

ДИНАМІКА АКТИВНОСТІ ЛЕКТИНУ ПРИ ПРОРОСТАННІ НАСІННЯ КВАСОЛІ (*Phaseolus vulgaris* L.)

Н. В. КОВАЛЬЧУК

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ;
e-mail: hormon@botany.ua

Вивчали динаміку накопичення і активності фітогемаглютеніну (ФГА) на ранніх етапах проростання насіння квасолі. Виявлено електрофоретичні характеристики, субодиничний склад та вуглеводну специфічність лектину, виділеного з насіння білої спаржевої квасолі сорту “Білозерна”. Встановлено, що досліджуваний лектин містить субодиниці E та L з молекулярними масами 34 і 36 кДа відповідно, як і в очищеному препараті ФГА («Serva», Німеччина), і специфічно зв'язує N-ацетил-D-галактозоамін та галактозу. Під час проростання вміст і активність ФГА в зародкових осях та сім'ядолях стрімко знижується вірогідно внаслідок його виділення із насіння в навколишнє середовище. Очевидно, одним із механізмів захисту насіння від патогенів є виділення ним лектинів, які здатні після зв'язування з компонентами клітинних стінок пригнічувати ріст бактерій.

Ключові слова: лектини, ФГА, проростання насіння, квасоля.

Лектини завдяки своїм унікальним властивостям вибірково та оборотно зв'язувати вуглеводи мають важливе прикладне значення як структурні та функціональні зонди і привертають увагу вчених не одне десятиліття [1–5]. Останні дослідження, в яких виявляються все нові лектиноподібні білки з новими вуглеводзв'язувальними властивостями [6–8], дозволяють розшифрувати їхню амінокислотну послідовність та структурні особливості [9–11]. Однак, незважаючи на велику кількість експериментальних даних, питання фізіологічної ролі лектинів залишається відкритим. Очевидно, така ситуація пов'язана з можливою поліфункціональністю лектинів, які здатні, як припускається, брати участь в організації комплексу білок – полісахарид під час найрізноманітніших процесів в онтогенезі.

Найбільша кількість лектиновмісних видів рослин належить до родини бобових, із насіння яких виділено найвідоміші фітолектини – фітогемаглютинін (ФГА) та конканавалін А з *Phaseolus vulgaris* L. і з *Canavalia ensiformis* L. відповідно. Виявлений у рослинах одним із перших ФГА широко застосовується як вуглеводзв'язувальний білок та мітогенний стимулятор в біохімії, ізосерології і медицині. ФГА є глікопротеїном, вуглеводний компонент якого містить ацетилглюкозамін та манозу. Він належить до групи лектинів, у яких відсутній цистеїн. Його молекула має дві неіденічні субодиниці з молекулярними масами 34

та 36 кДа. Цей глікопротеїн може утворювати 5 ізоформ (ізолектинів) – E4, E3L, E2L2, E1L3, L4 – з молекулярною масою 115 кДа. Суміш ізолектинів можна розділити на мітогенну неритроаглютинувальну фракцію із простою субодиницею L (34 кДа) і мітогенну еритроаглютинувальну білкову фракцію, яка містить обидві субодиниці – E та L з молекулярними масами 36 та 34 кДа відповідно [1, 12–14]. Доведено, що лектини накопичуються в насінні, становлячи близько 10% загального білка сім'ядолей [15]. Метою нашої роботи було дослідити фізіолого-біохімічні властивості лектину насіння квасолі сорту “Білозерна” і простежити динаміку накопичення та активності ФГА протягом початкових етапів проростання, що дозволить розширити уявлення щодо фізіологічної ролі лектинів.

Матеріали і методи

У дослідженнях використовували дозріле сухе насіння (схожість понад 80%) білої спаржевої квасолі (*Phaseolus vulgaris* L.) сорту “Білозерна”. Насіння стерилізували спиртом (2 хв) та пророщували протягом 24 год на фільтрувальному папері, змоченому дистильованою водою, при температурі 26 °С. Для досліджень різних частин зародка насіння ділили на зародкові осі та сім'ядолі.

Виділення та очищення ФГА проводили методом D. A. Rigas та E. E. Osgood [1]. Для цього сухе насіння перемелювали на борошно і заливали охолодженою 0,1 н. HCl. Суспензію

перемішували протягом 24 год і центрифугували (10–15 хв, 1000 об/хв). До супернатанту повільно доливали рівний об'єм насиченого сульфату амонію (рН 1,0), розчин залишали на ніч, після чого його центрифугували при 13 000 об/хв. До супернатанту доливали однаковий об'єм сульфату амонію. Суспензію відстоювали 24 год, чистий супернатант відбирали сифоном, а залишок центрифугували при 13 000 об/хв. Одержаний осад розчиняли в подвійному об'ємі дистильованої води і діалізували 36 год при 1 °С проти 40-кратного об'єму дистильованої води. Очищений ФГА осаджували 10-кратним розведенням крижаної дистильованої води, центрифугували (4500 об/хв, 1 год) і ліофілізували. Одержаний препарат аналізували за допомогою електрофорезу.

Електрофорез білків проводили модифікованим методом U. K. Laemmli [17] з використанням градієнтного ПААГ (10–22%) у присутності додецилсульфату Na (Ds-Na). Для виділення білків використовували 0,1 М Tris-HCl-буфер (рН 7,6).

Білок осаджували 4-кратним об'ємом охолодженого ацетону і центрифугували 30 хв при 6000 об/хв і 4 °С. Осад розчиняли в буфері для зразків, який містив 6 М сечовину; 1 М Tris-HCl (рН 6,8); 2% Ds-Na; β-меркаптоетанол і бромфеноловий синій і нагрівали 2 хв на водяній бані при 90 °С. У лунки з концентрувальним ПААГ (3%) вносили 20 і 50 мкг білка з підготовленого препарату, а також молекулярний маркер, який включав фосфорилазу (94 кДа), бичачий сироватковий альбумін (67 кДа), овальбумін (43 кДа), карбонат-дегідротаза (30 кДа), інгібітор трипсину сої (20,1 кДа) та α-лактальбумін (14,4 кДа). Крім того, для чіткішої ідентифікації досліджуваного ФГА в лунку вносили препарат очищеного ФГА («Serva», Німеччина) в кількості 10 та 15 мкг. Електрофорез проводили в розділювальному 12%-му ПААГ (градієнт концентрацій 10–22%) з використанням Tris-гліцинового електродного буфера, який містив 0,1% Ds-Na. Сила струму до входу барвника у розділювальний гель становила 30 мА і 100 мА (протягом наступних 3–4-х годин на пластину). Гелі фіксували в суміші етанол–оцтова кислота–вода (5 : 4 : 1 за об'ємом). Цю саму суміш використовували як розчин для відмивання гелю після фарбування кумасі R-250. Гелі денситометрували на денситометрі Ultrosan 2202. Електрофоретичну рухливість реєстрували відносно довжини шляху барвника бромфенолового синього.

Концентрацію білка визначали методом M. M. Bradford у мікромодифікації S. M. Read

та D. H. Northcote [18], кількість ФГА та його субодиниць – за площею піків на денситограмах гелей, яку виражали в умовних одиницях.

Для вивчення лектинової активності застосовували метод гемаглютинації, запропонований M. Д. Луциком. Для одержання лектиновмісного екстракту рослинний матеріал розтирали у 0,05 М NaCl, після чого його фільтрували та центрифугували при 3000 об/хв. Одержаний супернатант використовували як лектиновмісний екстракт. Реакцію гемаглютинації здійснювали при кімнатній температурі в імунологічному планшеті з U-подібними лунками. В лунки вносили 0,05 мл забуференого сольового розчину (Na-фосфатний, рН 7,4). Потім готували низку дворазових розведень лектиновмісного екстракту. Водночас готували 2%-ну суспензію нативних еритроцитів кролів, яку відразу вносили в лунки (50 мкл). Аглютинацію реєстрували через 60–120 хв за інтенсивністю реакції, вираженою в умовних балах. Про відсутність аглютинації (0 балів) судили візуально за чіткою плямою на дні лунки. У разі аглютинації еритроцити вкривають усе дно лунки (3 бали). Титр лектину характеризується максимальним розведенням або мінімальною концентрацією його в розчині, при якому ще реєструється аглютинація еритроцитів. Лектинову активність виражали в обернених одиницях (мг/мл)⁻¹ і визначали як мінімальну концентрацію білка, за якої спостерігається аглютинація [19].

Дослідження вуглеводної специфічності починали з визначення вуглеводу, який зв'язує лектин. Для цього змішували 0,05 мл 0,6 М розчину вуглеводу з 0,05 мл розчину лектину (титр 1 : 4). Після 15-хвилинної інкубації при кімнатній температурі до суміші додавали 0,05 мл 2%-ї суспензії еритроцитів. Інкубацію здійснювали ще 60 хв. У лунках, в яких аглютинація еритроцитів пригнічується, міститься вуглевод, що взаємодіє з лектином. Кінцевий вміст вуглеводу в суміші становить 0,2 М.

В експериментах використовували такі вуглеводи: арабінозу, галактозу, глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, ксилозу, рамнозу, фруктозу, дульцит, інозит, маніт, сорбіт, N-ацетил-D-галактозамін кваліфікації ч.д.а. («Реахим», Росія).

Результати та обговорення

З насіння квасолі сорту “Білозерна” нами виділено очищений лектин, який має електрофоретичні характеристики, подібні до очищеного препарату ФГА фірми «Serva», а саме: виділений лектин за умов денатурувального

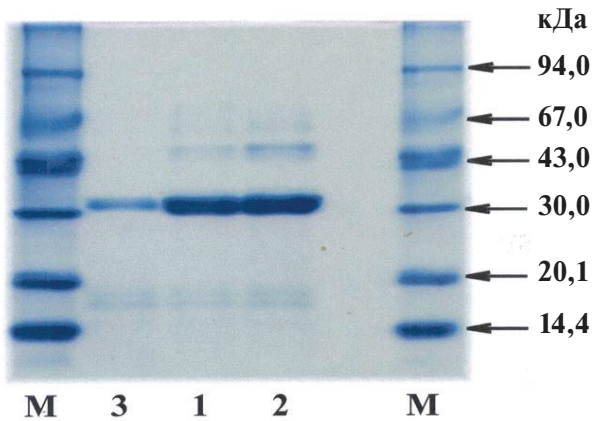


Рис. 1. Електрофореграми виділеного лектину (2 і 3) та стандартного препарату ФГА фірми «Serva» (1); М – маркерні білки.

електрофорезу розділявся на дві субодиниці, які відповідали двом субодиницям ФГА – легкій Л (лімфоцитаактивній) з молекулярною масою 34 кДа і важкій Е (еритроцитаактивній) з молекулярною масою 36 кДа (рис. 1).

Для вивчення субодиничного складу та змін загального вмісту ФГА проводили електрофоретичний аналіз легкорозчинних білків, виділених із зародкових осей та сім'ядолей на різних етапах проростання насіння – через 6, 12 та 24 год після початку набухання насіння (рис. 2).

За площею піків на денситограмах гелей було встановлено відносну кількість ФГА та його субодиниць (таблиця). Результати досліджень свідчать про істотне зменшення кількості лектину, яке продовжується до 24 год як у зародкових осях, так і в сім'ядолях, передусім протягом перших 12 год проростання. Зокрема, через 6 год вміст ФГА в зародкових осях зменшується в 1,5 раза, а в сім'ядолях – в 1,1 раза.

Аналогічно змінюється і лектинова активність на початкових етапах проростання насіння (рис. 3), а саме: протягом перших трьох годин після замочування активність лектину в

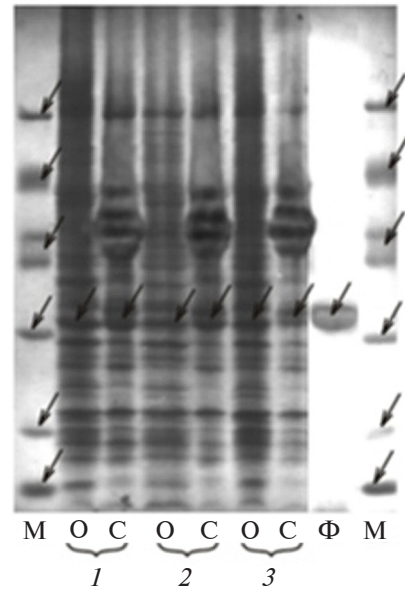


Рис. 2. Електрофоретичні спектри легкорозчинних білків насіння квасолі під час його проростання: 1 – 6 год, 2 – 12 год, 3 – 24 год, М – маркерні білки, Ф – ФГА, О – зародкові осі, С – сім'ядолі. Стрілками позначено електрофоретичні смуги маркерних білків та ФГА; колонки 1–3 – через 6, 12 і 24 год проростання відповідно.

сім'ядолях зменшується на 20%, а через 6 год становить лише 20% його активності в сухому насінні. У зародкових осях через 12 год проростання лектинова активність знижується майже до нуля. Слід відзначити, що лектинова активність пов'язана, насамперед, з динамікою субодиниці Е, яка, очевидно, є визначальною для вияву еритроаглютинувальної активності ФГА.

При вивченні ранніх етапів розвитку зернівок пшениці іншими авторами було також показано, що більша частина лектину втрачається в першу годину їхнього набухання [20]. Що стосується наших досліджень, то можна припустити, що зниження вмісту ФГА

Відносна кількість лектину (ум. од.) та частки його субодиниць Е та Л (у %) протягом проростання насіння квасолі

Варіанти досліджу	Зародкові осі			Сім'ядолі		
	Сумарний лектин	Субодиниці		Сумарний лектин	Субодиниці	
		Е	Л		Е	Л
Сухе насіння	140,2	51,3	48,7	72,5	42,8	57,2
6 год	93,0	44,0	56,0	65,0	38,5	61,5
12 год	75,0	30,7	69,3	52,0	57,7	42,3
24 год	60,0	45,0	55,0	128,0	37,5	62,5

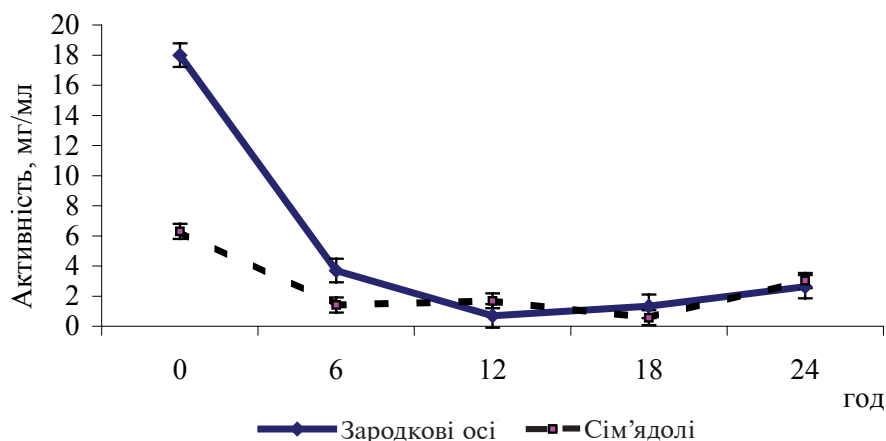


Рис. 3. Динаміка активності лектину в зародкових осях та сім'ядолях упродовж проростання насіння.

в насінні квасолі під час процесів проростання пов'язано з катаболізмом лектину, як і інших запасних білків.

Проте деякі дані літератури свідчать про можливість вимивання рослинних білків із насіння в разі його інтенсивної гідратації на початку проростання через нестабільні та ушкоджені мембранні структури. Так, Д. В. Фонтейном [21] було показано виділення лектину з гідратованого насіння сої упродовж 48 год проростання. Одержані нами дані свідчать, що вже за перші 24 год лектин інтенсивно вивільнюється з насінини у навколишнє середовище, внаслідок чого, ймовірно, і відбувається виявлене нами стрімке зниження його вмісту на початкових етапах розвитку зародка квасолі.

Важливо зазначити, що більшість дослідників асоціюють такі процеси з підвищенням захисної ролі лектинів у насінні під час його проростання. Крім того, зв'язуючи залишки N-ацетил-D-галактозаміну, ФГА, вуглеводна специфічність якого була незмінною протягом 24 год і однаковою в різних частинах зародка, здатен гальмувати ріст фітопатогенних бактерій, зокрема *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* збудника бактеріального опіку гороху. Це підтверджує гіпотезу про участь лектинів у захисті насіння від патогенів під час проростання [4].

ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ ЛЕКТИНА ПРИ ПРОРАСТАННІ СЕМЯН ФАСОЛИ (*Phaseolus vulgaris* L.)

Н.В. Ковальчук

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного
НАН Украины, Киев;
e-mail: hormon@botany.ua

Проведено исследование динамики количества и активности фитогемагглютининов (ФГА) на ранних этапах прорастания семян фасоли. Изучены электрофоретические характеристики, субъединичный состав и углеводная специфичность лектина, выделенного из семян белой спаржевой фасоли сорта "Белозерная". Обнаружено, что исследуемый лектин состоит из двух субъединиц Е и Л с молекулярными массами 34 и 36 кДа соответственно, аналогично очищенному препарату ФГА («Serva», Германия), и специфично связывает N-ацетил-D-галактозамин и галактозу. При прорастании семян содержание и активность ФГА резко снижается как в зародышевых осях, так и в семядолях, вероятно, вследствие его выделения в окружающую среду. По-видимому, одним из механизмов защиты прорастающего семени от патогенов является выделение

лектинов, способных после связывания с компонентами клеточных стенок бактерий тормозить их рост.

Ключевые слова: лектины, ФГА, прорастание семян, фасоль.

**DYNAMIC OF LECTIN ACTIVITY
DURING BEAN SEED *Phaseolus vulgaris* L.
GERMINATION**

N. V. Kovalchuk

Kholodny Institute of Botany, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: hormon@botany.ua

S u m m a r y

PHA quantity and activity dynamics during early germination of bean seed were investigated. Electrophoretic characteristics, subunits composition and carbohydrate-binding specificity of lectin extracted from white kidney bean cv. Bilozerna were studied. It was shown that investigated lectin consisted of 2 subunits E and L with molecular weight 34 and 36 kDa, respectively, analogously to purified PHA («Serva», Germany), and specifically bound N-acetyl-D-galactosamin and galactose. During germination both quantity and activity of PHA were dramatically decreasing in embryonic axes and in cotyledons, possibly, as a result of the lectin release from seeds to the environment. It is very likely that one of the defence mechanisms of germinating seeds is related with the releasing of lectins that are able to bind components of the bacterial cell wall and to inhibit their growth.

Key words: lectins, PHA, seed germination, kidney bean.

1. *Rigas D. A., Osgood E. E.* // J. Biol. Chem. — 1955. — **212**. — P. 607–615.
2. *Roth J.* // Exp. Pathol. — 1978. — Suppl. 3. — P. 186–189.
3. *Луцик М. Д., Панасюк Е. Н., Луцик А. Д.* Лектины. — Львов: Вища шк., 1981. — 154 с.
4. *Chrispeels M. J., Raikhel N. V.* // The Plant Cell. — 1991. — **3**. — P. 1–9.
5. *Loris R., Van Walle I., De Greve H. et al.* // J. Molec. Biology. — 2004. — **335**, N 5. — P. 1227–1240.
6. *Guzman-Partida A. M., Robles-Burgueno M. R., Ortega-Nieblas M., Vazques-Moreno I.* // Biochimie. — 2004. — **86**, N 4–5. — P. 335–342.
7. *Xiuyun Ye and T.B. Ng* // Inter. J. Biochem. Cell Biology. — 2001. — **33**, N 1. — P. 95–102.
8. *Nomura K., Ashida H., Uemura N. et al.* // Phytochemistry. — 1998. — **49**, N 3. — P. 667–673.
9. *Barre A., Bourne Y., Van Damme E. J. M.* // Biochimie. — 2001. — **83**, N 7. — P. 645–651.
10. *Nomura K., Nakamura S., Fujitake M. and Nakanishi T.* // Biochem. Biophys. Res. Communications. — 2000. — **276**, N 1. — P. 23–28.
11. *Buts L., Dao-Thi M.-H., Loris R. et al.* // J. Molec. Biology. — 2001. — **309**, N 1. — P. 193–201.
12. *Hoffman L. M., Donaldson D. D.* // EMBO J. — 1985. — **4**. — P. 883–889.
13. *Leavitt R. D., Felsted R. L., Bachur N. R.* // J. Biol. Chem. — 1977. — **252**, N 9. — P. 2961–2966.
14. *Лахтин В. М., Романченко А. И.* // Докл. ВАСХНИЛ. — 1983. — № 7. — С. 46–47.
15. *Nakamura K., Matsuoka K.* // Plant Physiol. — 1993. — **101**. — P. 1–5.
16. *Borrebaeck C., Mattiasson B.* // Ibid. — 1983. — **58**. — P. 29–32.
17. *Laemmli U. K.* // Nature. — 1970. — **227**, N 5259. — P. 680.
18. *Read S. M., Northcote D. H.* // Analyt. Biochemistry. — 1981. — **116**. — P. 53–64.
19. *Выскребенцева Э. И., Борисова Н. Н.* // Физиол. растений. — 1996. — **43**, № 4. — С. 527–532.
20. *Stinissen H. M., Peumans W. J., Carlier A. R.* // Arch. Int. Physiol. Biochim. — 1981. — **89**. — P. 132.
21. *Fountain D. W. et al.* // Science. — 1977. — **197**. — P. 1185–1187.

Отримано 07.04.2005