

На правах рукописи



Каменев Дмитрий Геннадьевич

Исследование рекомбинантного силикатеина LoSilA1 и катепсина LoCath морской губки *Latrunculia oparinae*

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2015

Работа выполнена в лаборатории биоинженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Биолого-почвенный институт ДВО РАН

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент

Шкрыль Юрий Николаевич

Официальные оппоненты:

Долматов Игорь Юрьевич доктор биологических наук, старший научный сотрудник
ФГБУН «Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского» ДВО РАН,
заведующий лабораторией сравнительной цитологии

Балабанова Лариса Анатольевна кандидат биологических наук, ФГБУН
«Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» ДВО РАН,
старший научный сотрудник лаб. морской биохимии

Ведущая организация: Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Лимнологический институт» СО РАН, г. Иркутск

Защита состоится 10 марта 2016 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного
совета ДМ 005.003.04 на базе Биолого-почвенного института ДВО РАН по адресу: 690022,
г. Владивосток, проспект 100-лет Владивостоку, 159. Факс: (4232) 310-193

e-mail: info@biosoil.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ДВО РАН
(г. Владивосток, проспект 100-лет Владивостоку, 159, БПИ ДВО РАН) и на сайте
института www.biosoil.ru

Отзывы на автореферат в двух экземплярах с заверенными подписями просим
направлять по адресу: 690022, г. Владивосток, пр-т 100-лет Владивостоку, 159, ученому
секретарю диссертационного совета.

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, к.б.н.



Т.И. Музарок

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Сложно переоценить важность роли кремния в современном мире. Особенно востребованы новые, необычные соединения и формы кремния для применения в активно развивающихся отраслях – оптике, электронике и вычислительной технике (Kisailus et al., 2006). Однако большинство современных способов получения кремниевых наноструктур связано с использованием экстремальных температур, или сложных условий синтеза. В последнее время интенсивно изучаются свойства природных нанокремниевых структур, таких как створки диатомовых водорослей и спикулы губок (Kroger et al., 2007, 2008). Это обусловлено тем, что в биологических объектах биосиликаты определенной формы формируются в условиях окружающей среды (Kroger et al., 2009).

В настоящее время для изучения молекулярно-биологических основ формирования спикул у губок более широко используют представителей класса *Demospongia*. В конце XX века было установлено, что процесс биосилификации, ведущий к формированию спикул у губок, контролируют белки-гомологи цистеиновых протеаз, катепсинов, семейства L, относящихся к суперсемейству папаиновых протеаз (Shimizu et al., 1998). Эти белки получили название силикатеины. В ходе исследования силикатеина, было показано, что белок, как нативный, так и рекомбинантный, способен конденсировать молекулы предшественника – тетраэтоксисилана (ТЕОС), с образованием кремниевых наноструктур определенной формы в обычных условиях окружающей среды (Cha et al., 1999). Широкие возможности применения этих белков делают необходимым исследование свойств новых силикатеинов из разных видов губок. Выделение белка напрямую из спикул возможно, но получить существенное количество белка не представляется возможным, ввиду сложной процедуры добычи губок и очистки продукта. Создание экспрессионной системы на основе бактерий или растений – наиболее целесообразный подход к созданию возобновляемого и доступного источника рекомбинантного белка.

Нами был выбран вид губок *Latrunculia oparinae* принадлежащих к семейству роговых губок *Demospongia*. В качестве эукариотического организма для экспрессии рекомбинантного белка был выбран табак *Nicotiana tabacum*. Это растение является модельной системой для множества экспериментов в биотехнологии, легко подвергается генетической трансформации и легко переходит в культуру клеток. Бактерии *E.coli*. – классическая модельная система для экспрессии разнообразных рекомбинантных белков.

Целью работы являлось получение и исследование каталитических свойств рекомбинантного силикатеина LoSilA1 и катепсина LoCath морской губки *Latrunculia oparinae*

В задачи исследования входило:

1. Определить относительный уровень экспрессии генов силикатеинов и катепсина в морской губке *Latrunculia oparinae*.
2. Получить генетические конструкции, несущие гены силикатеина *LoSilA1* и катепсина *LoCath* необходимые для трансформации бактерий и клеточных культур *Nicotiana tabacum*.
3. Получить бактерии *Escherichia coli*, экспрессирующие силикатеин *LoSilA1* и катепсин *LoCath*.

4. Провести выделение рекомбинантного силикатеина LoSilA1 и катепсина LoCath, из *E. coli* и исследовать их каталитические свойства.
5. Получить стабильные трансгенные клеточные культуры и растения *N. tabacum*, экспрессирующие ген *LoSilA1*.
6. Исследовать влияние экспрессии гена *LoSilA1* в культурах *N. tabacum* на эффективность фитосинтеза наночастиц серебра.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Гены *LoSilA1* и *LoCath* являются наиболее активно экспрессирующимися формами семейства силикатеинов/катепсинов в морской губке *L. oparinae*.
2. Созданы экспрессионные генетические конструкции, содержащие ген силикатеина *LoSilA1*, ген катепсина *LoCath* и ген силикатеина *LoSilA1* слитый с *EGFP*.
3. Рекомбинантные белки - силикатеин *LoSilA1* и катепсин *LoCath*, полученные с помощью бактериальной системы экспрессии, способны формировать кристаллы оксида кремния из тетра-гидроксиэтил-ортосилана (ТГЕОС) *in vitro*.
4. Впервые получены трансгенные культуры клеток и растения *N. tabacum*, экспрессирующие ген силикатеина *LoSilA1*.
5. Установлено, что основные области локализации рекомбинантного белка *LoSilA1* в клетках *N. tabacum* – мембрана, ядро и цитоплазма устьиц.
6. Экспрессия силикатеина *LoSilA1* в трансгенных культурах клеток *N. tabacum* приводит к повышению эффективности фитосинтеза наночастиц серебра.

Научная новизна:

В результате работы впервые были получены генетические конструкции, несущие последовательность гена силикатеина *LoSilA1* слитого с GFP. Впервые была установлена внутриклеточная локализация белка силикатеина, слитого с GFP в каллусных культурах и трансгенных модельных растениях. Данные о местах накопления экспрессируемого рекомбинантного белка могут быть использованы для оптимизации методов выделения силикатеина, а также для создания эффективных культур-продуцентов. Нами впервые получены данные о формировании кристаллов оксида кремния с помощью рекомбинантного силикатеина *LoSilA1* и силикатеиноподобного катепсина *LoCath*. Ранее не было опубликовано работ, доказывающих возможность формирования отдельно-лежащих кристаллов оксида кремния с помощью рекомбинантного силикатеина.

Нами впервые был описан процесс формирования кристаллов оксида кремния с помощью силикатеиноподобного катепсина *LoCath*. Данные о способности катепсина *LoCath* формировать кристаллы кремния, подобно силикатеинам, ещё раз свидетельствуют о наличии эволюционной связи между этими белками, косвенно подтверждая существующую теорию происхождения силикатеинов (Müller et al., 2012).

Практическая значимость:

Полученные результаты вносят вклад в понимание фундаментальных процессов биосилификации и создают предпосылки для будущего использования рекомбинантных кремний-полимеризующих белков. Доказанное увеличение эффективности фитосинтеза при использовании экстрактов трансгенных культур, экспрессирующих ген силикатеина

LoSilA1 может быть использован для создания новых эффективных биотехнологических систем получения наночастиц серебра.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на XII, XIII и XV Всероссийской молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии, МЭС ТИБОХ 2009, 2010, 2014, на 15ом симпозиуме: 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (Дэгу, респ.Корея, 2012), на международной конференции: LSBE International Conference on Life Science & Biological Engineering (Осака, Япония 2013).

Личный вклад автора:

Соискателем был выполнен анализ литературных данных по теме исследования, планирование экспериментов, получена основная часть результатов, написаны статьи, подготовлены и представлены доклады на конференциях. Материал, положенный в основу диссертационной работы получен, проанализирован и обработан автором, в основном, самостоятельно.

Публикации:

По материалам работы автором опубликовано три статьи в рецензируемых журналах и шесть тезисов докладов конференций.

Структура и объём диссертации:

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 125 публикаций. Диссертация изложена на 101 странице машинописного текста, содержит 6 таблиц и 22 рисунка.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Материалы и методы исследования

1.1. Губки. В работе использовали взрослых особей губок *Latrunculia oparinae*, собранных методом драгирования в районе Курильских островов на глубине 100 м. Губки были помещены в 70% раствор спирта, для сохранения РНК в нативном состоянии.

1.2. Получение амплифицированной кДНК РНК из губок выделяли методом с гуанидинизотиоционатом (Chomczynski и Sacchi, 1987), растворяли в воде и использовали для синтеза кДНК. Синтез первой цепи кДНК проводили в соответствии со стандартным протоколом (Amersham) в объеме 20 мкл в присутствии 20 пмольТ-праймера (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30MN-3') в качестве затравки. На реакцию брали 1 мкг тотальной РНК. Полученную первую цепь кДНК амплифицировали в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 3 mM MgCl₂, dNTP (200 мкМ каждый), 1 ед. акт. Таq-полимеразы, 0,3 мкМ праймера "cap" (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') и 15 нг кДНК с предыдущей стадии (Matz et al., 1999). Амплификацию проводили на

приборе iCycler (BioRad, USA) в следующем режиме: денатурация ДНК — 95° С, 15 с, отжиг праймеров — 60° С, 15 с, синтез ДНК — 72° С, 2 мин; 20 циклов.

1.3. Получение генетических конструкций использованных в работе. Фрагменты кДНК, кодирующий активный центр силикатеина *LoSilA1* и катепсина *LoCath* были получены с помощью полимеразной цепной реакции с следующими праймерами: *SilA1-F*, 5'–AGCTGGATCCTCCTA TCCTGAGTCCGTGGACTGGAG-3' (подчёркнут сайт рестрикции *BamHI*), и *SilA1-R*, 5'–AGCTAAGCTTTTAAAGAGTAGGGTAGGAGGCATCACTAGC-3' (подчёркнут сайт рестрикции *HindIII*), *Cath-F*: 5'-AGC TGA GCT CGT CTG CCC AGA GGA AGT GGA CTG GAG GAC TAA GGG A-3' (подчёркнут сайт рестрикции *SacI*) и *Cath-R*: 5'-AGC TAA GCT TTT ATA TGG TAG TGT ACA TAG CCT TGG TTG-3' (подчёркнут сайт рестрикции *HindIII*). В качестве матрицы в каждом случае была использована тотальная кДНК. Для получения генетической конструкции *pQE80-LoSilA1* продукт ПЦР был клонирован в экспрессионный вектор *pQE80* (Qiagen, Germany) с помощью сайтов рестрикции *BamHI* (5'-конец) и *HindIII* (3'-конец), а для получения конструкции *pET-40b-LoCath* продукт ПЦР был клонирован с помощью сайтов рестрикции *SacI* (5'-конец) and *HindIII* (3'-конец). На основе полученной последовательности кДНК гена *LoSilA1* были разработаны праймеры (Таблица 1) для слияния участка кДНК *LoSilA1*, соответствующего зрелому белку, с геном *EGFP* и с последовательностью, кодирующей гистидиновый тэг. Все праймеры несут уникальные сайты рестрикции *SacI*, *BamHI*, *EcoRI*, *ApaI*. Для создания генетической конструкции, несущей ген силикатеина без модификаций мы использовали пару праймеров *253D-SacI-253R-BamHI*. Конструкции, обозначенные как *S2* и *S3*, несли ген силикатеина с гистидиновым тэгом. Для их создания мы использовали следующие пары праймеров: Для *S2*, несущего тэг на N конце, была использована комбинация *253D-SacI-253R-BamHI-6H*, а для генетической конструкции, названной *S3* – с тэгом на C конце, мы использовали пару праймеров *253D-SacI-6H -253R-BamHI*. При помощи ПЦР с использованием указанных праймеров и амплифицированной кДНК *Latrunculia oraginae* был получен участок гена нужной длины. Ампликоны были очищены путем переосаждения в этаноле и подвергнуты рестрикции ферментами *EcoRI*, *ApaI*, *SacI* и *BamHI* согласно протоколу фирмы-производителя (СибЭнзим, Россия). Кассетный вектор *pSAT6-EGFP-N1*, содержащий последовательность рекомбинантного зеленого флуоресцентного белка под контролем промотера и терминатора гена 35S субъединицы рРНК вируса мозаики цветной капусты и полилинкер, примыкающий к C-концу *EGFP*, был так же подвергнут рестрикции указанными ферментами. Рестрицированный ампликон и вектор были лигированы при помощи ДНК лигазы фага T4 по протоколу фирмы-производителя (СибЭнзим). Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *Escherichia coli* XL1Blue химическим способом с $CaCl_2$ (Маниатис и др., 1984). Отбор колоний проводили на бактериальной среде LB ($NaCl$ – 10 гр/л, пептон - 10 гр/л, дрожжевой экстракт - 5 гр/л, pH 7,5), содержащей селективный антибиотик ампициллин (50 мг/л). Для скрининга полученных колоний использовали ПЦР с соответствующими праймерами. Колонии, давшие положительный результат, были пересажены на свежие питательные среды и использованы для выделения плазмидной ДНК методом щелочного

лизиса (Маниатис и др., 1984). Для подтверждения успешности вставки, плазмиды были подвергнуты рестрикции.

Таблица 1 Используемые в работе праймеры

253D-SacI-6H	5'- TACACGAGCTCAATGCATCACCATCACCATCACTCCT ATCCTGAGTCCGTG
253R-BamHI	5'-AGCAGGGATCCCCTAAAGAGTAGGGTAGGAGG
253D-SacI	5'-GCTGAGAGCTCAATGTCCTATCCTGAGTCCGTG
253R-BamHI-6H	5'- TATAAGGATCCTCTAATGGTGATGGTGATGGTGAAGA GTAGGGTAGGAGG
253SilD-EcoRI	5'-GAT GAA TTC ATG TCC TAT CCT GAG TCC GTG
253SilR-ApaI	5'-GTT GAG GGC CCA AGA GTA GGGT AGG AGG

1.4. Получение бинарного вектора для трансформации растений. В качестве бинарного вектора использовали плазмиду pPZP-RCS2, в состав которой входят: - область T-ДНК, фланкированная 25 п.н. повторами (RB и LB); - ген устойчивости к канамицину- Npt II (неомицин-фосфотрансфераза) под контролем промотора и терминатора генов опинового синтеза (pNos и Nos 3'); - селективный маркер устойчивости к спектиномицину (SpR) и стрептомицину (StR), кодируемый транспозоном кишечной палочки (Tn7). В области T-ДНК вектора pPZP-RCS2 так же располагаются сайты рестрикции "homing" эндонуклеаз. Соответствующие сайты рестрикции фланкируют 35S промотор и терминатор в кассетном векторе pSAT6-EGFP-N1. Вектор pPZP-RCS2 и рекомбинантный вектор pSAT6-EGFP-N1, содержащий вставку гена *LoSilA1*, подвергали рестрикции при помощи "homing" эндонуклеазы PI-PspP I. Полученные фрагменты лигировали с использованием ДНК лигазы фага T4 по протоколу фирмы-производителя (СибЭнзим). Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *Escherichia coli* XL1Blue химическим способом с CaCl₂ (Маниатис и др., 1984). Отбор колоний проводили на бактериальной среде LB, содержащей селективный антибиотик спектиномицин/стрептомицин (300/200 мг/л). Для скрининга полученных колоний использовали ПЦР с праймерами 253D-EcoRI и 253R-AraI. Колонии, давшие положительный результат были пересажены на свежие питательные среды и использованы для выделения плазмидной ДНК методом щелочного лизиса (Маниатис и др., 1984). Для подтверждения успешности вставки, плазмиды были подвергнуты рестрикции. При помощи электропорации рекомбинантный вектор pPZP-RCS2 переносили в клетки агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* штамма ЕНА 105, которые в дальнейшем использовали для трансформации растений.

1.5. Растения, использованные в работе. В данной работе в качестве модельной системы использовали растения табака (*Nicotiana tabacum* L.), сорта Xanthi. Семена растения были предоставлены сотрудниками теплицы БПИ ДВО РАН и использовались для получения стерильных растений.

1.6. Среда для культивирования стерильных растений и клеточных культур. Использовали питательную среду для культивирования изолированной ткани растений, разработанную на основе среды Мурасиге и Скуга (Murashige and Skoog, 1962), следующего состава (Таблица 2).

Таблица 2 Компоненты питательной среды

Компонент	мг/л воды:
NH ₄ NO ₃	400
KNO ₃	1900
K ₂ HPO ₄	170
CaCl ₂ x 6 H ₂ O	665
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370
H ₃ BO ₄	6,2
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	22,3
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025

CoCl ₂ x 2 H ₂ O	0,025
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25
KJ	0,83
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	37,3
Мезо-инозит	100
Тиамин гидрохлорид	0,2
Никотиновая кислота	0,5
Пиридоксин гидрохлорид	0,5
Казеин гидролизат	100
Сахароза	30000
Агар	6000
Вода, дистиллированная	до 1 л

Перед автоклавированием рН среды 5,6 – 5,8 доводили при помощи КОН. Питательные среды стерилизовали в автоклаве при $t = 120^{\circ}\text{C}$ и давлении 0,8-1,0 атм. В течение 20 минут. Для регенерации растений использовали среду на основе указанной выше, но с низким содержанием сахарозы – 10 грамм на литр среды и с половинным содержанием всех макроэлементов. Для инициации регенерации использовали гормон ИМК в концентрации 1 миллиграмм на литр среды.

1.7. Получение и культивирование клеточных культур табака

1.7.1 Получение стерильных растений табака. Все манипуляции производили в ламинарном боксе, используя стерильную посуду (чашки Петри, колбы Эрленмейера) и инструменты (скальпели, пинцеты). В стерильных условиях их помещали в колбу Эрленмейера и заливали 0,2% раствором диацета (на 200 мл воды 132 мг этанолртутихлорида и 264 мг N-ацетилпиридинхлорид). Перемешивали в течение 2-3 мин. Затем раствор диацета сливали, а семена промывали в стерильной воде. Для отбора, семена центрифугировали 2 мин при 2000 г. Семена помещали в пробирки, содержащие среду 1/2W0 и проращивали при 25°C , световом режиме 16/8 (день/ночь) в течение 30 дней. Стерильные растения асептически разрезали в участках междоузлья, и помещали на свежие питательные среды каждые 30-35 суток.

1.7.2 Получение клеточных культур. Стерильные растения из пробирок переносили на чашки Петри и стерильно на экспланты по 1-2 см. Наносили микроповреждения для индукции каллуса. Экспланты помещали на питательные индуцирующие среды WB/A. Образование каллуса происходило в течение 40-50 дней при 25°C , относительной влажности воздуха 70 %, в темноте. Каллусы выращивали в колбах Эрленмейера, содержащих 50 мл среды WB/A при 25°C в темноте, с периодом субкультивации 30-35 суток.

1.8. Агробактериальная трансформация. Для трансгенного переноса использовали бактерию *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, несущую бинарную векторную систему, состоящую из плазмид:

1. pSAT-RCS2-LoSilA1+EGFP, получение которой описано выше.

2. pTiBo542, vir-хелперная плаزمида, осуществляющая перенос и встраивание Т-ДНК в геном растения. Кодировать полный состав vir-белков (a, b, g, c, d и e). Так же имеет маркер устойчивости к рифампицину и последовательность, обеспечивающую репликацию. Бактериальные культуры выращивали на агаризованной среде LB. Для избегания контаминации культур посторонними бактериями и поддержания рекомбинантных плазмид в среде были добавлены селективные антибиотики: стрептомицин (200 мг на литр среды) и спектиномицин (300 мг на литр среды). Агробактерии выращивали при 28°C в темноте в течение двух суток. Для трансформации использовали агробактерии, культивируемые в течение 12 часов при 28°C на чашках Петри с агаризованной средой LB. Стерильные растения *N. tabacum*, полученные из семян дикорастущего растения, разрезали на органы: корень, стебель и лист. Экспланты, инокулированные агробактериями, переносили на агаризованную среду WB/A. Кокультивирование проводили в темной культуральной при температуре 25°C, в темноте в течение 3 суток. Далее экспланты пересаживали на среды того же состава с добавлением антибиотика цефотаксима (“Hoechst”, Франция) до конечной концентрации 250 мг/литр среды и культивировали до исчезновения агробактериальной контаминации. В течение 2-3 недель культивирования наблюдали индукцию каллусных агрегатов в местах нанесения повреждений. Для проведения селективного отбора трансгенных клеток, экспланты или отдельные каллусные агрегаты приносили на среды WB/A, содержащие антибиотик канамицин (“Синтез”, Россия). Для пересадки использовали те каллусные агрегаты, которые имели активный рост на среде с селективным антибиотиком.

1.9. Выделение РНК. В буфер (ЦТАБ – 200 мг/10 мл., ПВП – 200 мг/10 мл., Трис 1М – 1 мл., ЭДТА 0.5 М – 500 мкл., NaCl – 1.17 г) добавляли меркаптоэтанол до 2% и подогрели до 65°C в водяной бане. 200 мг свежей ткани растирали с 1000 мкл буфера в обожженной ступке до гомогенного раствора. Смесь инкубировали в водяной бане при температуре 65°C в течение 5 мин. К смеси добавили один объем хлороформа с добавлением изоамилового спирта (24/1 Объем/объем) и перемешивали в шейкере десять минут. После этого пробирки со смесью центрифугировали при 20000 g десять минут. Верхнюю фракцию отбирали в новые пробирки и добавляли по 0.25 объема 10 М LiCl. Смесь инкубировали при температуре 4°C в течение суток, после чего осаждали центрифугированием. Осадок растворяли в 50 мкл стерильной воды, добавляли 2.5 объема 96% этанола и инкубировали 20 мин при температуре -20°C. После этого осаждали РНК и проверяли её качество методом электрофореза.

1.10. Обратная транскрипция. Реакцию обратной транскрипции проводили при помощи набора для синтеза первой цепи кДНК (Силекс) согласно протоколу производителя. Реакцию проводили в объеме 50 мкл. К 1-5 мкг РНК добавляли 0.5 мкг олиго(dT)15 праймера, стерильной воды, свободной от РНКаз, и инкубировали при +70°C 5 минут.

Затем пробирку охлаждали на льду и добавляли 5 мкл 10-кратного буфера для M-MLV, 8 мкл смеси dNTP с концентрацией 1.5 mM каждого и 1 мкл обратной транскриптазы M-MLV с концентрацией 200 ед. акт в мкл. Смесь инкубировали в течение 60 минут при +37°C. Реакцию останавливали прогреванием смеси в течение 10 минут при +70°C и охлаждали на льду. Полученные препараты кДНК непосредственно использовали для ПЦР.

1.11. Доказательство трансгенности. Для доказательства трансгенности полученных культур проводили ОТ-ПЦР реакцию со следующими парами праймеров:

pSAT-UTR 5'-TCA CCA TTT ACG AAC GAT AG-3' и 35STerm-R 5'-GAT TTG TAG AGA GAG ACT G-3';

253SilD-EcoRI 5'-GAT GAA TTC ATG TCC TAT CCT GAG TCC GTG-3' и 253SilR-ApaI 5'-GTT GAG GGC CCA AGA GTA GGGT AGG AGG-3';

- pSAT-UTR 5'-TCA CCA TTT ACG AAC GAT AG-3' и 253-5'-R2 5'-GCC ATA ACC AGT CAC CAC-3'.

Для проверки нативности кДНК использовали пару праймеров на актин табака 5'-ATG GCA GAC GGT GAG GAT ATT CA-3' и 5'-GCC TTT GCA ATC CAC ATC TG-3'.

1.12. Полимеразная цепная реакция. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 3 mM MgCl₂, dNTP (200 мкМ каждый), 1 ед. акт. Taq-полимеразы, прямой и обратный праймеры (0,25 мкМ каждый) и 1 мкл амплифицированной кДНК (разведение 1 к 40). ПЦР проводили на приборе iCycler (BioRad, USA) в следующем режиме: денатурация ДНК — 95°C, 20 с, отжиг праймеров — 50° С, 20 с, синтез ДНК — 72°C, 40 с; 30 циклов. Продукты ПЦР анализировали в 1% агарозном геле.

1.13. Секвенирование. Секвенирование проб осуществляли в ЦКП "Биотехнологии и биоинженерии" БПИ ДВО РАН при помощи набора Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer Biosystems, Foster City, USA) согласно протоколу фирмы-производителя. После очистки этанолом проводили секвенирование ДНК на ABI 310 Genetic Analyser (Perkin-Elmer Biosystems).

1.14. Детекция флуоресценции GFP методом конфокальной микроскопии. Для визуализации локализации экспрессии белка использовали инвертированный микроскоп Axiovert 200M с системой LSM-510META фирмы изготовителя Carl Zeiss. Облучение проводили аргоновым лазером при мощности 2%. Длина волны – 488 нм, длина волны испускаемого света 505-530 нм. Использовали лямбда-сканирование для исключения аутофлуоресценции.

1.15. Экстракция белков. Для выделения белков из трансгенных бактерий и культур клеток использовали систему автоматизированной двухстадийной аффинной очистки и

обессоливания гистидин- (His-) и GST-меченых белков Profinia. (Profinia protein purification system, BioRad). Для выделения был использован стандартный протокол очистки.

1.16. SELDI. Для обнаружения силикатеина в образце использовали метод лазерной десорбции/ионизации SELDI (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization) на приборе ProteinChip SELDI System изготовителя BioRad, с использованием чипов NP 20 фирмы BioRad. Для нанесения на чип использовали экстракт белков, приготовленный в фосфатном буфере с 500 mM NaH_2PO_4 двухводный и 300 mM NaCl pH 8.0. Для анализа проб использовали стандартную программу Starter Kit.

1.17. Перенос растений в почву. Для укоренения использовали слабокислую почву (pH 6.5) для комнатных растений. Растения извлекали из пробирок, отмывали корневую систему от остатков питательной среды и переносили в сильно увлажнённую почву. После семи дней культивации при температуре 25°C и искусственном освещении с фотопериодом 16/8 (день/ночь) проводили процедуру закаливания – экспонировали на открытом воздухе 1-2 часа, после чего снова помещали в условия культуральной комнаты. После трёх дней закаливания растения выращивали, поливая каждые 48 часов.

1.18. Получение и анализ наночастиц серебра. Экстракты нетрансгенной каллусной культуры табака (Nt) и культуры табака, экспрессирующей ген силикатеина (Nt-S1) смешивали с раствором AgNO_3 (ПЗЦМ-Втормет, ч.д.а.), выдерживали в течение суток при комнатной температуре и центрифугировали. Осадок промывали многократно дистиллированной водой для удаления остатков нитрата серебра. Эффективность синтеза наночастиц оценивали с помощью спектрофотометрии, по максимуму поглощения, характерному для наночастиц серебра, при длине волны - 450 нм. Полученные наночастицы серебра были исследованы при помощи методов сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), атомной силовой микроскопии (АСМ) и микрозондового анализа в центре коллективного пользования БПИ ДВО РАН.

1.19. Выделение белка из бактерий и тест каталитической активности рекомбинантного силикатеина и катепсина. Клетки бактерий были собраны с помощью центрифугирования при 5000 об/мин, в течение пяти минут при температуре 4°C. Бактериальный осадок был ресуспендирован в буфере для лизиса клеток (50 mM Трис-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM ЭДТА, 0.5% Тритон-X100, 0.1 mM ПМСФ и 1 mM ДТТ). После разрушения клеток, лизат был обработан ДНКазой и лизоцимом в течение двух часов при комнатной температуре. Очистку белка проводили методом аффинной хроматографии с помощью никелевой агарозы (Qiagen, Нидерланды). Очищенный белок был сконцентрирован с помощью ультрафильтров Amicon Ultra-4 (Millipore, Ireland). Количество белка было определено по реакции Бредфорда (Bradford 1976). Качество очистки и молекулярная масса рекомбинантного катепсина и силикатеина была проверена с помощью ДСН/ПААГ электрофореза в 12% акриламидном геле по методике Лэммли

(Laemmli 1976). Для исследования каталитической активности, рекомбинантный катепсин LoCath, рекомбинантный силикатеин LoSilA1 и бычий сывороточный альбумин в качестве контроля, (BCA) (Sigma Aldrich USA) были смешаны с равным объемом ТГЕОС (ABC R GmbH & Co. KG, Германия). Реакцию проводили при 25°C в течение 24 часов. Реакция была остановлена центрифугированием в течение 15 минут при 20000 g. Осадок был промыт этанолом и высушен для дальнейшего анализа. Фотографии наночастиц были получены с помощью сканирующего электронного микроскопа (EVO 40, Carl Zeiss SMT) в ЦКП «Биотехнология и генетическая инженерия» БПИ ДВО РАН. Наночастицы были перенесены на алюминиевые держатели образцов с адгезивной углеродной плёнкой. Изображения кристаллов были получены при напряжении 20 – 23 кВ и рабочей дистанции 5.5 – 7 мм. Элементный анализ кристаллов проводили с помощью метода энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС). ЭДС анализ был проведён с помощью Shimadzu EDX-800HS-P (Shimadzu EUROPA GmbH), с родиевой рентгеновской трубкой (напряжение 50 кВ, сила тока 100 мкА, время детекции 300 сек, задержка 20%, коллиматор 10 мм). Данные были проанализированы в программе PCEDX Shimadzu в ЦПК БПИ ДВО РАН.

2. Результаты исследования и их обсуждение

2.1 Определение уровней экспрессии силикатеина и катепсина роговой губки *L. oparinae*. Ранее нами было обнаружено несколько изоформ силикатеинов. Для определения уровней экспрессии мы использовали Real-time PCR с праймерами к каждому гену. Была определена интенсивность экспрессии каждой из изоформ гена силикатеина. Показано, что наиболее активно экспрессирующейся формой является *LoSilA1* (Рис. 1). Именно эта форма была клонирована в вектор и использована для дальнейшей работы. Определение уровней экспрессии генов необходимо для выявления наиболее важных полимеризующих белков, которые будет целесообразно использовать в работе. Мы предполагаем, что гены с максимальным уровнем экспрессии играют ключевую роль в синтезе белков, важных для полимеризации диоксида кремния.

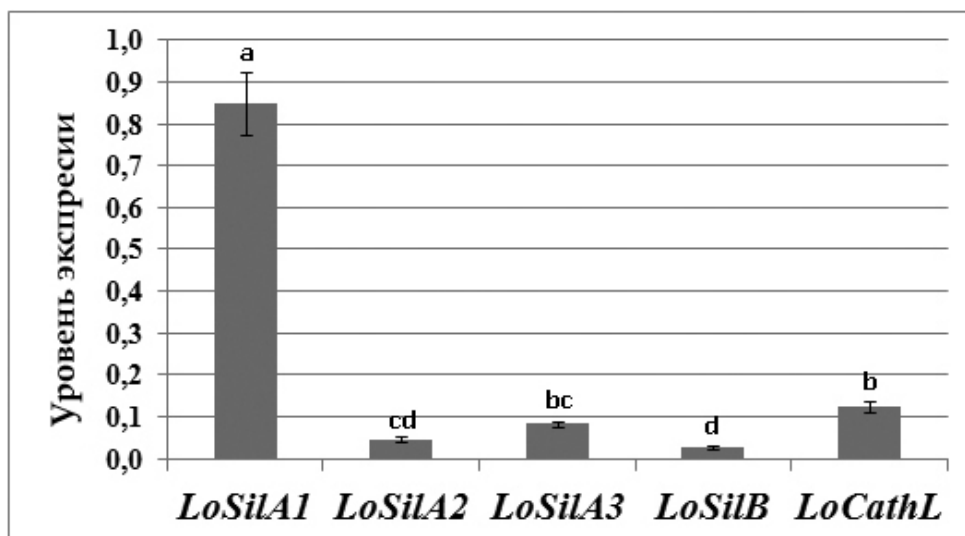


Рис. 1. Уровни экспрессии генов силикатеинов и катепсина в роговой губке *L. oparinae*.

2.2 Генетические конструкции несущие ген *LoSilA1*, *LoSilA1-GFP*, *LoCath*. В ходе работы нами были созданы четыре варианта генетических конструкций на базе вектора pQE80, содержащих рекомбинантный силикатеин *LoSilA1*. Вариант S1 для экспрессии гена силикатеина в чистом виде, вариант SG для экспрессии гена силикатеина, слитого с геном GFP, и два варианта для экспрессии силикатеина, слитого с “гистидиновым хвостом” для выделения белка –S2 и S3 с шестью а.о. гистидина на N- и C- концах, соответственно (рис. 2). Также была создана конструкция на основе вектора pET-40, несущая ген катепсина *LoCath* морской роговой губки *Latrunculia orarinae*. Ген катепсина был слит с гистидиновым тэгом для дальнейшей аффинной очистки.

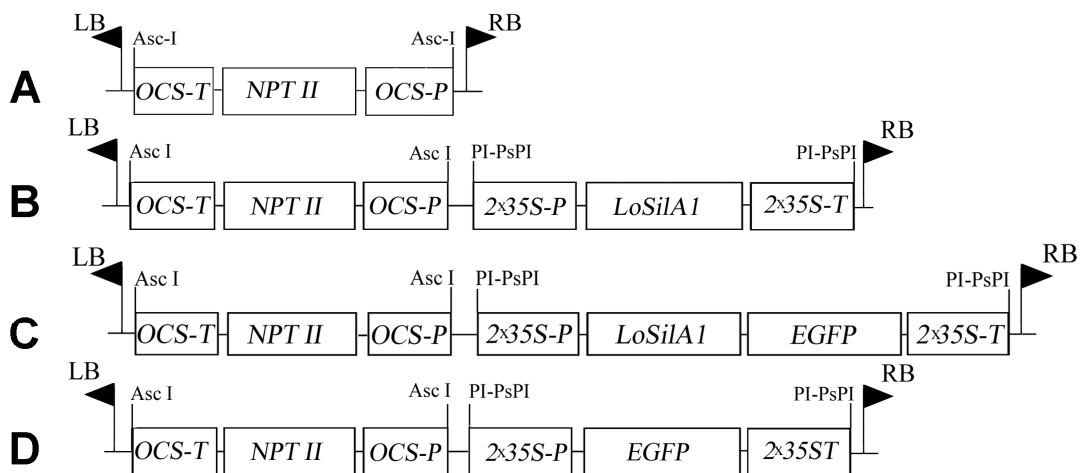


Рис. 2. Генетические конструкции, содержащие ген силикатеина.

Слева направо: А: вектор pQE-80, В – вектор pQE-80 несущий ген силикатеина *LoSilA1*, С – вектор pQE-80 несущий ген силикатеина *LoSilA1*, слитый с *GFP*, D – вектор pQE-80 несущий ген *GFP*

Используемый в данной работе ген *EGFP* имеет модифицированную кодонную структуру, обеспечивающую повышенный уровень свечения белка (Enhanced GFP) в трансгенных клетках. При этом рамка считывания задается стартовым кодоном (ATG) гена силикатеина. В процессе слияния генов рамка считывания не сбивается, что было подтверждено секвенированием участка соединения двух генов. Стоп кодон в последовательности гена силикатеина был элиминирован, окончание транскрипции обеспечивается стоп кодоном гена зеленого флуоресцентного белка (TAG). Полученный на основе такого химерного гена белок будет состоять из двух частей: на N-конце из зрелого белка силикатеина, а на C-конце из зеленого флуоресцентного белка. Такое взаимное расположение было разработано не случайно. В случае нарушения процессов транскрипции или трансляции, приводящего к неполному синтезу мРНК или биосинтеза белка, или при переносе неполной последовательности Т-ДНК, ложной флуоресценции обнаружено не будет. Тогда как при обратном расположении генов в случае такого нарушения может наблюдаться флуоресценция неполного белка, состоящего только из части GFP. Слияние с GFP или с гистидиновым тэгом не должно повлиять на активность силикатеина, т.к ранее было показано, что этот белок способен сохранять активность в

сшивке с различными белками (Curnow et al., 2005). На настоящий момент нет публикаций, описывающих создание генетической конструкции с GFP и силикатеином.

2.3 Кристаллы кремния и состав кристаллов (полимеризация кремния *in vitro*).

Рекомбинантный белок был экспрессирован в бактериях и был очищен методом «batch» никелевой аффинной хроматографии в денатурирующих условиях. Концентрированный белок после процедуры рефолдинга был протестирован *in vitro* для исследования его каталитических свойств. Для этого очищенный силикатеин и катепсин были смешаны с тетракис-ортосиликатом (ТГЕОС). После смешивания мы наблюдали различные реакции. Результаты взаимодействия растворов белка с предшественником кремния, а также краткая характеристика контрольных растворов отражены в таблице 3.

Таблица 3. Процесс формирования кристаллов кремния

	Формирование кристаллов	Примечания
Контроль 1-Вода	Нет изменений	Чистый раствор в течение 24 часов
Контроль 2-Буфер*	Нет изменений	Смесь становилась вязкой после 2 часов инкубирования, но оставалась текучей. Желирование наблюдалось после 24 часов инкубирования.
Контроль 3 - БСА + буфер*+ТГЕОС)	Триангулярные, ромбододекаэдрические кристаллы	После смешивания раствора белка и ТГЕОС наблюдали формирование белого осадка через 24 часа. Не наблюдали желирование раствора. Образовались бесформенные плёнки аморфного кремния и кристаллы.
Силикатеин (буфер*+ТГЕОС)	Гексагональные тетрагексаэдральные кристаллы	После смешивания раствора белка и ТГЕОС наблюдали немедленное формирование белого осадка. Не наблюдали желирования раствора. Образовались кристаллы.
Катепсин (буфер*+ТГЕОС)	Гексагональные, октаэдрические и β -тридимитовые кристаллы	После смешивания раствора белка и ТГЕОС наблюдали формирование белого осадка через 24 часа. Не наблюдали желирования раствора. Образовались кристаллы.

Буфер:* 25 мМ Tris-HCl, pH 6.8, GSH:GSSH (5 мМ:0.5 мМ), 0.1М NaCl

Мы обнаружили, что катепсин *LoCath* и силикатеин *LoSilA1* способны вызывать образование белого осадка в растворе ТГЕОС. При микроскопическом исследовании было обнаружено, что осадок состоит из аморфного кремния и кристаллов различной формы и размеров. Было показано, что форма и размер кристаллов зависят от концентрации предшественников и времени инкубации.

В контрольном образце мы не наблюдали образования упорядоченных структур. В качестве контроля был использован 0.1% ТГЕОС.

На фотографии видно, что чистый раствор ТГЕОС образовывал аморфные отложения и плёнки оксида кремния. Очевидно, что это вызвано неконтролируемой поликонденсацией ТГЕОС. Для получения релевантных результатов мы использовали дополнительный контрольный образец. В осадке, сформированном БСА и ТГЕОС, нами были обнаружены полигональные кристаллы и аморфные отложения оксида кремния. По данным электронной микроскопии размер кристаллов составлял от 100 нм до 1 мкм. Высокая гетерогенность форм и размеров может свидетельствовать о неферментативной природе поликонденсации кристаллов.

Также мы исследовали каталитическую активность силикатеиноподобного катепсина *LoCath*. Для теста использовали такие же концентрации фермента и предшественников, что и в случае с силикатеином (0,1 мкг/мкл катепсина и 1,17% ТГЕОС). Размер полученных кристаллов кремния варьировал от 10 до 100 мкм. В осадке нами были обнаружены два типа кристаллов – гексагональные и β -тридимитовые. Из всех исследованных нами белков силикатеин показал наибольшую способность к полимеризации ТГЕОС. При смешивании раствора силикатеина с ТГЕОС мы наблюдали мгновенное помутнение раствора и образование осадка. При исследовании осадка было обнаружено, что он преимущественно состоит из гексаоктаэдральных кристаллов от 300 до 400 нм. При сравнительном анализе кристаллов, сформированных силикатеином и катепсином, было выявлено, что кристаллы, сформированные катепсином были значительно больше, а также более гетерогенны по форме и размеру. Тот факт, что кристаллы формировались и в присутствии БСА, можно объяснить существованием неферментативного механизма реакции. Такой механизм был показан для многих лизин-богатых белков (Dickerson et al., 2008, Shiomu et al., 2005, Coradin et al., 2003). Учитывая, что октаэдральные кристаллы формировались как в контрольном, так и в экспериментальном образцах, можно сделать заключение, что эта форма связана с неферментативной поликонденсацией кремния. В то же время гексагональные and β -тридимитовые кристаллы формировались только в растворе катепсина. По данным анализа аминокислотных последовательностей *LoCath* содержит Cys в каталитической триаде Cys-His-Asn (что характерно для катепсинов), однако окружение каталитического центра более характерно для силикатеинов (Tyr-Ala-Phe). Известно, что процесс полимеризации кремния происходит по механизму нуклеофильной атаки в активном сайте, состоящем из Ser-His and Cys-His (Cha et al., 1999). Было показано, что не только каталитический центр, но и окружение играет важную роль в полимеризации кремния (Fairhead et al., 2008). Интересно, что исследуемый катепсин *LoCath* обладает большей схожестью с силикатеином *LoSilA1*, чем с другими катепсинами (Kozhemyako et al., 2010). Всё это позволяет сделать предположение, что процесс полимеризации кремния идёт в согласно принятой на сегодняшний день теории (Cha et al., 1999, Müller et al., 2013). Ранее было показано, что силикатеин может формировать α -кварцевые кристаллические структуры, которые принадлежат к семейству кристаллов гексагональной симметрии (Bawazer et al., 2012). β -тридимитовые кристаллы, сформированные катепсином также принадлежат к гексагональному семейству (Heany 1994). Всё это позволяет предполагать наличие общего

механизма полимеризации кремния в этих белках, что согласуется с существующей теорией (Ki et al., 2013). В данной работе мы впервые продемонстрировали возможность получения отдельнолежащих кристаллических структур с помощью рекомбинантного силикатеина. Ранее была описана возможность получения только аморфных отложений кремния (Bawazer et al., 2012) и друз кристаллов (Ki et al., 2013) Состав кристаллов был подтверждён с помощью метода энергодисперсионного анализа. Результаты взаимодействия белков, а также состав и форма кристаллов представлены на рисунках 3 и 4.

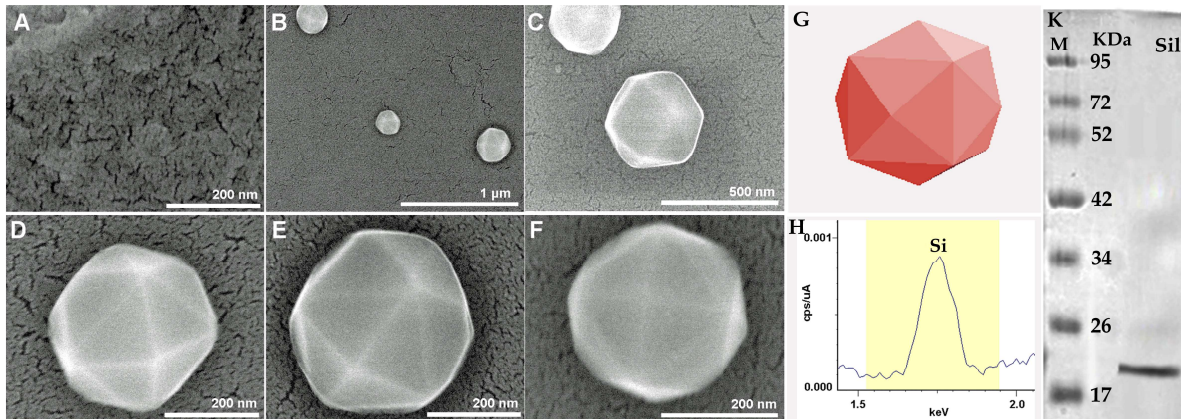


Рис. 3. Результаты взаимодействия раствора силикатеина LoSilA1 и ТГЕОС. А – контрольный образец, В-Ф – внешний вид кристаллов, С – схема кристалла, Н – EDX спектр кристалла, К – электрофореграмма очищенного рекомбинантного силикатеина.

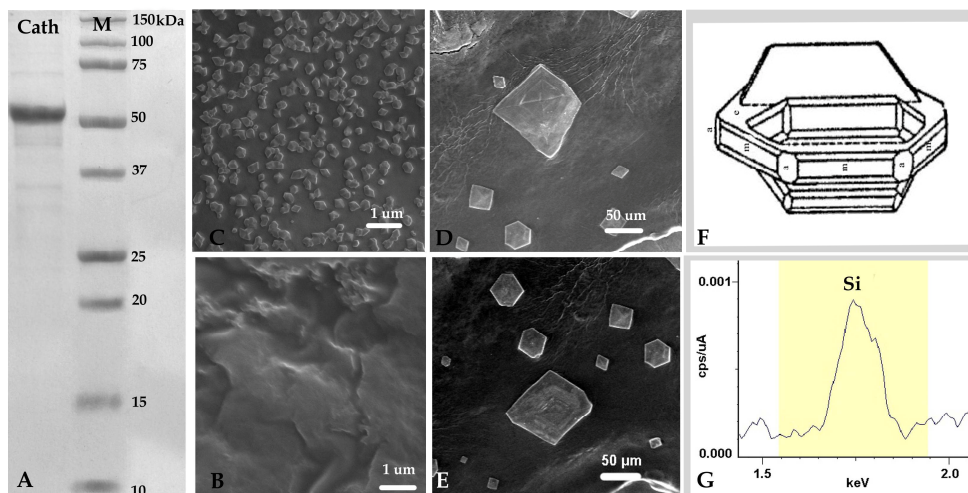


Рис. 4. Результаты взаимодействия раствора силикатеиноподобного катепсина LoCath и ТГЕОС. А – электрофореграмма очищенного рекомбинантного катепсина, В- контрольный образец, D,E – внешний вид кристаллов, F – схема кристалла, G – EDX спектр кристалла.

2.4 Получение трансгенных каллусных линий, регенерирование растений и локализация трансгенных белков методами конфокальной микроскопии. Нами был получен рекомбинантный силикатеин LoSilA1, экспрессированный в бактериях. Однако известно, что в прокариотических клетках отсутствуют посттрансляционные модификации, необходимые для созревания многих белков. Мы предполагаем, что создание трансгенной культуры обеспечит синтез белка со свойствами близкими к нативным. В клеточных культурах табака были экспрессированы: GFP (Maksimova et al., 1998), интерлейкины 2 и 4 человека (Magnuson et al., 1998, Plasson et al., 2009),

поверхностный антиген гепатита-B (Kumar *et al* 2003., Plasson *et al.*, 2009), в 2007 году Lienard с коллегами добились экспрессии антигенов пылевых клещей в суспензионной культуре клеток табака (Plasson *et al.*, 2009), в 2002 Merle была получена культура клеток табака, экспрессирующая коллаген человека (Plasson *et al.*, 2009). Всё это создаёт хорошие предпосылки для успешной экспрессии силикатеина в клетках растений.

С помощью метода агробактериальной трансформации нами были получены шесть трансгенных клеточных культур: Nt-S1 (клеточная культура, экспрессирующая “чистый” ген силикатеина *LoSilA1*), Nt-S2 и Nt-S3 (клеточные культуры, экспрессирующие ген силикатеина, слитый с “гистиридиновым хвостом” на N- и C- концах, соответственно), Nt-SG (клеточная культура, экспрессирующая ген силикатеина *LoSilA1*, слитый с геном зеленого флуоресцентного белка *EGFP*) и Nt-G (клеточная культура, трансформированная геном *EGFP*, как контроль для Nt-SG) и Nt-pPZP (культура трансформированная “пустым” вектором). Селекцию проводили на средах, содержащих антибиотик канамицин. В качестве контрольной культуры использовали нетрансформированные каллусы табака. Полученные в ходе работы контрольные и трансгенные культуры табака представляют собой рыхлую каллусную ткань светло-кремового цвета. Значимых морфологических отличий между культурами, также как и способности к спонтанному эмбриогенезу выявлено не было. Все культуры обладают стабильным ростом и минимальной изменчивостью по накоплению биомассы в течение длительного выращивания.

Исследование влияния силикатеина на растения не менее интересно, чем получение культур клеток, экспрессирующих силикатеин. Мы предполагаем, что экспрессия силикатеина в растениях может придать им дополнительную устойчивость к биотическим и абиотическим факторам. Предполагаемый механизм это может быть связан с ролью кремния, как неспецифического фактора защиты. В случае если силикатеин находится в клетке в растворимой форме, он может принимать участие в метаболизме кремния, увеличивая толерантность трансгенных растений (Kumar *et al.*, 2011). Были получены 6 линий растений, регенерированных из трансгенных культур. Все растения по внешнему виду не отличались от контрольных растений, изменений в скорости роста также не было выявлено. Для селекции растения были пересажены на среды, содержащие антибиотик канамицин. У растений, выросших на средах, содержащих антибиотик, не развивалась корневая система, а на месте разреза формировался мягкий каллус из темных клеток. Сами растения отличались от контрольной группы и имели угнетенный вид – скорость роста была сильно снижена, были заметны белые пятна на листьях, некоторые листья отмирали. Наиболее крупные и здоровые растения были отобраны для дальнейшей работы.

Методами конфокальной микроскопии впервые удалось детектировать свечение *EGFP* в трансгенных клетках и каллусах. Основные места локализации белка *LoSilA1* – мембрана клеток, ядро, и цитоплазма клеток устьица. Можно сделать предположение, что основные места накопления силикатеина в растительных клетках это мембраны и тельца включения. По результатам конфокальной микроскопии, нами не было выявлено отличий в локализации силикатеина и *GFP*. Результаты представлены на Рисунке 6.

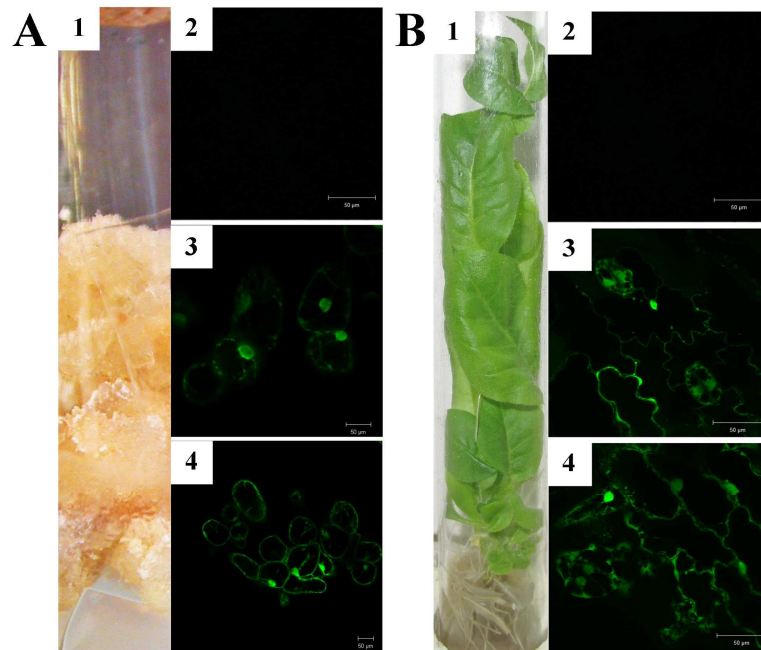


Рис.6. А1 – внешний вид каллусной культуры, В1 – внешний вид регенерированного растения. 2-4 – данные конфокальной микроскопии. 2 – контрольный образец, 3 – GFP, 4 – Sil-GFP.

2.5. Доказательство трансгенности полученных клеточных каллусных линий и растений, выделение белка LoSilA1. С помощью метода обратной транскрипции был доказан перенос гена силикатеина в растения и клеточные культуры табака. После подтверждения нативности полученной кДНК и последующей амплификации была получена электрофореграмма, доказывающая экспрессию гена (Рис. 7). Сигналы на тот же ген в контроле отсутствовали.

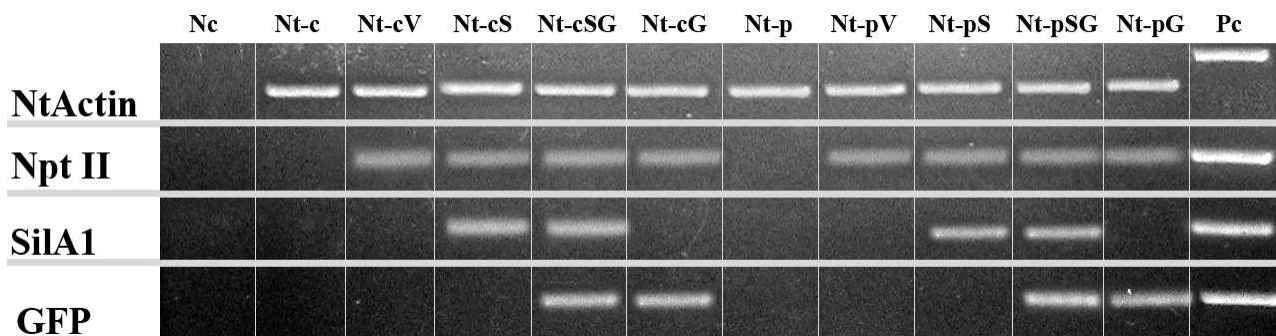


Рис. 7. Электрофореграмма амплифицированной кДНК, доказывающая трансгенность культур.

Nc: отрицательный контроль; Nt-c – Nt-cSG: кДНК выделенная из каллусов *N. tabacum*, Nt-cV (культура трансформированная пустым вектором), Nt-cS (культура трансформированная *LosiA1*), Nt-cSG (культура трансформированная *LosiA1* с *GFP*), Nt-cG (культура трансформированная *GFP*), Nt-p-Nt-pG: кДНК выделенная из растений *N. tabacum* Nt-pV (растение трансформированное пустым вектором) Nt-pS (растение трансформированное *LosiA1*), Nt-pSG (растение трансформированное *LosiA1* с *GFP*), Nt-pG (растение трансформированное *GFP*), Pc – положительный контроль.

Используя автоматизированную систему аффинной очистки Profinia (BioRad, США) и хроматографические колонки с никелевой агарозой (Ni-NTA Bio-Rad, США) был выделен рекомбинантный силикатеин из культур клеток, в нативных условиях (Рис. 8). Масса выделенного белка, равная 24.92 кДа, а также отсутствие подобных белков в контрольной пробе, свидетельствует о том, что полученные нами культуры клеток *N. tabacum* экспрессируют ген силикатеина *LoSilA1*.

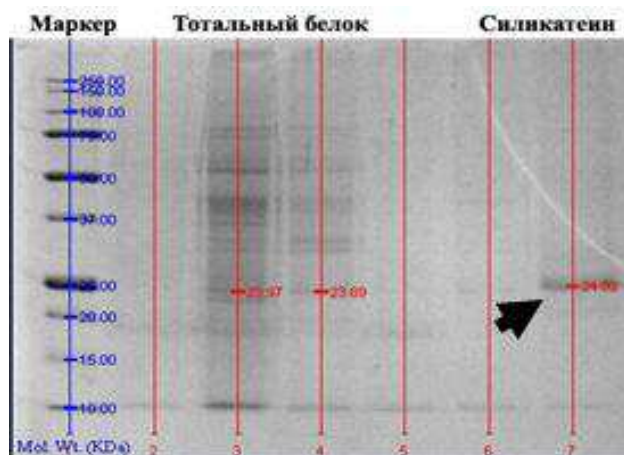


Рис. 8. Фотография электрофореза в полиакриламидном геле, белка, выделенного из культуры клеток Nt-S2. Стрелкой отмечена полоса, по молекулярной массе соответствующая силикатеину *LoSilA1*.

На настоящее время в литературных источниках нет данных о выделении рекомбинантного силикатеина *LoSilA1* морской роговой губки *Latrunculia oparinae* из эукариотической экспрессионной системы. Нами был выделен силикатеин в нативных условиях с помощью автоматизированной системы аффинной очистки Profinia. Это говорит о том, что в клетках трансгенных культур белок присутствует в растворимой форме. Несмотря на то, что экспрессия силикатеина в клетках растений была на высоком уровне, количество белка, составляло менее 1 мг/л. Это может быть вызвано действием защитных механизмов растений или быстрой деградацией белка при экстрагировании. В растениях системы, расщепляющие чужеродные белки, в настоящее время остаются слабо изученными. Однако можно предположить, что механизм их действия схож с таковым у дрожжей и бактериальных клеток (Michaud et al., 2008).

2.6. Укоренение растений. Регенерированные растения, выращиваемые *in vitro*, и экспрессирующие ген силикатеина являются существенным продвижением для создания предпосылок к использованию силикатеинов в промышленности, однако такие условия культивирования далеки от условий окружающей среды. Кроме этого, растения табака, выращиваемые на питательных средах, не успевают перейти к стадии цветения, и погибают по причине отсутствия достаточного количества питательных веществ. Важное преимущество растений, выращенных в почве – это возможность исследовать процесс наследования гена силикатеина. В случае наследования гена следующими поколениями можно говорить о стабильности трансформации. На настоящий момент нами получены растущие в почве контрольные растения табака, экспрессирующие первую изоформу гена силикатеина (*LoSilA1*) морской роговой губки *Latrunculia oparinae*, а также растения, экспрессирующие ген силикатеина, слитый с геном *EGFP* (SG). Дальнейшее изучение этих

растений, а также растений, полученных из их семян, позволит понять влияние гена силикатеина на растения. Растения были использованы для проверки устойчивости к заражению вирусами растений. Для этого мы использовали ВОМ (Вирус Огуречной Мозаики). Ранее было показано, что при стрессе растения накапливают больше кремния, т.к он является фактором неспецифической защиты от стрессов (Ma et al., 2006). В литературе (Ma et al., 2006) приводятся данные о том, что даже те виды растений, которые в норме не накапливают кремний при абиотическом или биотическом стрессе могут увеличить накопление кремния. Индукция стресса (заражение вирусом) может стимулировать накопление кремния и привести к увеличению его концентрации в клетке. Мы предполагаем, что, в свою очередь, увеличение концентрации кремния в растении может способствовать формированию кремниевых структур.

2.7. Влияние силикатеина на процессы фитосинтеза наночастиц серебра. Известно, что водные экстракты многих растений при смешивании с раствором нитрата серебра способны вызывать агрегацию и восстановление молекул металла с получением наночастиц размером от 1 до 100 нм. Полученные коллоидные растворы наночастиц серебра, как было показано, обладают уникальными бактерицидными свойствами (Gardea et al., 1999). При смешивании раствора нитрата серебра с экстрактами клеточных культур табака были получены коллоидные растворы наночастиц (Рис. 9), которые анализировали при помощи СЭМ. Растворы наночастиц, полученные с помощью трансгенной культуры имели более тёмную окраску, что обычно свидетельствует о большем количестве наночастиц в растворе.



Рис. 9. Внешний вид растворов наночастиц серебра, полученных с помощью экстрактов нетрансгенной культуры табака и культуры табака, экспрессирующей ген силикатеина. Слева направо: К – раствор нитрата серебра без добавления экстракта, Nt – экстракт не трансгенной культуры с добавлением нитрата серебра, Nt S1 – раствор нитрата серебра, смешанный с экстрактом культуры, экспрессирующей силикатеин.

Было показано, что при смешивании нитрата серебра с экстрактом трансгенных культур табака NtS1 реакция образования наночастиц идёт быстрее, чем при использовании экстрактов контрольных культур. Принимая во внимание, что точный механизм формирования наночастиц металлов с помощью экстрактов растений до сих пор остается

неизвестным (Richardson et al., 2006, Li et al., 2007, Huang et al., 2007), можно предположить, что силикатеин участвует в процессе агрегации серебра.

График, представленный на Рисунке 10, демонстрирует сравнение спектров поглощения растворов наночастиц сформированных при участии экстрактов контрольной культуры (Nt) и трансгенной культуры (S1). Из графика видно, что количество наночастиц сформированных с помощью экстракта трансгенной культуры в 3 раза больше, чем с помощью контрольной культуры табака. Ранее было показано, что силикатеин способен реагировать с солями и оксидами металлов. Это позволяет сделать предположение, что силикатеин участвует в процессе образования наночастиц серебра из раствора нитрата серебра. Кроме того, это косвенно свидетельствует о том, что силикатеин находится в растворимой форме в трансгенной клетке.

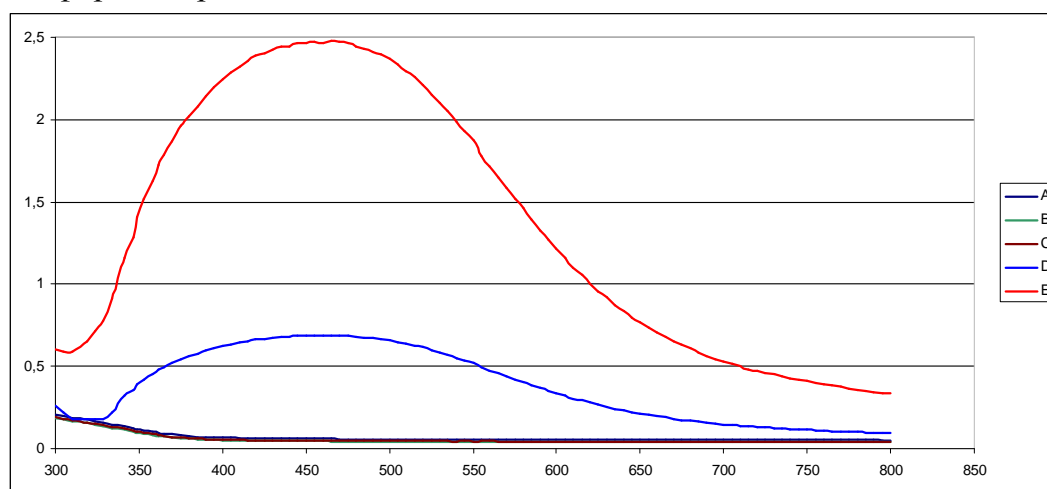


Рис. 10. Спектры растворов наночастиц сформированных с помощью Nt и S1.

A – пустая лунка планшета, B – вода, C – раствор AgNO_3 , D – Nt, E – NtS1

На рисунке 11 приведены результаты анализа частиц, полученных с экстрактами из клеток Nt и Nt-S1. Фитосинтез с применением культуры Nt приводил к образованию частиц размером около 100 нм, тогда как экстракт культуры Nt-S1 способствовал образованию более мелких частиц. Ориентировочный размер Nt-S1-сформированных частиц составил 20-30 нм; отдельная фракция наночастиц была по-прежнему представлена крупными частицами.

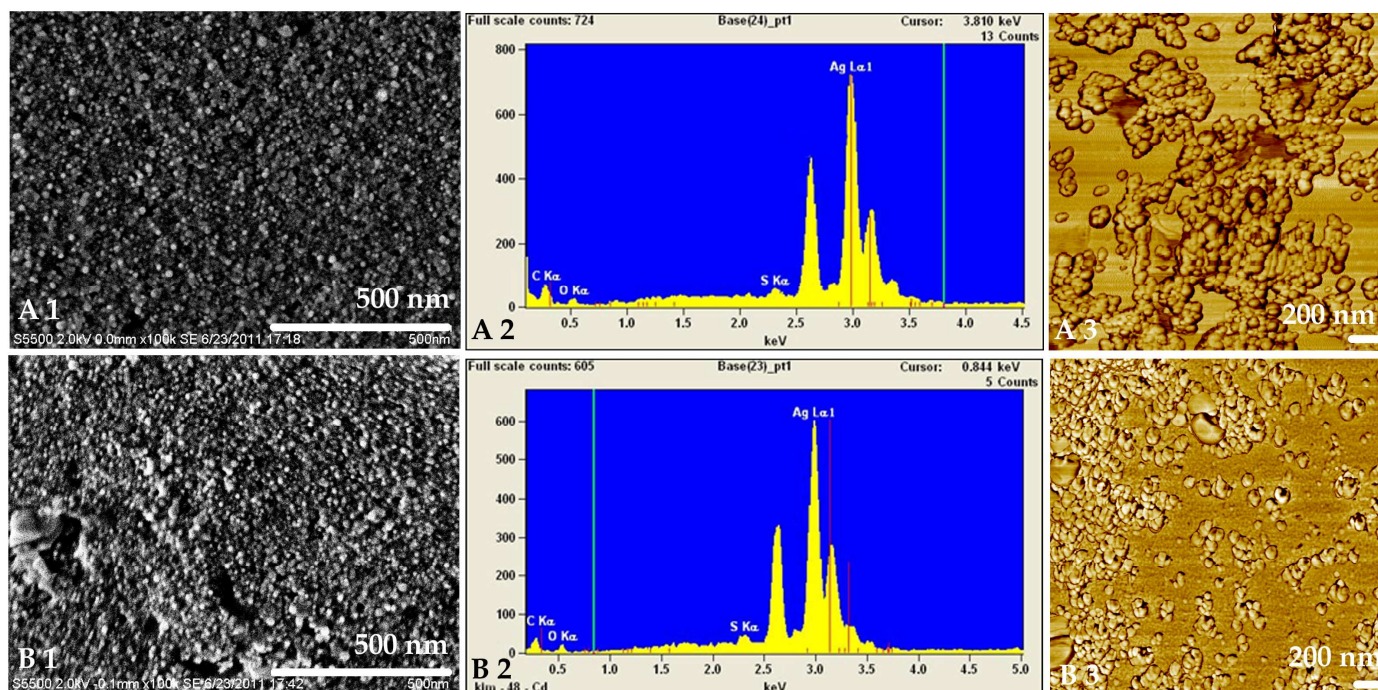


Рис. 11. Результаты анализа наночастиц серебра, полученных на основе экстрактов Nt (A) и Nt-S1 (B) 1- общий вид наночастиц, 2 – данные EDX анализа, 3 – донные АСМ исследования.

Таким образом, было показано, что экстракт трансгенной культуры табака, экспрессирующей *LoSilA1* ускоряет образование наночастиц серебра при смешивании с раствором AgNO_3 и вызывает образование более гомогенных мелких наночастиц в большем количестве, чем экстракт контрольной культуры табака. Этот факт позволяет предположить, что использование культур клеток, трансформированных геном *LoSilA1* более перспективно для дальнейшего биотехнологического использования.

Заключение. Существующие способы получения соединений на основе оксида кремния оказались слишком энергоёмки, а кроме того, очень опасны для окружающей среды. Биомиметический способ получения упорядоченных структур на основе оксида кремния привлекает всё большее внимание, активно исследуют процессы биосилификации для создания новых материалов. В начале XXI века одними из наиболее перспективных белков для полимеризации кремния был признан силикатеин, формирующий спикулы губок. Было показано, что эти структуры обладают необычными физико-химическими свойствами: хорошо пропускают свет в видимом и ближнем ИК-диапазоне спектра электромагнитного излучения, обладают повышенной гибкостью, в сравнении с промышленными кварцевыми волоконными световодами. В ходе исследования спикул и силикатеинов было показано, что белок, как выделенный из спикулы, так и рекомбинантный, способен конденсировать молекулы предшественника – тетраэтоксисилана (ТЕОС), с образованием кремниевых наноструктур определенной формы в обычных условиях окружающей среды (Cha et al., 1999). В данной работе описан процесс поиска и результаты клонирования гена силикатеина морской роговой губки

Latrunculia oparinae, создание векторов для генетической трансформации бактерий и растений, а также получение рекомбинантного белка силикатеина и результаты теста его каталитической активности. Был также изучен необычный силикатеиноподобный катепсин и сделаны предположения о происхождении и эволюции кремний-полимеризующих белков у морских губок. Нами было впервые показано, что рекомбинантный силикатеин *LoSilA1* способен формировать отдельнолежащие кристаллы кремния, также как и силикатеиноподобный катепсин *LoCath*. Примечательно, что силикатеин способствует образованию редкой и практически не встречающейся в природе тетрагексаэдральной формы кристаллов оксида кремния. В работе нами было исследовано влияние силикатеина на культуры клеток модельных растений, а также на регенерированные растения. Была доказана экспрессия силикатеина в растительных клетках, а также впервые установлена локализация рекомбинантного белка в трансгенной клетке. Ранее не было известно о локализации рекомбинантного силикатеина в трансгенной клетке. Полученные в ходе работы результаты позволяют заключить, что силикатеин может быть использован для биотехнологического использования с целью создания упорядоченных кристаллических структур оксида кремния. Кремний-полимеризующая активность катепсина также является ранее не известным свойством. Ранее была показана протеолитическая активность силикатеина, однако не было опубликовано данных о способности катепсинов формировать отдельно лежащие кристаллы оксида кремния. Результаты исследования помогут создать предпосылки для начала биотехнологического использования кремний-полимеризующих белков, а также приблизят нас к пониманию фундаментальных процессов биоминерализации и, в частности, биосилификации.

Выводы

1. Определен относительный уровень экспрессии генов силикатеинов и катепсина морской губки *L. oparinae*. Установлено, что наиболее активно экспрессирующимися формами являются *LoSilA1* и *LoCath*.
2. Созданы генетические конструкции, содержащие ген силикатеина *LoSilA1*, ген катепсина *LoCath* и ген *LoSilA1* слитый с *EGFP*. Полученные конструкции могут быть использованы для эффективной трансформации бактериальных и растительных клеток.
3. Впервые было показано, что рекомбинантный силикатеин и катепсин, выделенный из прокариотической экспрессионной системы, способен формировать отдельнолежащие кристаллы кремния *in vitro*.
4. Получены трансгенные культуры клеток и растения *N. tabacum*, экспрессирующие силикатеин *LoSilA1*. Установлено, что основные области локализации рекомбинантного белка *LoSilA1* в клетках *N. tabacum* – мембрана, ядро и цитоплазма устьиц.
5. Впервые показано, что экспрессия силикатеина *LoSilA1* в трансгенных культурах *N. tabacum* приводит к повышению эффективности фитосинтеза наночастиц серебра.

Список работ опубликованных по теме диссертации

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК МОН России

1. Kamenev D.G., Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Golotin V.A., Naryshkina N.N., Timofeeva Y.O., Kovalchuk S.N., Semiletova I.V., Bulgakov V.P. **2015**. Silicon crystals formation using

silicatei-like cathepsin of marine sponge *Latrunculia oparinae* // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. - Vol. 15. P. 10046-10049.

2. Д.Г. Каменев, Ю.Н. Шкрыль, Г.Н. Веремейчик, В.П. Булгаков. **2015**. Получение культуры клеток *Nicotiana tabacum*, экспрессирующих ген силикатеина морской роговой губки *Latrunculia oparinae* // Вестник ДВО РАН. - №. 5. Вып. 183. С. 102-105.
3. Shkryl YN, Bulgakov VP, Veremeichik GN, Kovalchuk SN, Kozhemyako VB, Kamenev DG, Semiletova IV, Timofeeva YO, Shchipunov YA, Kulchin YN. **2015**. Bioinspired enzymatic synthesis of silica nanocrystals provided by recombinant silicatein from the marine sponge *Latrunculia oparinae* // Bioprocess and Biosystems Engineering. P. DOI:10.1007/s00449-015-1488-2.

Тезисы конференций.

1. Каменев Д.Г., Веремейчик Г.Н., Шкрыль Ю.Н. **2009**. Экспрессия гена силикатеина морской губки *Latrunculia oparinae*, слитого с зеленым флуоресцентным белком в трансгенных клеточных культурах табака // XII Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии. - Владивосток. С. 32.
2. Каменев Д.Г., Веремейчик Г.Н., Шкрыль Ю.Н. **2010**. Обнаружение гена силикатеина в стеклянных губках. // Актуальные проблемы экологии, морской биологии и биотехнологии: Материалы IX региональной конф. студентов, аспирантов ВУЗов и науч. орг. ДВ. - Владивосток. С. .
3. Шкрыль Ю.Н, Веремейчик Г.Н., Горпенченко Т.Ю., Каменев Д.Г., Авраменко Т.В., Ковальчук С.Н., Кожемяко В.Б., Булгаков В.П. **2010**. Разнообразие генов силикатеинов и катепсинов в морских обыкновенных и стеклянных губках. Получение рекомбинантного белка силикатеина в растительных клеточных культурах. // Перспективные направления развития нанотехнологий в ДВО РАН. - Владивосток. Том 3. С. 110-127.
4. Шкрыль Ю.Н, Веремейчик Г.Н., Булгаков В.П., Горпенченко Т.Ю., Каменев Д.Г., Авраменко Т.В., Шедько С.В., Ковальчук С.Н., Кожемяко В.Б. **2011**. Силикатеины морских губок и возможность их получения при помощи трансгенных растений и клеточных культур // Вестник РФФИ. - №. 1. С. 35-43.
5. Shkryl Y.N., Avramenko T.V., Mashtalyar D.V., Veremeichik G.N., Kamenev D.G., Bulgakov V.P., Gnedenkov S.V., Zhuravlev Y.N. **2012**. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Lithospermum erythrorhizon* callus extract // 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition. - Daegu. P. O-S8-0069.
6. Kamenev D.G., Veremeichik G.N., Kovalchuk S.N., Shkryl Y.N., Gorpenchenko T.Y. **2012**. Production of recombinant silicatein LoSilA1 of *Latrunculia oparinae* in prokaryotic and eukaryotic expression systems // 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition. - Daegu. P. O-S8-0091.