

## ЛЕКТИНИ СУЦВІТЬ *Sambucus nigra* L.: ВИДІЛЕННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ З ВИКОРИСТАННЯМ ПРОКАРІОТИЧНИХ ТЕСТ-СИСТЕМ

І. С. КАРПОВА, Н. В. КОРЕЦЬКА, Л. Г. ПАЛЬЧИКОВСЬКА, В. В. НЕГРУЦЬКА

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;  
e-mail: i.s.karpova@imbg.org.ua*

Із екстрактів суцвіть та пилку бузини чорної (*S. nigra*) методом автофокусування (ізоелектрофокусування без амфолітів-носіїв) виділено низку лектинів. Фракції з гемаглютинувальною активністю, які досліджували методом електрофорезу у *Ds-Na-ПААГ*, відрізнялись вуглеводною специфічністю. У суцвіттях виявлено мажорний гетеротетрамерний лектин зі специфічністю до *N*-ацетил-*D*-галактозаміну, який містить субодиниці двох типів з молекулярною масою близько 30 та 33 кДа. Для нього запропоновано назву – *SNAfln-I*. У пилку ідентифіковано ще два лектини з ідентичними субодиницями. Для мажорного лектину пилку бузини з молекулярною масою субодиниці близько 26 кДа, специфічного до глюкози/манози, запропоновано назву *SNArol-I*. Іншому лектину пилку *SNArol-II* (молекулярна маса субодиниці становить майже 20 кДа) притаманна специфічність до галактози. З метою пошуку мішеней, чутливих до дії лектинів *S. nigra*, досліджували сумісну дію мажорних лектинів та інгібіторів транскрипції феназинового ряду на ріст клітин *Bacillus subtilis*. Виявилось, що *in vivo* тільки *SNArol-I* протидіє цитостатичному ефекту інгібіторів транскрипції. Цей лектин, на відміну від *SNAfln-I*, пригнічує також транскрипцію в системі *in vitro*. Припускається, що різні лектини, які походять з одного джерела, здатні здійснювати різноспрямовану дію на важливі ланки метаболізму клітини. Зокрема, однією з таких мішеней може бути ДНК-залежний синтез РНК.

*Ключові слова:* лектини, *Sambucus nigra*, *Bacillus subtilis*, автофокусування, похідні феназину, транскрипція *in vitro*.

**Б**іологічно активні білки лектини (переважно глікопротеїни) здатні вибірково та оборотно зв'язувати вуглеводи і вуглеводвмісні біополімери без порушення їхньої хімічної структури [1]. Під час вуглевод-лектинової взаємодії або відбуваються такі первинні реакції, як аглютинація, адгезія і преципітація, або шляхом сигнального впливу індукуються каскад біохімічних процесів. Припускають, що в цих взаємодіях визначальними є не тільки первинна структура молекули, а й субодинична організація її. Внаслідок цього лектини здатні утворювати низку ізоформ.

Лектини поширені у природі і є складовою частиною усіх живих організмів. Останнім часом вони набули значного практичного застосування. Тому велика увага приділяється перспективі створення лектиновмісних фармакологічних препаратів з антивірусною, імуномодулювальною та протипухлинною дією на основі лектинів рослин, передусім лікарських [1,2]. Так, у Німеччині застосовують лектин омели білої (VAA) – препарат із протипухлинною та антимуtagenною дією [2]. Близькими за структурою до VAA є лектини кори та плодів

бузини чорної, які належать до так званих АВ-токсинів, або, згідно з іншою термінологією, до білків RIP-2 (ribosom inhibition protein). У складі такої молекули одна субодиниця (В) належить до лектинів, а другій притаманна глікозидазна активність. Широкого застосування в Україні як лікарський засіб набули суцвіття бузини чорної, яка містить багато біологічно активних речовин, що нормалізують функції в організмі людини. Це робить дослідження лектинів у цій сировині актуальним.

У ранніх роботах Є. Л. Голинська вперше описала лектини генеративних органів рослин, у т.ч. суцвіть бузини чорної і висловила припущення про їхню важливу роль у процесах запліднення та ембріогенезу. Слід зазначити, що авторка передбачила перспективу практичного застосування цих мембранно-активних сполук у діагностиці онкозахворювань [3,4].

Пізніше було показано, що лектин із суцвіть бузини чорної, специфічний до *N*-ацетил-*D*-галактозаміну, має антимуtagenний вплив на спонтанний та індукований алкілувальним агентом мутагенез у культурі клітин ссавців [5]. Однак відомості щодо спектра лек-

тинів у рослин та можливих шляхів реалізації їхньої дії і досі обмежені.

Метою роботи було дослідити лектини суцвіть бузини чорної та виявити клітинні мішені, чутливі до їхньої дії, шляхом використання інгібіторного аналізу із залученням нових синтетичних біорегуляторів феназинового ряду, які, утворюючи білково-нуклеїнові комплекси, здатні впливати на матричні процеси. Зокрема, встановлено їхню здатність до пригнічення транскрипції *in vitro* за участю ДНК-залежної РНК-полімерази фага T7 [6,7].

Сумісне застосування високо- і низькомолекулярних біологічно активних речовин актуальне також для практичного застосування і посилення їхнього медико-біологічного ефекту, а також зниження токсичності ароматичних антибіотиків. На цьому базується сучасна стратегія комбінованої хіміотерапії злоякісних пухлин.

### Матеріали і методи

Лектини суцвіть бузини екстрагували із сухої сировини 0,015 М NaCl і очищали електрофокусуванням без застосування амфолітів – методом, що одержав назву автофокусування [8,9], у нашій модифікації. Під час автофокусування для підтримання рН використовується лише один клас амфолітів, а саме білки з високою молекулярною масою. Білки, з одного боку, діють подібно до розчину амфолітів і створюють градієнт рН, а з іншого – вони є дослідним матеріалом, що зазнає фракціонування у процесі ізоелектрофокусування. За стабілізації режиму (напруга – 220 В, джерело постійного струму – Б5-50) створювали стартовий струм 7–10 мА, який поступово знижувався до 2 мА. Автофокусування лектиновмісного екстракту проводили двома етапами. На першому етапі автофокусування застосовували комірчасту камеру невеликого об'єму (120 мл), в якій впродовж 3–5 год відбувалося формування градієнта рН у діапазоні від кислих значень (1–2) до лужних (10–12). В експериментах застосовували камеру, яка була розділена перегородками на 21 комірку. Перша та остання комірки містили платинові електроди. На другому етапі в кожен відповідну комірку аналогічної камери, але більшого об'єму (500 мл), вносили по 5 мл екстрактів з певними значеннями рН, одержаних на першому етапі автофокусування, після чого камеру заповнювали рештою вихідного розчину. Під дією електричного поля ( $U = 220$  В) відбувається концентрування білків відповідно до їхньої ізоелектричної точки pI. Під час двоступінча-

того автофокусування розділення та очищення компонентів порівняно з авторським методом прискорюється. Після закінчення процесу досліджували гемаглютинувальну активність (ГАА) одержаних фракцій, використовуючи нативні еритроцити людини системи АВ0 та оброблені формаліном еритроцити барана [10]. Загальний вміст білка у пробах визначали спектрофотометричним методом.

Відібрані лектиновмісні фракції екстракту бузини із значною ГАА осаджували спиртом. Для цього до екстракту додавали охолоджений етанол (до концентрації 75%). Суміш витримували 20 год при 4 °С, після чого центрифугували на центрифугі MiniSpin Eppendorf (10 000 g, 15 хв). Одержаний осад розводили 200 мкл 0,15 М NaCl і зберігали при температурі -18 °С. У лектиновмісних фракціях визначали вуглеводну специфічність, яку оцінювали за мінімальною концентрацією вуглеводу, здатною пригнічувати реакцію гемаглютинації з еритроцитами людини [10]. Подальше електрофоретичне дослідження лектинів здійснювали методом U. K. Laemmli [11] у системі ПААГ–Ds–Na з використанням 10%-го гелю. Для пошуку клітинних мішеней, чутливих до дії лектинів суцвіть бузини, використовували штам SB25 *B. subtilis* – біохімічний мутант за геном *hisH* (гістидиолфосфат-амінотрансферази, КФ 2.6.1.9) і геном *trpC2* (індолгліцеролфосфатсинтетази). Цей штам, зареєстровано у Міжнародній колекції [12] і люб'язно надано нам проф. О. О. Прозоровим (НДІ “Генетика”, РАН, Москва). Дослідження сумісної дії лектинів та синтетичних біорегуляторів на репродукцію клітин *B. subtilis* проводили *in vivo* дифузним методом [13, 14]. Як інгібітори використовували такі біорегулятори: природний антибіотик феназин, феназин-1-карбонову кислоту (ФКК-1) та сконструйований на її основі кон'югант із 6-азаурацилом. До розчину лектинів (200 мкг/мл) у стерильному 0,15 М NaCl (100 мкл) додавали 100 мкл стандартизованої бактеріальної культури. Суспензію інкубували 30 хв при 37 °С, після чого бактерії висівали (100 мкл суспензії на чашку Петрі з повноцінним агаризованим середовищем). Стокові розчини феназину, ФКК-1 та її кон'югата із 6-азаурацилом у диметилсульфоксиді (ДМСО) розводили стерильною водою до концентрації 1 мг/мл і наносили самплером краплями по 10 мкл на поверхню бактеріального газону. Після 24-годинної інкубації чашок при 37° визначали діаметри зон інгібування бактеріального росту. Ступінь впливу лектинів на бактеріостатичний ефект низькомолекулярних біорегуляторів визначали за різницею між діа-

метром зон пригнічення росту не обробленої лектином (контроль) та обробленої культур – в абсолютних значеннях (мкм) і відсотках. Дані незалежних експериментів у трьох повторностях обробляли статистично, використовуючи комп'ютерну програму Qauttro.

Дослідження впливу лектинів суцвіть бузини чорної на процес транскрипції *in vitro* проводили із залученням ДНК-залежної РНК-полімерази бактеріофага T7 кишкової палички так, як описано раніше [7,13,15].

### Результати та обговорення

Бузина чорна має суцвіття типу зонтик із великою кількістю дрібних квіток. Для одержання лектинів із сировини видаляли осьові частини суцвіть, залишаючи пелюстки, квітотоніжки, елементи жіночої та чоловічої генеративної сфери з великою кількістю пилку. Оскільки в такій сировині міститься багато компонентів, які важко відокремити, на першому етапі роботи досліджували сумарний екстракт із свіжозаготовленої сухої сировини, зібраної нами на території зони відпочинку “Феофанія”.

Особливість методу автофокусування полягає в тому, що на суміш білків одночасно впливають електричним полем та градієнтом рН, створеним компонентами екстракту, які несуть заряд. Змінюючи умови (силу струму, іонну силу, концентрацію матеріалу), підбрали таку комбінацію їх, за якої електрофорез

триває доти, поки індивідуальні білки повністю не розподіляться на окремі зони відповідно до ізоелектричних значень рН, за яких вони втрачають здатність рухатись в електричному полі.

Як впливає з рис. 1, унаслідок автофокусування було одержано ступінчатий градієнт рН у широкому діапазоні – від кислих (< 2,0) до лужних (12,0) значень. Оскільки дані ГАА свідчать про підвищену спорідненість лектинів суцвіть бузини до еритроцитів людини групи А (II) порівняно з еритроцитами групи 0 (I), в подальших експериментах лектиновмісні фракції досліджували з використанням еритроцитів людини зазначеної групи. Виявилось, що фракції, здатні аглютинувати еритроцити людини, нерівномірно розподіляються на всьому профілі градієнта рН. Це вказує на наявність у пробі декількох лектинів із неоднаковими фізико-хімічними властивостями. Зокрема, фракції № 4–7 локалізуються в кислій зоні рН і характеризуються максимальною ГАА та величиною рН, близькою до 3,0. Інший пік ГАА відповідає слабкокислим значенням рН: 4,5–6,0 (фракції № 8–13). Третій пік лектинової активності (фракції № 14–17) припадає на лужний діапазон рН (7,5–10,0).

Крім еритроцитів людини, для тестування ГАА в різних фракціях лектинів суцвіть бузини використовували оброблені формаліном еритроцити барана, які нечутливі до екстремальних значень рН (рис. 1). Розподіл аглю-

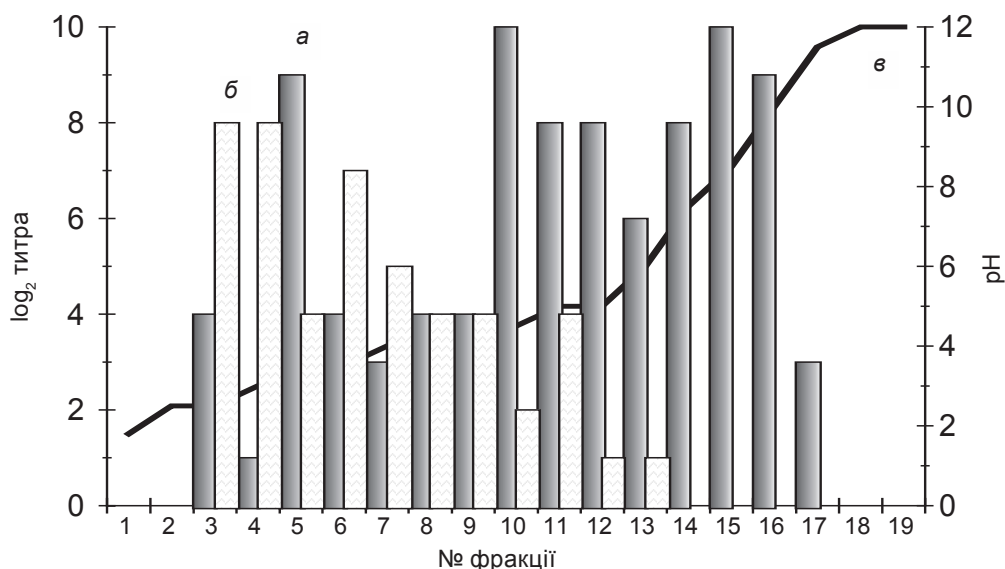


Рис. 1. Результати автофокусування екстракту суцвіть бузини чорної: а – ГАА лектиновмісних фракцій в реакції з еритроцитами людини групи А (II); б – ГАА у реакції з обробленими формаліном еритроцитами барана; в – градієнт рН, що формується у процесі автофокусування

тинувальної активності у фракціях цих еритроцитів відрізняється від еритроцитів людини наявністю лише одного піка в кислій зоні рН. Слід зазначити, що положення максимуму ГАА еритроцитів барана і еритроцитів людини (фракція № 5) збігаються.

Згідно з даними автофокусування, у суцвіттах бузини було виявлено щонайменше три піки лектинової активності: № 1 – у кислій зоні рН, № 2 – у лужній та № 3 – у слабокислій. Фракції з максимальною ГАА, досліджували на вуглеводну специфічність як визначальної характеристики кожного лектину. Виявилось, що лектину, який відповідає піку № 1, притаманна така специфічність: N-ацетил-D-галактозамін > галактоза > лактоза. Пік № 2 – є специфічним до глюкози/манози, пік № 3 – до галактози.

Оскільки у свіжозібраній сировині суцвітть бузини чорної завжди є значна кількість пилку, то постало завдання з'ясувати, який з виявлених лектинів міститься в чоловічих статевих клітинах. Для цього нами проведено додаткове автофокусування екстракту пилку бузини за тих самих умов, що й сумарного екстракту суцвітть. Виявилось, що в пилку домінує специфічний до глюкози/манози лектин № 2, в той час як лектин № 1 зі специфічністю до N-ацетил-D-галактозаміну в ньому не ідентифікується. У слабокислій зоні градієнта рН, що сформувалася під час фракціонування екстракту пилку, було виявлено лектиновмісний компонент, подібний за властивостями до лектину № 3.

Електрофоретичне дослідження лектиновмісних фракцій (рис. 2), в системі Ds-Na-ПААГ [11] показує, що в лектині № 1 є дві субодиниці з молекулярними масами 30 і 33 кДа, які залежно від концентрації належать або до димерів (60 та 65 кДа), або до тетрамерів. Молекулярна маса субодиниці лектину № 2 становить близько 26 кДа, а № 3 – 20 кДа.

Одержана нами електрофореграма (рис. 3) показує, як відбувається концентрування мажорного лектиновмісного компоненту пилку (лектину № 2) залежно від ізоелектричної точки. Максимальний вміст цього лектину, що формується при рН 8,8, відповідає фракції № 17.

Отже, результати досліджень свідчать, що один із мажорних лектинів суцвітть бузини (№ 2) локалізується в пилку. Ймовірно, що низькомолекулярний білок № 3 із слабкої кислоти зони рН також належить пилку, хоча його вміст у ньому значно менший. З огляду на склад сировини, логічно припустити, що

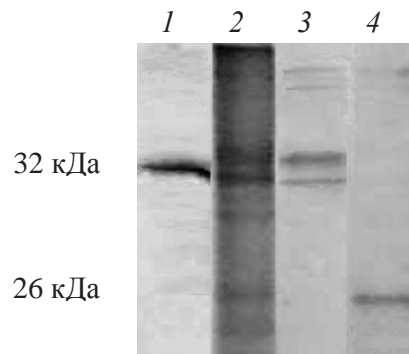


Рис. 2. Електрофореграма лектиновмісних фракцій, одержаних з екстракту суцвітть бузини чорної методом автофокусування: 1 – SNA-I (контроль), 2 – сумарний екстракт до автофокусування, 3 – лектину № 1 (рН 3,0), 4 – лектину № 2 (рН 8,8)

інший мажорний лектин суцвітть (№ 1), який не виявлено в пилку, міститься в жіночій генеративній сфері.

Відмінності між лектинами суцвітть за гемаглютинувальними властивостями щодо еритроцитів різної видової належності, вуглеводною специфічністю та фізико-хімічними характеристиками передбачає, що вони, вірогідно, виконують різні функції. Раніше нами було показано, що однією з найчутливіших мішеней дії лектинів є ДНК-залежний синтез РНК [13]. Розроблений підхід було застосовано для дослідження впливу мажорних лектинів суцвітть бузини на процес транскрипції *in vivo* та *in vitro*. У першому випадку дифузним методом досліджено спільну дію трьох транскрип-

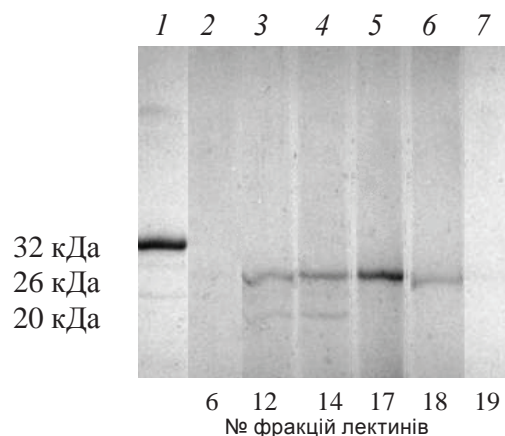


Рис. 3. Електрофореграма лектиновмісних фракцій екстракту пилку бузини чорної, сформованих у процесі автофокусування (стовпчики 2–7), порівняно з лектином кори SNA-I (стовпчик 1)



ційних інгібіторів феназинового ряду і двох мажорних лектинів № 1 та 2 окремо і в їхній суміші (співвідношення 1 : 1). Одержані нами результати порівнювали з дією комерційного препарату лектину кори – SNA (рис. 4). Виявилось, що цитостатичний ефект двох чинників на клітини *B. subtilis* залежить від структури як інгібітору, так і лектину. На інгібувальну дію феназину всі досліджені лектини, в т.ч. SNA, не впливають (рис. 4, А). У разі ускладнення структури молекули і утворення ФКК-1 спостерігається неоднакове блокування лектинами цитостатичного ефекту. Лектин № 1 у цьому випадку був неактивним, тоді як два інші – SNA та № 2, а також суміш № 1 та 2 вірогідно блокували (на 30–50%) бактеріостатичну дію ФКК-1 (рис. 4, В).

За подальшого ускладнення структури інгібітору після введення до молекули аналогу основи – 6-азаурацилу – було одержано цікаві результати. Підтвердилося спостереження, що кожний з досліджуваних лектинів суцвіть бузини характеризується індивідуальним впливом: лектин № 1 був неактивним, тоді як № 2 – ефективним антагоністом, аналогічно до лектину кори. У цьому випадку привертає увагу те, що суміш різних лектинів зумовлює появу нової ознаки – здатності повністю блокувати вплив інгібітору (рис. 4, С).

Таким чином, досліди *in vivo* показують, що із двох полярних за сумарним зарядом лектинів, лише № 2 має спільну мішень із низькомолекулярними інгібіторами транскрипції. Водночас лектин № 1, який не виявляє самостійного впливу на цитостатичний ефект інгібіторів, регулює дію лектину № 2.

Оскільки при дослідженні *in vitro* транскрипції із застосуванням модельної ДНК-полімерази фага Т7 було показано, що саме цей процес є найвірогіднішою мішенню дії феназину та його похідних [7], то ми вважали доцільним використання зазначеної моделі для вивчення можливого механізму дії лектинів суцвіть бузини.

У цих експериментах розчини лектинів (концентрації 1, 10 та 100 мкг/мл) додавали до компонентів, які беруть участь у процесі транскрипції із плазмідного промотору. Виявилось, що два лектини пилку – комерційний із кори рослини та № 1 із суцвіть бузини (за припущенням, належить до жіночої генеративної сфери) – вірогідно не впливають на транскрипцію у всьому діапазоні застосованих концентрацій. При цьому мажорному лектину № 2 пилку притаманна інгібіторна активність і при концентрації 100 мкг/мл він

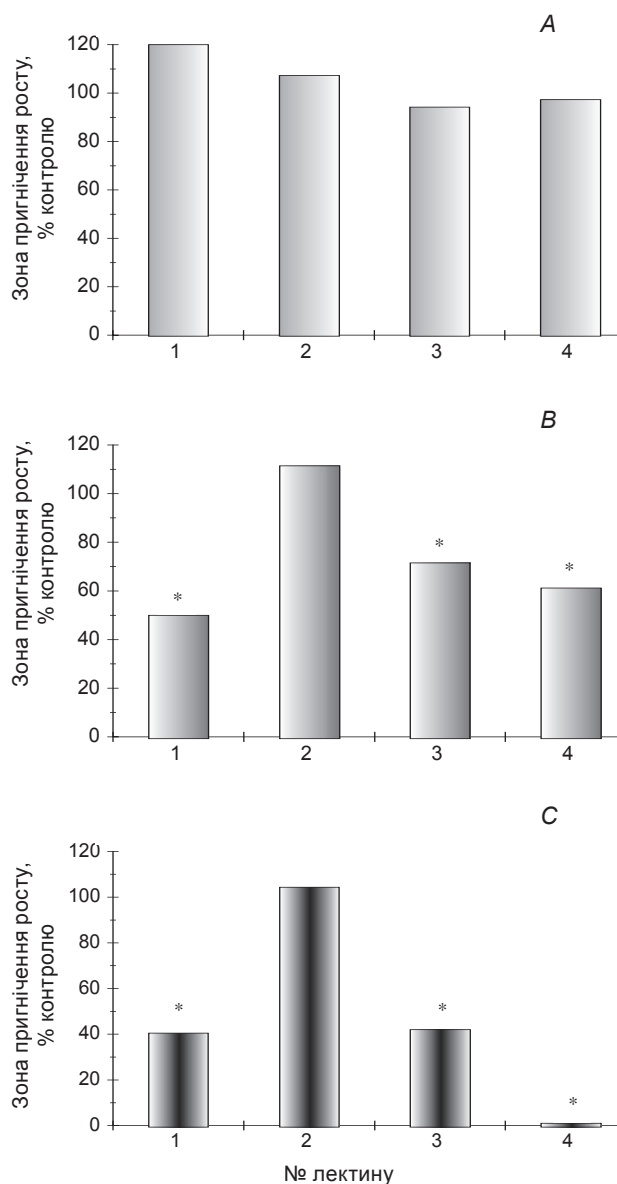


Рис. 4. Вплив лектинів бузини чорної на цитостатичну дію феназину (А), ФКК-1 (В) та кон'югату ФКК-1 і 6-азаурацилу (С): 1 – SNA, 2 – лектин № 1, 3 – лектин № 2, 4 – суміш лектинів № 1 і № 2. \* Відхилення від контролю вірогідні,  $P < 0,05$

повністю блокує процес транскрипції (рис. 5). Таким чином, встановлено, що обидва лектини суцвіть з неоднаковими фізико-хімічними та вуглеводзв'язувальними властивостями є відмінними за характером дії на рівні транскрипції.

Традиційно номенклатура рослинних лектинів базується на аббревіатурі поширеної назви об'єкта з додаванням слова аглютинін. Однак із відкриттям дедалі нових лектинів, а також за

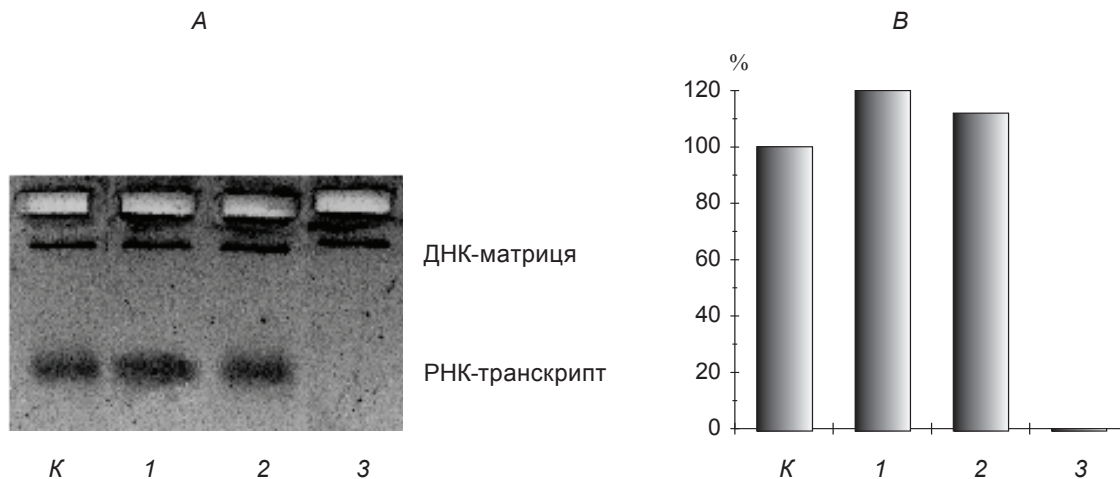


Рис. 5. Електрофореграма (А) та денситограма (В) продуктів транскрипції *in vitro*, сформованих за дії лектинів бузини чорної (100 мкг/мл), які відмінні за напрямком переміщення в електричному полі у процесі автофокусування: К – повний транскрипт, одержаний за відсутності лектину (контроль), 1 – SNA, 2 – SNAflu-I, 3 – SNApol-I

наявності в одній рослині двох або більше різних лектинів, виникають непорозуміння, що свідчить про доцільність упровадження нової номенклатури. Так, наприклад, скорочена назва AAA відповідає аглютиніну риби *Anguilla anguilla*, гриба *Aleuria aurantia* та рослини *Aloe arborescens*. J. M. Van Damme et al. [2] запропонували нову розширену номенклатуру, в якій поєднано відомості про видову назву рослини; тканину, з якої виділено лектин; його структурний клас, вуглеводну специфічність та порядковий номер. З огляду на ці рекомендації, можна запропонувати (з певними скороченнями) такі назви для виявлених та охарактеризованих нами лектинів суцвіть бузини чорної: № 1 – SNAflu-I, № 2 – SNApol-I та № 3 – SNApol-II.

У літературі описано чотири лектини кори бузини чорної, один лектин із насіння та три з її плодів [2]. Всі вони належать до одного класу білків RIP-2, але дещо відмінні за амінокислотою послідовністю, молекулярною масою, надмолекулярною організацією та вуглеводною специфічністю. Мажорним компонентом кори бузини є сіалоспецифічний лектин SNA-I. Цей білок вважається гетеротетрамером, побудованим із глікозильованих субодиниць із молекулярною масою 32 та 35 кДа, які з'єднуються попарно дисульфідними містками. Виявлений нами мажорний лектин суцвіть SNAflu-I за властивостями близький до SNA-I, однак, окрім вуглеводної специфічності до N-ацетил-D-галактозаміну, він характеризується іншою молекулярною масою поліпептидних ланцюгів – 30 та 33 кДа. Мажорному лектину пилку

SNApol-I притаманна порівняно з відомими лектинами бузини менша молекулярна маса (26 кДа), належність до іншого класу за вуглеводною специфічністю (глюкоза/маноза) і наявністю субодиниць одного типу. Така організація молекули свідчить про проблематичність його належності до білків RIP-2, що мають різні субодиниці, і лише одна з них (В) є лектином. Проте в разі наявності в одному матеріалі декількох лектинів виникає питання, чи слід їх вважати різними молекулярними формами одного лектину, чи окремими лектинами. Для відповіді на нього слід провести спеціальні дослідження, передусім для встановлення первинної послідовності ДНК, що кодує відповідний білок.

Отже, використовуючи метод автофокусування, нами в екстракті суцвіть бузини виявлено три лектини, що мають неоднакові властивості і відрізняються за сумарним зарядом молекули, спорідненістю до еритроцитів різної групової належності та вуглеводною специфічністю. Для них запропоновано позначення – SNAflu-I, SNApol-I і SNApol-II. Лектин SNAflu-I концентрується в кислої зоні рН, аглютинуює еритроцити людини і барана, виявляє специфічність до N-ацетил-D-галактозаміну і характеризується наявністю в молекулі двох типів субодиниць (30 та 33 кДа). Вихід препарату із 100 г сухої сировини суцвіть бузини чорної становить 3–4 мг. Лектин SNAflu-I аглютинуює нативні еритроцити людини (група крові А) за мінімальної концентрації (8 мкг/мл), а оброблені формаліном еритроцити барана – при концентрації 16 мкг/мл. Мажорний білок пил-

ку SNApol-I концентрується в лужній зоні рН, аглютинуює еритроцити людини (мінімальна концентрація 16 мкг/мл), є специфічним до глюкози/манози і містить у молекулі однакові субодиниці (26 кДа). Вихід препарату з 10 г сухого пилку – 4 мг. Іншому лектину пилку – SNApol-II – із слабокислої зони рН притаманна специфічність до галактози, а молекулярна маса субодиниць становить близько 20 кДа. Із 10 г сухого пилку одержують 0,2–0,3 мг SNApol-II. Мінімальна концентрація його, що аглютинуює нативні еритроцити людини, 2 мкг/мл.

Пошук мішеней, чутливих до дії лектинів *in vivo*, свідчить, що SNApol-I конкурує за спільну мішень з інгібіторами транскрипції феназинового ряду. Лектин SNAflu-I самостійно не впливає на цитостатичний ефект інгібіторів, проте значно посилює дію SNApol-I.

Дані експериментів, проведених *in vitro*, підтверджують неоднаковий вплив досліджуваних лектинів на процес транскрипції. Установлено, що лектин SNApol-I є ефективним інгібітором.

**ЛЕКТИНЫ СОЦВЕТИЙ  
*Sambucus nigra* L.: ВЫДЕЛЕНИЕ  
И ИССЛЕДОВАНИЕ  
БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ  
НА ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ  
ТЕСТ-СИСТЕМАХ**

*И. С. Карпова, Н. В. Корецкая,  
Л. И. Пальчиковская, В. В. Негруцкая*

Институт молекулярной биологии и  
генетики НАН Украины, Киев;  
e-mail: i.s.karpova@imbg.org.ua

Из экстрактов соцветий пыльцы бузины черной (*S. nigra*) и выделены лектины методом автофокусирования (изоэлектрофокусирования без амфолитов-носителей). Фракции с гемагглютинирующей активностью и отличающиеся по углеводной специфичности исследовали методом электрофореза в Ds-Na-ПААГ. В соцветиях растения идентифицирован мажорный гетеротетрамерный лектин, специфичный к N-ацетил-D-галактозамину, состоящий из двух типов субъединиц с молекулярной массой около 30 и 33 кДа. Он был назван SNAflu-I. Кроме него, в составе пыльцы идентифицировано еще два лектина, молекулы которых состоят из идентичных субъединиц. Для мажорного лектина пыльцы бузины, специфичного к глюкозе/маннозе и состоящего из субъединиц (молекулярна маса около 26 кДа), предложено

название SNApol-I. Еще один лектин пыльцы – SNApol-II – отличается по специфичности к галактозе и имеет молекулярную массу субъединиц около 20 кДа. С целью поиска мишеней, чувствительных к действию лектинов соцветий бузины черной, исследовали совместное действие мажорных лектинов и ингибиторов транскрипции феназинового ряда на рост клеток *Bacillus subtilis*. Оказалось, что только SNApol-I может блокировать *in vivo* цитостатический эффект ингибиторов транскрипции. Данный лектин, в отличие от SNAflu-I, оказался также ингибитором транскрипции в системе *in vitro*. Предполагается, что лектины из одного источника могут осуществлять разнонаправленное влияние на важные звенья метаболизма клетки. Одной из таких мишеней может быть ДНК-зависимый синтез РНК.

Ключевые слова: лектины, *Sambucus nigra*, *Bacillus subtilis*, автофокусирование, производные феназина, транскрипция *in vitro*.

**LECTINS FROM *Sambucus nigra* L.  
INFLORESCENCES: ISOLATION  
AND INVESTIGATION OF BIOLOGICAL  
ACTIVITY USING PROCARYOTIC  
TEST-SYSTEMS**

*I. S. Karpova, N. V. Koretska,  
L. G. Palchikovska, V. V. Negrutska*

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: i.s.karpova@imbg.org.ua

**S u m m a r y**

Isolation of lectins from extracts of the *Sambucus nigra* inflorescences and of pollen material have been performed using isoelectric focusing without carrier ampholytes (autofocusing). Fractions active in agglutination tests with different carbohydrate specificity were subjected to SDS-PAGE. The major lectin found in whole inflorescences was GalNAc specific and is proposed to be a heterotetramer with subunits of about 30 and 33 kDa. It was called SNAflu-I. At least two other lectins were present in the pollen material and supposed to consist of identical subunits. Major positively charged lectin was Glc/Man specific with subunit of 26 kDa and called SNApol-I. Other pollen component (SNApol-II) was Gal specific with subunit of about 20 kDa. In order to elucidate cell targets sensitive for the *S. nigra* lectin's activity the combined effects of the lectins and transcriptional of phenazine origin on *B. subtilis* cells growth have been studied. Only SNApol-I demonstrated

the antagonistic activity against these inhibitors in vivo. This lectin but not the SNAflu-I can also inhibit transcription in vitro. It is supposed that lectins from the same source may act in different directions on cell metabolism. Particularly one of the common targets may be the DNA-dependent synthesis of RNA.

Key words: lectins, *Sambucus nigra*, *Bacillus subtilis*, autofocusing, phenazines, transcription in vitro.

1. *Lis H., Sharon N.* // Chem. Revs. – 1998. – **98**, N 2. – P. 637–674.
2. *Van Damme J. M., Peumans W. J., Pustai A., Bardocz. S.* Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications. Chichester etc.: John Willey and Sons, 1998. – 451 p.
3. *Голинська Є. Л.* Спосіб діагностики новоутворень. Патент України на винахід № 3060 ( UA 3060 C1 G 01 N 33/53), публікація від 26.12.94. – Бюл. № 5–1.
4. *Гольнская Е. Л., Погорелая Н. Ф., Макаренко В. И.* // Изучение и применение лектинов. – 2. Лектины в биологии и медицине. – Тарту. Уч. зап. Тарт. ун-та. – 1989. – Вып. 870. – С. 212–217.
5. *Лукаш Л. Л., Карпова И. С., Мирошниченко О. С.* // Цитол. и генетика. – 1997. – **31**, № 5. – С. 52–60.
6. *Костіна В. Г., Алексєєва І. В., Пальчиковська Л. Г.* // Біополім. і клітина. – 2001. – **17**, № 6. – С. 573–578.
7. *Пальчиковська Л. Г., Гарманчук Л. В., Алексєєва І. В. та ін.* // Там само. – 2005. – **21**, № 5. – С. 433–439.
8. *Sova O.* // J. Chromatography. – 1985. – **320**, N 1. – P. 15–22.
9. *Sova O.* // Ibid. – P. 213–218.
10. *Луцик М. Д., Панасюк Е. Н., Антонюк В. А.* Методы исследования углеводной специфичности лектинов (методич. рекомендации). – Львов, 1983. – 22 с.
11. *Laemmli U. K.* // Nature. – 1970. – **227**, N 5259. – P. 680–685.
12. *Bacillus* genetic stock center. Strains and data. Fourth edition. – Columbus. Ohio, USA. 1989.
13. *Карпова І. С., Пальчиковська Л. Г., Корецька Н. В. та ін.* // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 5. – С. 93–100.
14. *Kada T., Sadaie Y., Sakamoto Y.* Handbook of mutagenicity test procedures / Eds. B. J. Kilbey et al. Amsterdam – New York – Oxford: Elsevier. – 1984. – P. 13–31.
15. *Puvvada M. S., Forrow S. A., Hartley J. A. et al.* // Biochem. – 1997. – **36**, N 3. – P. 2478–2484.

Отримано 07.06.2007