

ІЗОФЕРМЕНТНИЙ СПЕКТР СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ КЛІТИН ГРАНУЛЬОЗИ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ З ЕКСТРАКТАМИ НАСІННЯ НАТУРАЛЬНОЇ І ТРАНСГЕННОЇ СОЇ

Н. В. Кузьміна, Д. Д. Остапів

Інститут біології тварин НААНУ

Вивчали ізоферментний спектр супероксиддисмутази клітин гранульози за присутності в середовищі культивування екстрактів натуральної та трансгенної сої. Методом електрофорезу в 10 % поліакриламідному гелі і специфічним фарбуванням виявлено від 5 до 10 смуг білків з СОД-активністю. Ізоферментний спектр СОД змінюється в процесі культивування клітин гранульози і залежить від складу середовища культивування, зокрема присутності екстрактів білків з насіння натуральної чи трансгенної сої. Спектри білків СОД клітин гранульози, культивованих протягом 3 діб з екстрактами натуральної чи трансгенної сої, відрізняються між собою за активністю окремих ізоформ. У клітинах гранульози інкубованих без додавання екстракту сої СОД-активність проявляється слабо, що свідчить про недостатню кількість білка СОД в інтактних клітинах, з одного боку, а з другого, про активацію його синтезу при інкубуванні з екстрактом насіння сої.

Супероксиддисмутаза (СОД) — фермент, який каталізує перетворення супероксиданіону в кисень і перекис водню [1]. Вказаний фермент характеризується тканинною специфічністю та існує в декількох ізоформах: цитозольна (Cu,Zn-вмісна), мітохондріальна (Mn-вмісна) та високомолекулярна позаклітинна СОД [2–4]. Крім цього, виявленні множинні ізоформи цитозольної і мітохондріальної СОД, які відрізняються між собою за електрофоретичною рухливістю, поверхневому заряду та ізоелектричній точці. У залежності від типу тканин, їх функцій та факторів, що викликають структурні модифікації білків, можуть змінюватися й ізоформи СОД [5–7].

Метою роботи було вивчити ізоферментний спектр СОД клітин гранульози при культивуванні у середовищі без білків та з додаванням екстрактів натуральної і трансгенної сої.

Матеріали і методи. Клітини гранульози отримували методом аспірації фолікулів яєчників після забою корів. Отриману суспензію клітин центрифугували 5 хв при 1,5 тис. об./хв, супернатант відділяли, а осад суспендували у адекватному, до видаленого, об'ємі середовища культивування (Basal Medium Eagle; BME; Sigma). До 1 мл суспензії клітин гранульози, вилучених з малих (до 4 мм), середніх (4–7 мм) та великих (більше 7 мм) фолікулів додавали 1 мл інкубаційного середовища BME і 1 мл 10 % екстракту насіння натуральної сої сорту Чернівецька 9 з Буковинського інституту агропромислового виробництва (дослід 1); натуральної сої сорту Чернівецька 9 з агрофірми «Мамаєвська» (дослід 2) та трансгенної сої (дослід 3). У контролі до 1 мл суспензії клітин гранульози додавали 2 мл середовища BME (контроль). Екстракт сої отримували з 1 г розтертого насіння, яке екстрагували 10 мл BME впродовж 24 год при температурі 4 °С [8]. Після екстрагування суспензію центрифугували 15 хв при 5 тис. об./хв. Для досліджень використовували надосадову рідину.

Ізоформи супероксиддисмутази виявляли після електрофорезу у 10 % ПААГ: суспензію клітин гранульози розбавляли 1:1 40 % сахарозою, вносили 0,05 мл проби у лунки концентруючого гелю (концентрація білка 50–100 мкг). Електрофорез проводили через 24 год, на другу та третю добу інкубування.

Фарбування пластин гелю для виявлення ізоформ СОД здійснювали методом Beauchamp і Fridovich [9] у нашій модифікації [10]: після електрофорезу в 10 % ПААГ пластини гелю занурювали в розчин НСТ (1,23мМ НСТ в 0,15М Na/K фосфатному буфері,

pH 7,8) на 15 хв у темряві при кімнатній температурі, після чого розчин виливали, а гель тричі промивали дистильованою водою. До ПААГ додавали інкубаційне середовище (28 мМ ТЕМЕД і 0,028 мМ рибофлавін у 0,15 М Na/K фосфатному буфері, pH 7,8) й інкубували в темряві протягом 20 хв. Після інкубування пластини гелю промивали дистильованою водою і опромінювали ультрафіолетовою лампою 7 хв для генерації супероксиданіонрадикалів рибофлавіном. У результаті фотохімічної реакції відновлення нітросинього тетразолію до нітроформаза супероксидними аніонрадикалами пластини набувають темно-фіолетового забарвлення, окрім зон з ізоформами СОД, які залишаються світлими, внаслідок перехоплення супероксиданіонрадикалів супероксиддисмутазою.

Результати та обговорення. Специфічним фарбуванням пластин гелю, після електрофорезу в 10 % ПААГ, виявлено ізоформи СОД у клітинах гранульози культивованих впродовж 24 год (рис. 1).

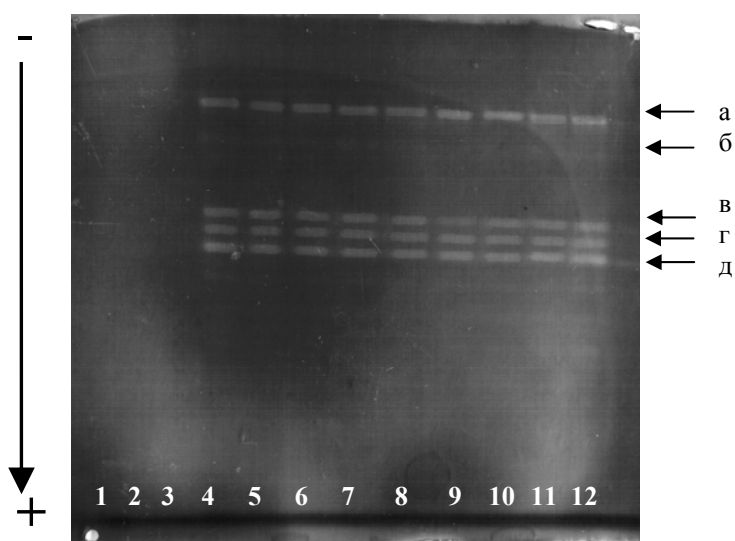


Рис. 1. Ізоформи СОД після 24 год культивування клітин гранульози (електрофорез в 10 % ПААГ; фарбування нітросинім тетразолієм): контроль (1–3 треки; клітини з малих, середніх та великих фолікулів, інкубовані без додавання екстракту сої); дослід 1 (4–6 треки; клітини інкубовані з додавання екстракту натуральної сої); дослід 2 (7–9 треки; клітини інкубовані з додавання екстракту натуральної сої); дослід 3 (10–12 треки; клітини інкубовані з додавання екстракту трансгенної сої).

На присутність ферменту вказують незафарбовані смуги — місця, де супероксиданіонрадикали були перетворені СОД у кисень і перекис водню і відновлення нітросинього тетразолію до нітроформаза не відбулося. При цьому, в клітин гранульози, які культивуються тільки у ВМЕ, ізоформи СОД проявляються слабо або ж відсутні впродовж всього періоду культивування (треки білків 1–3; рис. 1–3). Встановлена особливість, можливо, зумовлена слабкою інтенсивністю обмінних процесів у клітинах гранульози за відсутності білків у середовищі культивування, і, відповідно, пониженим синтезом (дефіцитом) СОД. У гранульозі з додаванням екстракту сої через 24 год інкубування виявлено 5 смуг білків різної інтенсивності, що вказує на неоднакову активність кожної з ізоформ ферменту.

На другу добу культивування ізоферментний спектр СОД змінився: крім п'яти основних смуг (а–д), виявлених через добу культивування, з'являються ще білки: а₀, б₁ та в₁ (рис. 2). При цьому, найбільш інтенсивно а₀-СОД-активність проявляється у культурі клітин з додаванням трансгенної сої. Зростає в процесі інкубування й кількість білка з б-СОД-активністю.

На третю добу інкубування клітин гранульози виявлено зміни спектру СОД у бік зменшення активності ізоформи а₀, втрати б- та зростання вмісту і активності б₁- та в₁-ізоформ (рис. 3). Крім цього, після фарбування проявляються ще дві мінорні смуги нижче д-ізоформи СОД, які швидко зникають.

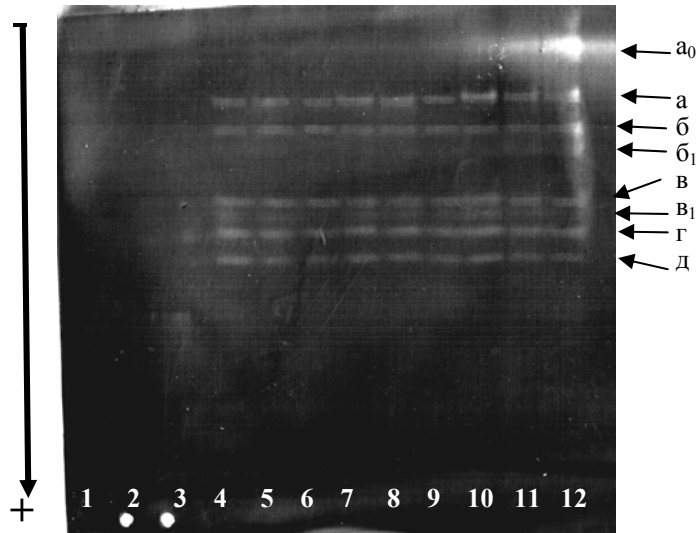


Рис. 2. Ізоформи СОД через дві доби культивування клітин гранульози (електрофорез в 10 % ПААГ; фарбування нітросинім тетразолієм): контроль (1-3 треки; клітини інкубовані без додавання екстракту сої); дослід 1 — 4-6 треки (клітини інкубовані з додавання екстракту натуральної сої); дослід 2 (7-9 треки; клітини інкубовані з додавання екстракту натуральної сої); дослід 3 (10-12 треки; клітини інкубовані з додавання екстракту трансгенної сої).

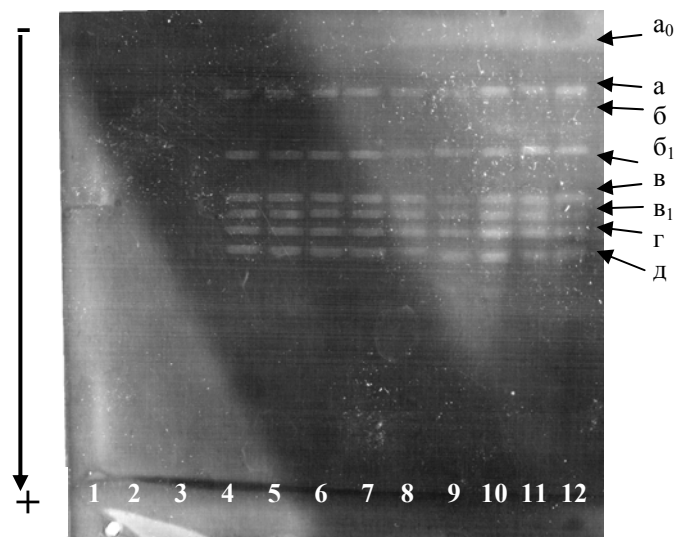


Рис. 3. Ізоформи СОД через три доби культивування клітин гранульози (електрофорез в 10 % ПААГ; фарбування нітросинім тетразолієм): контроль (1-3 треки; клітини інкубовані без додавання екстракту сої); дослід 1 (4-6 треки; клітини інкубовані з додавання екстракту натуральної сої); дослід 2 (7-9 треки; клітини інкубовані з додавання екстракту натуральної сої); дослід 3 (10-12 треки; клітини інкубовані з додавання екстракту трансгенної сої).

ВИСНОВКИ

1. Специфічним фарбуванням пластин гелю, після електрофорезу в 10 % ПААГ, виявлено ізоформи СОД у клітинах гранульози культивованих з екстрактами насіння натуральної та трансгенної сої.

2. Кількість ізоформ СОД-специфічної активності зростає зі збільшення часу культивування від 5 до 10 смуг.

3. У клітинах гранульози, культивованих без додавання екстракту сої, СОД активність проявляється слабо, що свідчить про недостатню кількість білка СОД в інтактних клітинах з одного боку, про активацію його синтезу при інкубуванні з екстрактами насіння натуральної чи трансгенної сої — з іншого.

4. Спектри білків СОД клітин гранульози, культивованих протягом 3 діб з екстрактами натуральної чи трансгенної сої, відрізняються між собою за активністю окремих ізоформ.

Перспективи подальших досліджень. Слід було б вивчити вплив екстрактів генетично-модифікованої сої на ізоферментний спектр супероксиддисмутази в клітинах організму сільськогосподарських тварин.

THE ISOENZYME SPECTRUM OF SUPEROXIDEDISMUTASE OF GRANULOSE CELLS AT CULTIVATION WITH THE EXTRACTS OF NATURAL AND TRANSGENOUS SOY SEED

H. B. Kuzmina, D. D. Ostapiv

S U M M A R Y

The isoenzyme spectrum of superoxidedismutase of granulose cells was studied at the presence of natural and transgenous soy extracts in the cultivation environment. Using the method of electropoesis in a 10 % poliacrylamide gel and specific coloring 5 to 10 bars of albumens with SOD-activity were revealed. The isoenzyme spectrum SOD changes in the process of granulose cells cultivation and depends on composition of cultivation environment, in particular, presence of extracts of albumens from the seed of natural or transgenous soy. The spectrums of the granulose SOD cells albumens cultivated during 3 days with the extracts of natural or transgenous soy, differs after activity of separate izoforms. In the cells of granoulose incubated without addition of extract of soy, SOD-activity shows up poorly, which testifies the insufficient quantity of albumen SOD in intact cells, from one side, and from the second, about activation of his synthesis during incubation with the extract of seed of soy.

ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СПЕКТР СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ КЛЕТОК ГРАНУЛЕЗЫ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С ЭКСТРАКТАМИ СЕМЯН НАТУРАЛЬНОЙ И ТРАНСГЕННОЙ СОИ

Н. В. Кузьмина, Д. Д. Остапів

А Н Н О Т А Ц И Я

Изучали исоферментный спектр супероксиддисмутазы клеток гранулезы в присутствии в среде культивирования экстрактов натуральной и трансгенной сои. Методом электрофореза в 10 % полиакриламидном геле и специфическим окрашиванием выявлено от 5 до 10 полос белков с СОД-активностью. Исоферментный спектр СОД изменяется в процессе культивирования клеток гранулезы и зависит от состава среды культивирования, в частности, в присутствия экстрактов белков из семян натуральной или трансгенной сои. Спектры белков СОД клеток гранулезы, культивированных в течении 3 суток с экстрактами натуральной или трансгенной сои, отличаются между собой по активности отдельных изоформ. У клеток гранулезы инкубированных без добавления экстрактов сои СОД-активность проявляется слабо, что свидетельствует о недостаточном количестве белка СОД в интактных клетках, с одной стороны, а с другой, об активации его синтеза при инкубировании с экстрактом семян сои.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Beauchamp C.* Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels / C. Beauchamp, I. Fridovich // *Anal. Biochem.* — 1971. — Vol. 44. — P. 276–287.
2. *Rotilio G.* Interplay of Cu, Zn superoxide dismutase and nitric oxide synthase in neurodegenerative processes / G. Rotilio, K. Aquilano, M. Ciriolo // *Life.* — 2008. — Vol. 55. — P. 629–634.
3. *Weisiger R.* Superoxide Dismutase. Organelle specificity / R. Weisiger, I. Fridovich // *The J. of Biol. Chem.* — 1973. — Vol. 248, № 10. — P. 3582–3592.
4. *Laran T.* Activation of Cu,Zn-superoxide dismutase from *Caenorhabditis elegans* does not require the copper chaperone CCS / T. Laran, J. Culotta, V. Culotta // *J. Biol. Chem.* — 2005. — Vol. 280. — P. 41373–41379.
5. *Choi J.* Oxidative modification and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases / J. Choi, H. Rees, S. Weintraub, A. Levey // *J. Biol. Chem.* — 2005. — Vol. 280. — P. 11648–11655.
6. *Pompeu G. B.* Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture / G. B. Pompeu, P. L. Gratao, V. A. Vitorello // *Scientia Agricola* — 2008. — Vol. 65, № 5. — P. 548–552.
7. *Karlsson K.* Extracellular superoxide dismutase in the vascular system of mammals / K. Karlsson, S. Marklund // *Biochem. J.* — Vol. 255. — P. 223–228.
8. *Becana M.* Isoenzymes of Superoxide Dismutase in Nodules of *Phaseolus vulgaris* L., *Pisum sativum* L., and *Vigna unguiculata* (L.) Walp / M. Becana, F. J. Paris, L. M. Sandalio // *Plant Physiol.* — 1989— Vol. 90, № 4 — P. 1286–1292.
9. *Beauchamp C.* Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels / C. Beauchamp, I. Fridovich // *Anal. Biochem.* — 1971. — Vol. 44. — P. 276–287.
10. *Кузьміна Н. В.* Активність супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази в різних органах і крові корів / Н. В. Кузьміна, Д. Д. Остапів // *Біологія тварин* — 2008. — № 12. — С. 423–429.

Рецензент: завідувач лабораторії біотехнології мікроорганізмів, кандидат біологічних наук Колісник Г. В.