Кроме того, широкий диапазон поддерживаемых значений pH делает MES/Ca буфер более предпочтительным также и для выделения белковых экстрактов из тканей растений. Поскольку pH-оптимумы исследуемых нами рекомбинантных фитаз *B. ginsengihumi* и *P. agglomerans* составляют 5.5 и 4.5, соответственно, а диапазоны их pH-стабильностей совпадают, определение активности обеих фитаз проводили в реакционной смеси при pH 5.5.

Активность фитазы в растворимых внутриклеточных белковых экстрактах у дикого типа и отри-

цательного контроля A125 достаточно низкая и варьирует в диапазоне 1-2 Ед/мг как на неорганическом фосфоре, так и на фитате (рис. 1A). У трансгенных растений K1151 и G2-1-4 активность фитазы значительно больше (P<0.05), составляя в среднем 4-6 Ед/мг (рис. 1A).

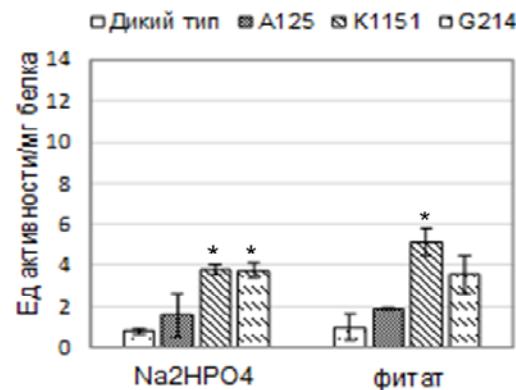


Рис. 1 – Фитазная активность в белковых экстрактах корней растений *A. thaliana*, выращенных на средах с различными источниками фосфора. * – Внутриклеточный растворимый белковый экстракт

Как и в случае внутриклеточных белковых экстрактов, фитазная активность в белковых экстрактах клеточной стенки достаточно невелика в отрицательных контролях (у дикого типа и растений линии A125) и достигает 1.33 и 1.86 Ед/мг белка как при росте на фитате, так и на гидрофосфате натрия. (рис. 2).

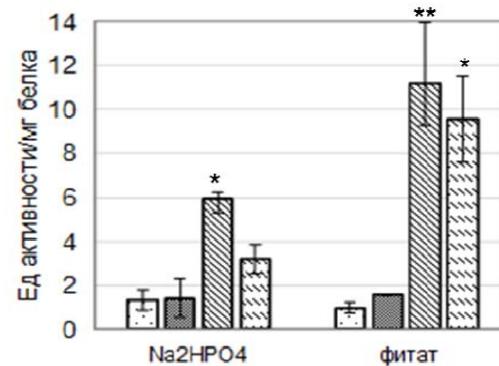


Рис. 2 – Фитазная активность в белковых экстрактах корней растений *A. thaliana*, выращенных на средах с различными источниками фосфора. Белковый экстракт клеточной стенки (*- P<0.05; **P<0.005)

Однако белковые экстракты клеточной стенки трансгенных растений обладали гораздо большей фитазной активностью (P<0.05) по сравнению с контрольными растениями. В частности, на среде с минеральным фосфором активность фитазы в белковых экстрактах клеточной стенки у линий K1151 и G214 увеличивалась в 4.5 и 2.4 раза, а на среде с фитатом повышалась в 11.7 и 9.5 раз, соответственно, (рис. 2).

Высокая активность в белковых экстрактах клеточной стенки у трансгенных растений K1151 и G214 может быть связана с тем, что у этих линий гены фитаз *B. ginsengihumi* и *P. agglomerans* находятся под контролем промотора гена *Ph1;2*, вовле-

ченного в фосфатный транспорт и индуцируемого в условиях фосфорного голодания в клетках эпидермиса корня. Также оба гена фитазы на 5'-конце содержат последовательность сигнального пептида экстенсина, что обуславливает внеклеточную локализацию фермента. Часть рекомбинантной фитазы также может быть частично экстрагирована при выделении белковых экстрактов, что объясняет наличие фитазной активности в растворимой фракции клеточного экстракта корней.

Jog *et al.* (2005) использовали похожий метод для определения активности фитазы в белковых экстрактах пыльцы лилии (*Lilium longiflorum*). Авторы использовали 100 мМ Трис буфер (рН 8.0), содержащий NaCl (0.5М), CaCl₂ (1мМ), фитат натрия (1 мМ) и NaF (10 мМ). Поскольку рН-оптимумы бактериальных фитаз, экспрессируемых линиями растений K1151 и G214, находятся в кислом диапазоне, а Трис буфер используется для создания нейтральных и щелочных сред, мы предпочли использовать MES/Ca буфер (рН 5.5) как более стабильный по сравнению с натрий-ацетатным буфером. Добавление 0.5 мМ CaCl₂ в состав реакционной смеси обусловлено тем, что фитаза *B. ginsengihumi* является Са-зависимой и более активна в присутствии этого иона. Время протекания и температуру реакции не изменяли.

Для определения количества освободившегося неорганического фосфора в реакционном растворе также использовали цветную реакцию молибдено-вого синего по методу Jog *et al.*, 2005, поскольку этот метод является более чувствительным по сравнению с другими методами, такими как малахитовый зеленый и молибденовый желтый [18]. Для определения оптической плотности в 96-луночном планшете объем реакции уменьшали, сохраняя соотношение реагентов, до 300 мкл.

Трудность определения фитазной активности в белковых экстрактах растительных тканей во многом связана с тем, что в них присутствует большое количество собственного неорганического фосфора. Методы цветной реакции на молибденовый желтый и молибденовый зеленый не обладают достаточной чувствительностью для того, чтобы выявить разницу между контрольными и опытными пробами [10]. Хотя метод с молибденовым синим также способен дать реакцию со свободными фосфатами, присутствующими в белковых экстрактах растений, его чувствительность все же достаточна для выявления разницы между количеством собственного неорганического фосфора растений и количества фосфора,

освобожденного в результате ферментативной реакции с фитазой [20].

Таким образом, нами разработан улучшенный метод определения фитазной активности в клеточных компартментах корней растений. Данный метод может быть использован при анализе фитазной активности растений, экспрессирующих рекомбинантные фитазы, а также при поиске собственных фитаз растений различной клеточной локализации.

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров, а также частично за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности.

Литература

1. C.P. Vance, C. Uhde-Stone, D.L. Allan, *New Phytol.*, **157**, 427–447 (2003).
2. I. C. R. Holfold, *Aust. J. Soil Res.*, **37**, 227-239 (1997)
3. X.-F. Ma, S. Tudor, T. Butler, Y. Ge, Y. Xi, J. Bouton, M. Harrison, Z.-Y. Wang, *Mol. Breeding*, **30**, 377–391 (2012).
4. R. S. Dalal, *Adv. Agron.*, **29**, 83-117 (1977).
5. H. Brinch-Petersen, L. D. Sorensen P. B. Holm, *Trends Plant Sci.*, **7**, 118-125 (2002).
6. J. E. Hayes A. E. Richardson R. J. Simpson, *Aust. J. Plant Physiol.*, **26**, 801 -809 (1999).
7. A. E. Richardson, P. A. Habobas, J. E. Hayes, *Plant, Cell and Environment*, **23**, 397–405(2000).
8. A. Richardson, *The Plant J.*, **25**, 641-649 (2001).
9. T. S. George A. E. Richardson, P.A. Hadobas, R. J. Simpson, *Plant cell and Environment*, **27**, 1351 – 1361 (2004).
10. P. Tocquin, L. Corbesier, A. Havelange, A. Pieltain, E. Kurtem, G. Bernier, C. Perilleux, *BMC Plant Biol.*, **3**, 2, 1-10, (2003).
11. А.Д. Сулейманова, А.А. Тойменцева, Е.О. Михайлова, М.Р. Шарипова, Вестник Казан. технол. ун-та, **20**, 188-191 (2013).
12. А.И. Ахметова, А.Д. Сулейманова, Н.П. Балабан, А.А. Тойменцева, И.И. Каюмов, Е.О. Михайлова, М.Р. Шарипова, Вестник Казан. технол. ун-та, **22**, 189-194 (2014).
13. S.P. Jog, B.G. Garchow, B.D. Mehta, P.P.N. Murthy, *Archives Biochem Biophys*, **440**, 133–140 (2005).
14. W.D. Robinson, J. Park, H.T. Tran, H.A. Del Vecchio, S. Ying, J.L. Zins, K. Patel, T.D. McKnight, W.C. Plaxton, *J. of Exp. Botany*, **63**, 18, 2-12, (2012).
15. M. Li, M. Osaki, I. M. Rao, T. Tadano, *Plant and soil*, **195**, 161 – 169 (1997).
16. S.-C. Lung , W.-L. Chan , W. Yip , L. Wang , E. C. Yeung , B. L. Lim, *Plant Science*, **169**, 341–349 (2005).
17. S.R. Mudge, W.S. Frank, A.E. Richardson, *Plant Sci*, **165**, 871-878 (2003).
18. R. Greiner, *The Protein Journal*, **23**, 8, 577–585 (2004).
19. Сулейманова, Ю.В. Данилова, Р. Грайнер, М.Р. Шарипова, *Биоэрг. Химия*, **9**, 4, 1–7 (2013).
20. Е.М. Басова, В.М. Иванов, *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия*, **53**, 165-180, (2012).

© Ч. Нямсурэн – аспирант, м.н.с., Институт фундаментальной медицины и биологии, К(П)ФУ, chuka_ch@mail.ru; Л. Р. Валеева – аспирант, м.н.с. того же вуза, lia2107@yandex.ru; Л. Р. Нигматуллина – м.н.с. м.н.с. того же вуза, nigmatullinalili@mail.ru; И. Б. Частухина – с.н.с. м.н.с. того же вуза, innachast@yandex.ru; Е. О. Михайлова – к.б.н., доц. каф. бизнес-статистики и математических методов в экономике КНИТУ, katyushka.glukhova@gmail.com; М. Р. Шарипова – д.б.н., проф., Институт фундаментальной медицины и биологии, Л(П)ФУ, marsharipova@gmail.com; Е. В. Шакиров – к.б.н., профессор Техасского университета в Остине, eugene-shakirov@tamu.edu.

© Ch. Nyamsuren – PhD student, Institute of Fundamental medicine and biology, Kazan (Volga region) federal university, chuka_ch@mail.ru; L. R. Valeeva – PhD student, Institute of Fundamental medicine and biology, Kazan (Volga region) federal university, lia2107@yandex.ru; L. R. Nigmatullina - research associate, Institute of Fundamental medicine and biology, Kazan (Volga river) federal university, nigmatullinalili@mail.ru; I. B. Chastukhina, research associate, Institute of Fundamental medicine and biology, Kazan (Volga region) federal university, innachast@yandex.ru; E. O. Mikhailova, PhD, associate professor of business statistics and mathematical methods in Economics, katyushka.glukhova@gmail.com; M. R. Sharipova, PhD, professor, Institute of Fundamental medicine and biology, Kazan (Volga region) federal university, marsharipova@gmail.com; E. V. Shakirov, PhD, Research associate, The University of Texas at Austin, eugene-shakirov@tamu.edu.