

УДК 543.5; 577.112

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ В ЛУКЕ РЕПЧАТОМ (*Allium cepa* L.) НОВОГО БИОРЕГУЛЯТОРА, ДЕЙСТВУЮЩЕГО В СВЕРХМАЛЫХ ДОЗАХ

© 2011 г. О. Г. Куликова\*, В. П. Ямскова\*\*, А. П. Ильина\*, Д. В. Маргасюк\*,  
А. А. Молявка\*, И. А. Ямсков\*

\*Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, 119991  
e-mail: koulikova\_olga@mail.ru

\*\*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334  
e-mail: yamskova-vp@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.08.2010 г.

В луке репчатом (*Allium cepa* L.) обнаружен биорегулятор, по физико-химическим и биологическим свойствам аналогичный группе биорегуляторов, выделенных из различных тканей животных. Установлено, что за проявление биологического действия растительного биорегулятора отвечает пептид с молекулярной массой  $4036 \pm 2$  Да, для которого была определена 18-членная С-концевая аминокислотная последовательность. На модели проращивания семян ряда овощных культур была показана способность биорегулятора, выделенного из супернатанта экстракта лука, в сверхмалых дозах ( $10^{-13}$  мг белка/мл) ингибировать их рост и развитие.

Ранее нами было показано, что в межклеточном пространстве различных тканей позвоночных животных присутствуют биорегуляторы, влияющие на важнейшие биологические процессы (миграцию, адгезию, пролиферацию, дифференцировку клеток), в концентрациях, соответствующих сверхмалым дозам (СМД),  $10^{-8}$ – $10^{-15}$  мг/мл [1–8]. Биорегуляторы характеризуются наличием тканевой, но отсутствием видовой специфичности, стимулируют репаративные процессы в патологически измененных тканях, способствуя восстановлению их нарушенной структуры [9]. Их можно отнести к группе регуляторных молекул, которые функционируют как “настройщики” органо-тканевого гомеостаза.

Согласно сходству физико-химических свойств и биологического действия биорегуляторы, выделенные из различных тканей и секретов животных, получили название мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов (МГТБ). Установлено, что в состав МГТБ входят углеводы, липиды, белки [10], за проявление биологического действия ответственны пептиды, молекулярная масса которых не превышает 6 кДа, а связанные с ними высокомолекулярные белки модулируют их активность. Между пептидами и белками-модуляторами образуется комплекс по механизму углеводов–белкового взаимодействия в присутствии ионов кальция [11]. МГТБ, выделенные из тканей животных, проявляют устойчивость к воздействию денатурирующих факторов, их вторичная структура характеризуется преобладанием  $\beta$ -структур. Показано, что в водном растворе МГТБ присутствуют в виде частиц размером 50–150 нм, причем наноразмерное состояние определяет характер их активности [4–7, 12].

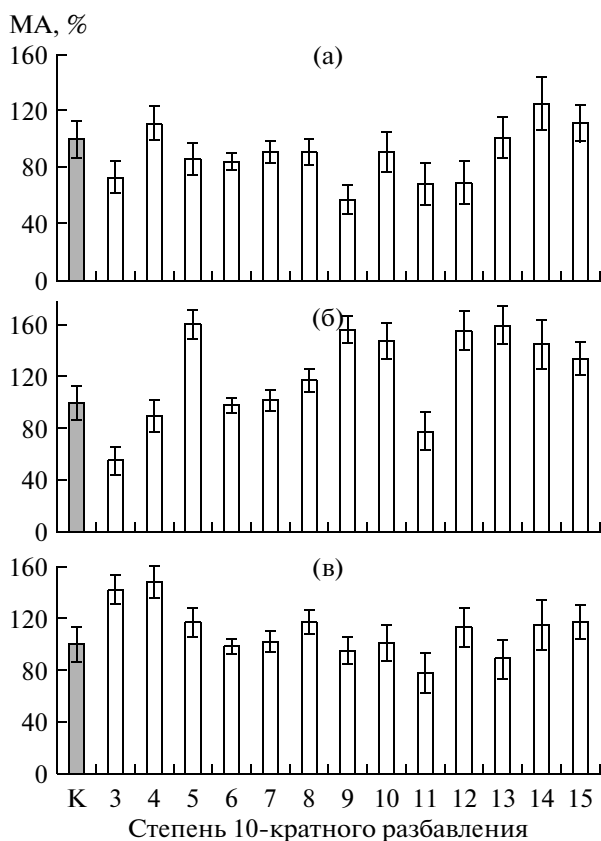
Применив экспериментальный подход, разработанный для исследования МГТБ, к изучению экстрактов растений, мы обнаружили биорегуляторы, проявляющие аналогичные МГТБ физико-химические свойства и биологическое действие. Результаты этого исследования показали, что в листьях подорожника большого (*Plantago major* L.) присутствует биорегулятор, стимулирующий в СМД ( $10^{-11}$  мг белка/мл) заживление кожной раны у мыши *in vivo* [13].

В настоящей работе предпринята попытка идентификации биорегулятора данной группы в луке репчатом (*Allium cepa* L.), который представляет собой травянистое растение семейства лилейных. Кроме широкого применения в качестве ценной пищевой культуры, лук используется как лекарственное растение: в нем содержатся эфирные масла, циклоалин, метилаллин, тиопропионал, кемпферол, производные кверцетина, органические кислоты, углеводы (глюкоза, фруктоза, мальтоза), каротиноиды, аминокислоты, витамин С, различные микроэлементы и фитонциды. Препараты лука обладают противосклеротическим, сахароснижающим, антимикробным, мочегонным, желчегонным и ранозаживляющим действием [14].

Цель работы – идентификация биорегулятора в луке репчатом путем применения экспериментального подхода, ранее разработанного для выделения и очистки МГТБ [2, 4–7], а также изучение влияния растительного биорегулятора на рост и развитие семян некоторых овощных культур.

### МЕТОДИКА

Для выделения биорегулятора был взят лук репчатый (*Allium cepa* L.), произрастающий во Влади-



**Рис. 1.** Дозовая зависимость мембранотропной активности (МА, %): а – экстракта лука (исходная концентрация 0.14 мг/мл); б – супернатанта (исходная концентрация 0.21 мг/мл); в – супернатанта после ВЭЖХ (исходная концентрация 0.03 мг/мл). К – контроль.

мирской области. В работе использовали сернокислый аммоний, нитрат аммония, нитрат калия, гидрат сульфата магния, фосфат калия, гидрат хлорида кальция, азид натрия марки х.ч., бидистиллированную воду (16 МОм). Исследование биологической активности растительного биорегулятора проводили на мышах-гибридах F1 линии C57BL/СВА, самцах весом 18–20 г, содержащихся в стандартных условиях в виварии Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

**Выделение белков.** Для экстракции белков использовали лук репчатый, предварительно нарезанный на фрагменты 3–4 см. Экстракцию проводили в растворе, содержащем  $\text{NH}_4\text{NO}_3$   $2.06 \times 10^{-2}$  М,  $\text{KNO}_3$   $1.88 \times 10^{-2}$  М,  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$   $3 \times 10^{-3}$  М,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$   $1.5 \times 10^{-3}$  М,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $1.25 \times 10^{-3}$  М, в течение 5–6 ч при 8–10°C. Растительный экстракт отфильтровывали через марлю, центрифугировали (3000 г 30 мин), осадок отбрасывали и далее не использовали. При постоянном перемешивании к растительному экстракту добавляли сухой сернокислый аммоний до образования насыщенного раствора соли

(780 г/л), поддерживая рН раствора 7.5–8.0 путем добавления раствора гидроксида аммония. Полученную белковую смесь оставляли на 95–100 ч при 4°C. Осадок белков отделяли центрифугированием (25000 г 30 мин) при 4–8°C. Полученную таким образом фракцию супернатанта и осадка диализовали против воды до полного удаления сернокислого аммония, фильтровали и затем концентрировали, используя роторный вакуумный испаритель, при 37–40°C.

**Адгезиометрический метод.** Для определения мембранотропной активности биорегулятора во фракциях на каждой стадии очистки использовали разработанный ранее для идентификации МГТБ адгезиометрический метод [2].

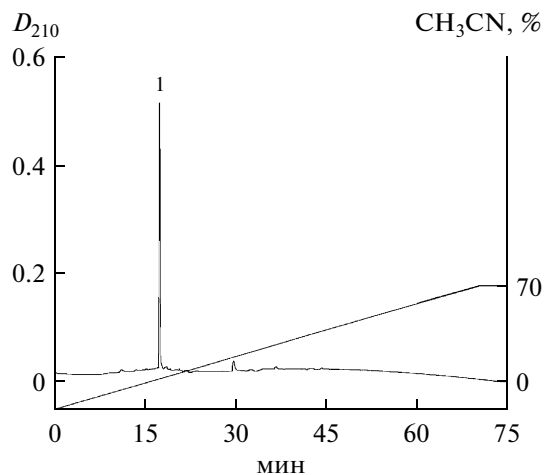
**Содержание белка.** Использовали спектрофотометрический [15] и колориметрический [16] методы.

**Хроматографическое разделение белков.** Супернатант анализировали с использованием хроматографа высокого давления (“Kontron”, США) и гидрофобной колонки (2 × 150 мм) Jupiter C<sub>5</sub> (“Phenomex”, США). Элюцию осуществляли в градиенте концентрации ацетонитрила (0–70%) в 0.1%-ной трифторуксусной кислоте (рН 2.2) со скоростью 0.3 мл/мин в течение 70 мин. Детекцию проводили при 210 нм.

**Метод динамического лазерного светорассеяния.** Исследовали гидродинамический радиус частиц в водном растворе супернатанта. Измерение проводили на приборе PhotoCor Complex (“ФотоКор”, Россия), снабженном автоматическим гониометром, псевдокорреляционной системой счета фотонов PhotoCor, одноплатным мультитимежным коррелятором реального времени PhotoCor-FC, использованном в логарифмической конфигурации (интервал времен задержки  $0.01–5 \times 10^5$  мс), и гелий-неоновым лазером Uniphase 1135P мощностью 20 мВт с длиной волны 633 нм [4–7]. Измерения проводили в интервале величин угла рассеивания 60°–120° при 23°C. Растворы, содержащие биорегулятор, предварительно очищали от пыли фильтрованием через мембраны Durapore с диаметром пор 0.45 мкм (“Millipore”, США).

**Аминокислотный анализ.** Использовали аминокислотный анализатор Hitachi 835 (Япония). Разделение продуктов гидролиза осуществляли в стандартном режиме на катионообменной колонке с последующей детекцией нингидриновых производных при 570 и 440 нм. Образцы раствора, содержащего пептид, гидролизовали 24 ч 5.7 М HCl при 110°C [17].

**Масс-спектрометрический анализ.** Анализ молекулярной массы пептида проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии с ионизацией в матрице (MALDI-TOF) на времяпролетном масс-спектрометре UltraFlex 2 (“Bruker Daltonic”, Германия). Образец для масс-спектрометрического анализа получали упариванием досуха с последующим разведением в 70%-ном ацетонитриле, содержащем 0.1%-ную трифтор-



**Рис. 2.** Разделение супернатанта экстракта лука с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Jupiter C<sub>2</sub> (2 × 150 мм). Элюцию осуществляли в градиенте концентрации ацетонитрила (0–70%) в 0.1%-ной трифторуксусной кислоте (рН 2.2) со скоростью 0.3 мл/мин в течение 70 мин. Детекцию проводили при 210 нм. Пик 1 – ВЭЖХ-фракция супернатанта лука.

уксусную кислоту. В качестве матрицы в работе использовали α-циано-4-гидроксикоричную кислоту.

**Установление С-концевой аминокислотной последовательности.** Пептид (600 пмоль) растворяли в 10 мкл натрий-цитратного буфера (50 мМ, рН 6.0), затем к данному раствору добавляли карбоксипептидазу Y (“Sigma Aldrich”, США) в соотношении фермент–пептид 1 : 50 по массе. После 1, 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 и 120 мин инкубации при 37°C отобрали аликвоты по 1 мкл, смешивали с 1.5 мкл раствора матрицы (α-циано-гидроксикоричная кислота) и наносили на плашку для дальнейшего масс-спектрометрического анализа продуктов реакции.

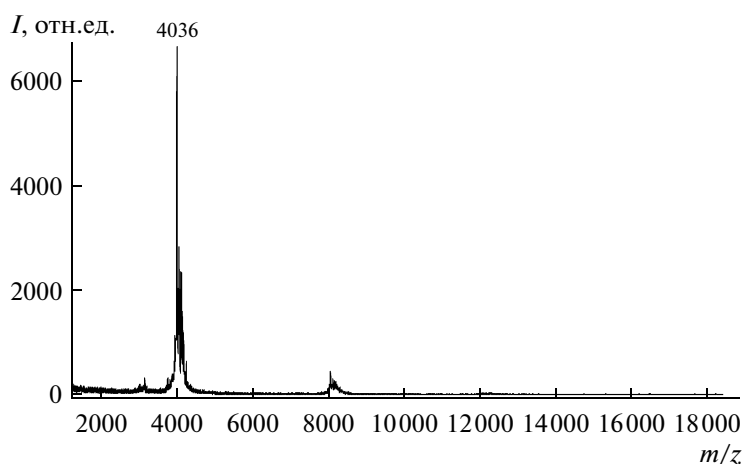
**Специфическая активность биорегулятора.** В качестве объектов исследования использовали лук (*Alli-*

*um cepa* L.), чеснок (*Allium sativum* L.), укроп (*Anethum graveolens* L.), горох (*Pisum sativum* L.), а также свеклу (*Beta vulgaris* L.) “Тавриш” (Россия). В каждом случае брали по 100 семян в контрольной и опытной серии, каждый эксперимент повторяли по 3 раза. Семена предварительно стерилизовали бидистиллированной водой при 50–55°C в течение 20 мин. Затем их помещали в чашки Петри на двойной слой фильтровальной бумаги. Опытную серию семян обрабатывали водным раствором супернатанта экстракта лука в концентрации 10<sup>-13</sup> мг белка/мл; контрольную серию семян обрабатывали аналогичным объемом воды. На 12 сут эксперимента оценивали высоту проростка (мм), массу (мг) и всхожесть семян как отношение проросших к общему количеству (%). У гороха определяли также длину корня (мм). Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования осуществляли очистку растительного биорегулятора по ранее разработанной методике [1]. Методом биотестирования было показано, что мембранотропную активность, характерную для МГТБ, проявлял только супернатант, в то время как экстракт лука не проявлял мембранотропного действия (рис. 1а, 1б).

Методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 2) было установлено, что основным компонентом супернатанта являлся полипептид, гомогенность которого была доказана масс-спектрометрическим анализом. Молекулярная масса полипептида составляла 4036 ± 2 Да (рис. 3). Аминокислотный анализ показал наличие в образце 44 аминокислотных остатков: Асп (3), Тре (2), Сер (3), Глу (6), Про (3), Гли (7), Ала (5), Вал (2), Иле (1), Лей (3), Тир (2), Фен (2), Лиз (2), Гис (1), Арг (2). Подобно другим МГТБ, по-



**Рис. 3.** MALDI-TOF -масс-спектр фракции супернатанта после ВЭЖХ. 4036 – молекулярная масса исследуемого пептида, Да.

Влияние биорегулятора, выделенного из лука, на рост и развитие семян (отличия достоверны при  $p < 0.05$ )

Объект	Биометрические параметры	Контроль	Опыт
Лук	Высота побега, мм	$8.9 \pm 0.2$	$7.8 \pm 0.2$
	Всхожесть, %	96	92
Горох	Вес корня, мг	$127 \pm 1.9$	$118 \pm 3.6$
	Всхожесть, %	89	61
Чеснок	Всхожесть, %	93	73
Укроп	Высота побега, мм	$5.2 \pm 0.2$	$4.8 \pm 0.2$
	Вес побега, мг	$10.3 \pm 0.03$	$8.9 \pm 0.03$
	Всхожесть, %	66	59

лученным ранее из тканей животных [6], изучаемый пептид также не имел остатков Цис, Мет и Три.

Используя ферментативный гидролиз карбоксипептидазой Y изучаемого пептида с последую-

щим MALDI-TOF – масс-спектрометрическим анализом реакционной смеси, была установлена его 18-членная С-концевая аминокислотная последовательность:

ГлиФенГлиГлуГлиАлаТирТреГлиАлаВалАлаАлаГлиТреГлуГлиАрг.

Сравнительный анализ полученной С-концевой аминокислотной последовательности в базе данных Uniprot (<http://www.uniprot.org>) полипептидов не выявил пептидов с аналогичной аминокислотной последовательностью.

Методом динамического лазерного светорассеяния в водном растворе супернатанта были обнаружены крупные частицы размером  $99.2 \pm 4.96$  нм; после обращенно-фазовой ВЭЖХ во фракции пептида наноразмерных частиц обнаружено не было. Следует отметить, что фракция после ВЭЖХ проявляла мембранотропную активность, но в отличие от супернатанта не в СМД, а в более высоких концентрациях, соответствующих  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  мг белка/мл (рис. 1в). Полученные результаты можно объяснить, предположив, что при обращенно-фазовой ВЭЖХ произошло отделение пептида, ответственного за активность растительного биорегулятора, от других его компонентов, взаимодействие с которыми приводило к образованию наноразмерных частиц, активных в СМД. Возможно, что представленные на рис. 1в другие фракции ВЭЖХ содержат модулятор, влияющий на активность пептида. Следует также отметить, что биорегулятор, присутствующий в экстракте лука, до осаждения белков сульфатом аммония не проявлял мембранотропного действия. Очевидно, что отсутствие активности биорегулятора связано с его взаимодействием с другими веществами экстракта. Подобное ингибирование активности биорегулятора данной группы было показано при исследовании сыворотки крови позвоночных животных [1, 11]. Поиск и идентификация модуляторов, входящих в состав растительного биорегулятора, яв-

ляется предметом наших дальнейших исследований. Данное предположение согласуется с результатами, ранее полученными при исследовании МГТБ, выделенных из тканей глаза [12]. В этом исследовании было показано, что после обращенно-фазовой ВЭЖХ пептид, ответственный за активность биорегулятора, также утрачивает способность проявлять ее в СМД. Вероятно, биорегуляторы данной группы, выделенные из тканей животных и растений, имеют сходное строение: в их состав входят биологически активные пептиды, а также вещества, влияющие на их биологическое действие.

Биорегулятор снижал некоторые биометрические параметры роста и развития семян самого лука, гороха, укропа, а также чеснока (таблица). При сопоставлении параметров контрольной и опытной серий проростков свеклы достоверных отличий выявлено не было. Данное исследование представляет собой начальный этап изучения влияния растительного биорегулятора на рост семян. На основании полученных данных довольно сложно сделать какие-либо выводы. В проведенном эксперименте нас интересовало влияние СМД, выявленных методом биотестирования для биорегулятора, на рост семян. При проведении эксперимента мы принимали во внимание существующие данные о совместимости растений при их посадке. В настоящей работе мы предприняли попытку определения влияния идентифицированного в луке нового биорегулятора в СМД на прорастивание семян ряда покрытосеменных растений.

Таким образом, в луке репчатом был обнаружен биорегулятор, по свойствам аналогичный МГТБ

животного происхождения. Установлено, что основным компонентом супернатанта экстракта лука является обладающий биологической активностью пептид, для которого была определена 18-членная C-концевая аминокислотная последовательность. Также была показана способность биорегулятора ингибировать рост и развитие семян ряда овощных культур.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 10-04-00706-а.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ямскова В.П., Резникова М.М. // Журн. общей биологии. 1991. Т. 52. № 2. С. 181–191.
2. Ямсков И.А., Ямскова В.П., Даниленко А.Н., Клеменкова З.С., Антипов Б.Г., Черников Ф.Р., Гусынина М.М., Рыбакова Е.Ю. // Рос. хим. журн. (Журн. Рос. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева). 1999. Т. 43. № 5. С. 34–39.
3. Krasnov M.S., Gurmizov V.P., Yamskova V.P., Yamskov I.A. // Biochemical Physics: Frontal Research / Ed. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Hauppauge–N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 28–37.
4. Borisenko A.V., Yamskova V.P., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V., Vecherkin V.V., Yamskov I.A. // Biochemical Physics: Frontal Research / Ed. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Hauppauge–N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 38–48.
5. Margasyuk D.V., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V., Grigoryan E.N., Yamskova V.P., Yamskov I.A. // Biochemical Physics: Frontal Research/ Ed. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Hauppauge–N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 49–56.
6. Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., Berezin B.B., Filatova A.G., Blagodatskikh I.V., Yamskov I.A. // Biochemical Physics: Frontal Research/ Ed. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Hauppauge–N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 57–67.
7. Yamskova V.P., Krasnov M.S., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., Borisenko A.V., Yamskov I.A. // Biochemical Physics: Frontal Research/ Ed. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Hauppauge–N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 71–78.
8. Nazarova P.A., Yamskova V.P., Krasnov M.S., Filatova A.G., Yamskov I.A. // New Trends in Biochemical Physics: Research/ Ed. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Hauppauge–N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 73–82.
9. Маргасюк Д.В., Краснов М.С., Ямсков И.А., Ямскова В.П. // Изв. РАН. Сер. биол. 2008. № 6. С. 736–745.
10. Назарова П.А., Краснов М.С., Ямскова В.П., Ямсков И.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 5. С. 529–533.
11. Ямскова В.П., Рыбакова Е.Ю., Виноградов А.А., Вечеркин В.В., Ямсков И.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 4. С. 407–413.
12. Ямскова В.П., Скрипникова В.С., Молявка А.А., Ильина А.П., Краснов М.С., Маргасюк Д.В., Борисенко А.В., Березин Б.Б., Кузнецова Е.С., Бурак А.К., Ямсков И.А. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 9. С. 1195–1203.
13. Краснов М.С., Ямскова В.П., Маргасюк Д.В., Куликова О.Г., Ильина А.П., Рыбакова Е.Ю., Ямсков И.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 2. С. 146–153.
14. Мазнев Н.И. Большая энциклопедия здоровья. М.: АСТ, 2008. 896 с.
15. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 544 с.
16. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. // Anal. Biochem. 1985. Т. 150. № 5. С. 76–85.
17. Laemmli U.K. // Nature. 1970. Т. 227. № 6. P. 680–682.

## Identification of a New Bioregulator Acting in Ultralow Doses in Bulb Onion (*Allium cepa* L.)

O. G. Kulikova<sup>a</sup>, V. P. Yamskova<sup>b</sup>, A. P. Il'ina<sup>a</sup>, D. V. Margasyuk<sup>a</sup>,  
A. A. Molyavka<sup>a</sup>, and I. A. Yamskov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Nesmeyanov Institute of Element-Organic Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119999 Russia  
e-mail: koulikova\_olga@mail.ru

<sup>b</sup> Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia  
e-mail: yamskova-vp@yandex.ru

Received August 23, 2010

**Abstract**—A bioregulator that has physicochemical and biological properties similar to a group of bioregulators isolated from various animal tissues has been found in the bulb onion (*Allium cepa* L.). It was determined that the biological action of the plant bioregulator is determined by a peptide with molecular weight of  $4036 \pm 2$  Da whose 18-C-terminal amino acid sequence consisted of 18 residues. On models of seed germination of some vegetable cultures, the ability of the bioregulator isolated from supernatant of onion extract in ultralow doses ( $10^{-13}$  mg of protein/ml) to inhibit growth and development was demonstrated.