

120  
332/314

Министерство образования  
Министерство внутренних дел  
Министерство здравоохранения  
Государственный таможенный комитет  
Комитет по науке и технологиям при СМ Республики Беларусь  
Концерн «Белбиофарм»  
Белорусский Государственный университет

**Молекулярно-биологические  
и физико-химические методы  
идентификации биологических объектов  
и материалов различного происхождения**

*Материалы II Республиканской научно-практической  
конференции*

Минск, 20–22 ноября 2003 г.

Минск  
2003

# РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ПАСПОРТИЗАЦИИ УНИКАЛЬНЫХ КОЛЛЕКЦИЙ РАСТЕНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА НАН БЕЛАРУСИ

Е.В.Спиридович, Л.В.Гончарова, О.В.Чижик, А.Б.Власова,  
А.В.Зубарев

Центральный Ботанический сад Национальной Академии наук Беларуси, г. Минск,  
Республика Беларусь

**Цель разработки метода и область применения.** По определению Международной Программы Ботанических садов по охране растений «ботаническими садами являются организации, имеющие документированные коллекции живых растений и использующие их для научных исследований, сохранения, демонстрации и образования» [3]. Новый уровень общения и обмена информацией между ботаническими садами и другими научными учреждениями этого профиля требует комплексного подхода к проблеме документирования коллекций, привлечение широкого круга научных и технических дисциплин, создание электронных баз данных и их информационную поддержку. Современные аналитические способы исследования специфичности биологических макромолекул позволяют на принципиально новой основе решить проблему паспортизации и идентификации генотипов, а также ряд вопросов, касающихся охраны прав собственности на селекционные достижения, сохранения и реализации созданных сортов, контроля безопасности материала (наличие вирусов) и т.п. [2]. В дополнение к традиционным подходам паспортизации на основе морфолого-физиологических признаков, успешно разрабатываются целые направления с использованием молекулярных маркеров – нуклеиновых кислот и белков (запасные белки, изо-ферменты, полиморфизм длины рестрикционных фрагментов ДНК, ПЦР сателлитной ДНК, и др.) [5]. В лаборатории биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Б наиболее широко используются белковые маркеры, благодаря относительной простоте, достаточной пропускной способности и экономичности метода. По ряду причин не все группы белков могут служить маркерами. Выбор белка-маркера и метода его биологической и генетической специфичности индивидуален для каждого вида растений и является одной из сложных биохимических задач [2]. Паспортизация коллекций растений, идентификация сортов на основе белковых маркеров складывается из следующих этапов: выращивания растительного материала, подготовки его для анализа, оптимизации методики белковой экстракции, аналитического разделения белков, документации, обработки и интерпретации полученных

результатов.

В данной работе мы представляем данные по применению белковых маркеров для паспортизации уникальной коллекции интродуцированных сортов сирени (*Syringa vulgaris*), а также новой перспективной бобовой культуры – галеги восточной (*Galega orientales Lam.*). В задачу данной работы входило установить качественный состав определенных групп белков из вегетативных органов (листьев) 12 сортов сирени и 8 сортов семян галеги, и предпринять попытку интерпретировать полученные данные в целях биологической паспортизации исследуемых сортов.

**Материалы и методы.** Для изучения белковых спектров сортов сирени и галеги нами был применен метод электрофоретического разделения белков. Для анализа сортов сирени исследовали общие и хлоропластные белки зеленых листьев стерильных растений. Растения 12 сортов сирени были введены в культуру для оздоровления, омоложения и быстрого размножения. В случае галеги изучали солерастворимые белки семян. Экстракцию тотальной фракции белков листьев проводили буфером, содержащим 0,001 М аскорбиновой кислоты, 0,0375 М трис-НСl, рН 8,8, 1% ПВП при 4°C в объемном соотношении навеска:среда=1:3 [4]. Супернатант использовали для электрофоретического разделения. Выделение хлоропластов из листового материала производили методом дифференциального центрифугирования по Гавриленко [1] с буфером, содержащим 0,225 М сахарозы, 0,05 М трис-НСl рН 7,5; 0,01 М MgCl<sub>2</sub>·(6H<sub>2</sub>O), 1% ПВП. Очистку хлоропластов производили в ступенчатом градиенте плотности сахарозы, приготовленный на 0,05М трис-НСl буфере (рН 8,0) с 0,05 ЭДТА; общую хлоропластную фракцию на мембранную и стромальную центрифугированием в течение 20 минут при 4500g.

Электрофоретическое разделение тотальных белков, стромальных и мембранных белков хлоропластов сирени и солерастворимых белков семян галеги проводили на холоду в полиакриламидных гелях (ПААГ) в щелочной системе с ДСН по методу Laemmli [7]. Для линейного электрофореза использовали 5% концентрирующий и 14% разделяющий ПААГ; для градиентного электрофореза применяли 10–20% разделяющий ПААГ. После разделения белковых фракций гели фиксировали 10% ТХУ, а затем окрашивали 0,1% Coomassie Blue R-250. Интенсивность окрашивания зон и определение молекулярных масс полипептидов оценивали с помощью компьютерной программы “SIGMA GEL” (Германия).

**Результаты и их обсуждение.** Примененный метод экстракции суммарного белка листьев сирени обеспечил полноту экстракции, минимизировал возможность протеолитической дегградации, давал стабильные препараты, обеспечивал хорошую воспроизводимость. Следует отметить, что при изоляции белка из растительной ткани возникают проблемы из-за наличия хинонов и фенолов, вызывающих

окисление белков. Для снижения действия фенолов в буфер для экстракции был добавлен аскорбат *Na* и поливинилпирролидон (1% v/w) [6].

Основная масса белка клетки (до 80%) находится в растворимой фазе. Проведенный нами электрофорез суммарных белков листьев сирени показал, что общая картина распределения полипептидов стабильна и хорошо воспроизводима, что дает основание считать полученные спектры отражающими картину гетерогенности сортов сирени. Электрофоретический анализ полипептидного состава в денатурирующих условиях показал, что белки клеточного экстракта представляют сложную группу с *Mr* от 6 до 100 кД. К преобладающим белкам можно отнести несколько групп полипептидов в зоне с *Mr* 8-20, 50-58 и 74-97 кД. Наряду с этими компонентами присутствовало множество минорных компонентов, специфичных для определенного образца. Однако выявленные профили распределения полипептидов сложны, что затрудняет интерпретацию полученных результатов и возможность использования данной фракции для сортовой идентификации.

Следующим этапом стало исследование белковых спектров стромальной и мембранной фракций хлоропластов изучаемых сортов сирени. Электрофоретический анализ полипептидного состава стромальных белков хлоропластов сирени в денатурирующих условиях показал, что полипептиды разделялись в интервале с *Mr* от 6 до 100 кД. Были обнаружены наиболее ярко выраженные группы полипептидов в зонах с *Mr* 8-20, 50-58 и 74-97 кД. Наряду с этими компонентами присутствовало множество минорных компонентов, специфичных для определенного образца. Полученные профили распределения полипептидов подвергались обработке с помощью специализированной компьютерной программы, подсчитывающей *Rf* (относительная электрофоретическая подвижность) и *Mr* (молекулярная масса) отдельных полипептидов. Полученные данные о полиморфных белковых компонентах в спектрах различных сортов представлены в таблице. Предлагается при исследовании стромальных белков хлоропластов считать номером индивидуального белка его молекулярную массу. При таком подходе появляется возможность сравнивать образцы, полученные в денатурирующих условиях, разделение которых шло на разных пластинах. Непременным условием такого подхода является разделение белков - маркеров молекулярной массы в каждом опыте. При анализе полученных данных практически у каждого сорта в полипептидном спектре были обнаружены полиморфные фрагменты.

Так, в результате электрофоретического анализа во фракции стромы хлоропластов исследованных сортов были выявлены уникальные белковые фрагменты со следующими *Mr*: для сорта Радж Капур - 17.4, 28.7, 36.4 кД; Жемчуг - 42.2, 119 и 121 кД; Нестерка - 30.2 кД. Белки с *Mr* 34.5, 73.4 и 78

кД были свойственны только сортам Радж Капур и Шолохов; исключительно сорта Лаплас и Красавица Москвы в спектрах стромальных белков хлоропластов выявляли белок с *Mr* 39.1 кД; сорт Шолохов также имел сходство с сортом Лунный свет по белку с *Mr* 19.9 кД. Исследование белковых спектров фракций хлоропластов сирени *Syringa vulgaris*, методом градиентного ДСН-электрофореза показало, что спектры стромальных белков обнаруживают четкие качественные и количественные изменения от сорта к сорту, что дает основание использовать их в целях сортовой идентификации. Денситограммы стромальных белков из хлоропластов сирени, которые позволяют оценивать экспрессию белка и сравнивать образцы между собой вместе с электрофоретическими треками внесены в компьютерную базу данных.

Таблица. Расчет относительной электрофоретической подвижности (*Rf*) и молекулярной массы (*Mr*) белков стромальной фракции хлоропластов некоторых сортов сирени

<i>Rf</i>	<i>Mr, kD</i>		Радж Капур	Жемчуг	Флора	Шолохов
	М	m				
0,94	15,6	+0,2	-	-	-	+
0,91	17,4	+0,3	+	-	-	-
0,89	18,6	+0,2	-	+	-	+
0,87	19,9	+0,2	-	-	-	+
0,81	23,7	+0,1	-	+	-	-
0,79	24,7	+0,2	-	+	-	-
0,76	26,4	+0,3	-	+	-	-
0,73	27,4	+0,07	+	+	-	-
0,71	28,7	+0,2	+	-	-	-
0,68	29,8	+0,4	-	+	+	+
0,65	31,2	+0,1	-	+	+	+
0,6	34,5	+0,3	+	-	-	+
0,58	36,4	+0,2	+	-	-	-
0,56	38,0	+0,3	+	+	-	-
0,53	39,7	+0,5	+	+	-	-
0,5	42,2	+0,2	-	+	-	-
0,46	45,6	+0,5	-	+	+	-
0,42	49,4	+0,2	-	+	-	-
0,38	53,9	+0,2	-	+	+	+
0,35	57,3	+0,2	-	+	-	-
0,32	60,9	+0,3	-	+	+	+
0,25	73,4	+0,5	+	-	-	+
0,23	77,2	+0,6	+	-	-	+
0,05	114,9	+0,2	-	+	-	-
0,03	119,0	+0,5	-	+	-	-
0,02	121,0	+0,5	-	+	-	-



**Примечание.**  $R_f$  – относительная электрофоретическая подвижность;  $M$  – среднее значение молекулярной массы, определенное в 3 независимых экспериментах;  $m$  – ошибка среднего. «+» – присутствие полипептида в спектре; «-» – отсутствие полипептида в спектре.

Электрофоретическое разделение мембранной фракции хлоропластов сирени не выявило резкого количественного и качественного полиморфизма между исследуемыми сортами. Данная группа белков является достаточно консервативной внутри вида, что подтверждается результатами проведенных нами электрофоретических исследований. Исходя из этого, мы считаем данную группу белков непригодной для поиска белковых маркеров, характеризующих сортовые особенности сирени и т.о. не пополняем полученными данными компьютерную базу данных по паспортизации коллекции сирени ЦБС.

Культура галеги восточной характеризуется высокой продуктивностью и питательной ценностью, высоким содержанием белка. Изучали качественный состав солерастворимой фракции белков 8 сортов галеги, электрофоретические спектры которых представлены на рис. 1. Для сравнительной оценки белковых спектров был выбран стандартный образец сорта Алея, содержащий максимальное количество компонентов и промаркированный белками с известными молекулярными массами. Как видно на рис.1, электрофорез белков семян сортов галеги выявил их высокую гетерогенность по составу и по интенсивности белковых полос: 40 – 45 полипептидных зон в области с  $M_r$  12 – 119 кД. Исследуемые сорта существенно отличались по уровню экспрессии отдельных белков. На рис. 2 представлены денситограммы полипептидных спектров сортов галеги, оформленные как паспорт сорта, отражающие его индивидуальные особенности. Так, сорта Алея и Полесский характеризуется интенсивной экспрессией белков, расположенных в области молекулярных масс 68, 64, 58 и 37 кД (1, 2, 3 и 4 п/п) (рис.2.). У сорта Олея, в отличие от Полесского, наблюдается усиленная экспрессия белков с  $M_r$  54, 50, 32 и 23 кД (4, 5, 7, 9 п/п) (рис. 2). У сорта Алея также обнаружена дополнительная зона с  $M_r$  20 кД, а у сорта Полесский – полипептидные зоны с  $M_r$  61, 45, 43, 32 и 28 кД, отсутствующие у сорта Алея.

**Выводы.** Применен метод белковых маркеров для паспортизации уникальных коллекций растений ЦБС. Предложенный метод требует выполнения нескольких задач:

– разработки для каждой культуры оптимальных методик фиксации материала, экстракции определенных белков, условий электрофоретического анализа, обработки данных;

– составления на основании полученных данных биологического паспорта для каждого сорта и внесение его в базу данных.

## Литература

1. Гавриленко В.Ф. и др. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание/ Под. ред. Б.А. Рубина.- М: Высшая школа,- 1975. –С. 194–200.
2. Конарев В.Г., Гаврилюк И.П., Губарева Н.К. и др. Молекулярно-биологические аспекты прикладной ботаники, генетики и селекции. – В кн.: Теоретические основы селекции.- 1993. Т. 1. М.: Колос: 447 с.
3. Международная программа ботанических садов по охране растений // Под. ред. И. Смирнова, Москва.- 2000. 576 с.
4. Сафонов В.И., Сафонова М.П. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле// В кн.: Биохимические методы в физиологии растений. – М.:Наука.- 1971. –С. 113-119.
5. Сиволап Ю.М., Календарь М.Н., Чеботарь С.В. Генетический полиморфизм злаковых растений при помощи ПЦР с произвольными праймерами.- в: Цитология и генетика,- 1994, 28:54-61.
6. Cremer F., Van de Walle C. Method for extraction of proteins from Green Plant Tissues for Two-Dimensional Polyacrilamide Gel Electrophoresis.- in: Analytical biochemistry,- 1984, 147:22-26.
7. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of Head of Bacteriophage T4.- in: Nature, -1970, -Vol.227: 89-99.

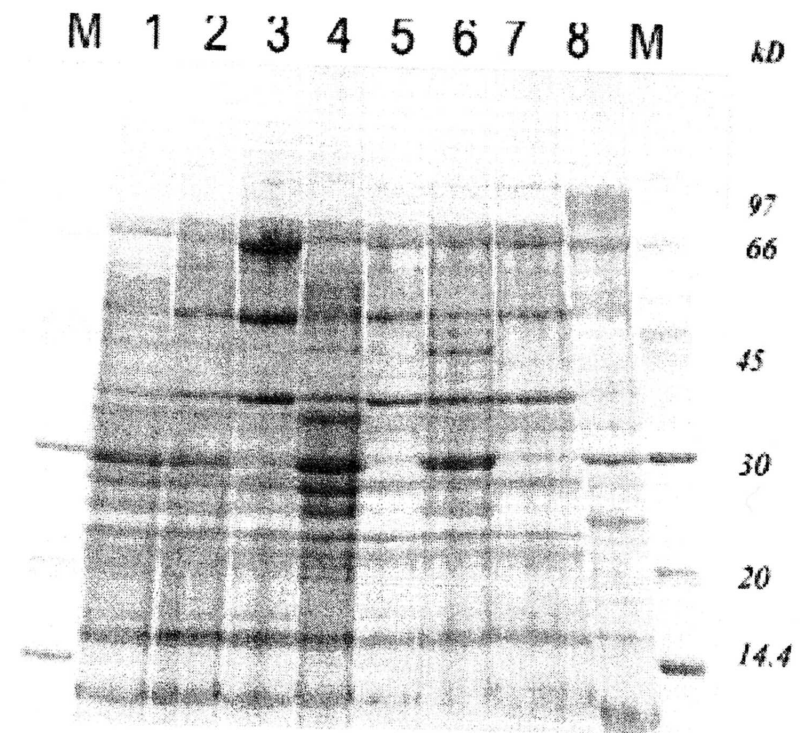


Рис. 1. SDS-гель электрофорез (10–20%) солерастворимых белков семян сортов галеги восточной. Сорта: 1– Горноалтайский; 2– Магистр; 3– Гале; 4– Ялгинский; 5– Полесский; 6– Еля-ты; 7– Донецкий; 8– Салют; М– белковый стандарт.

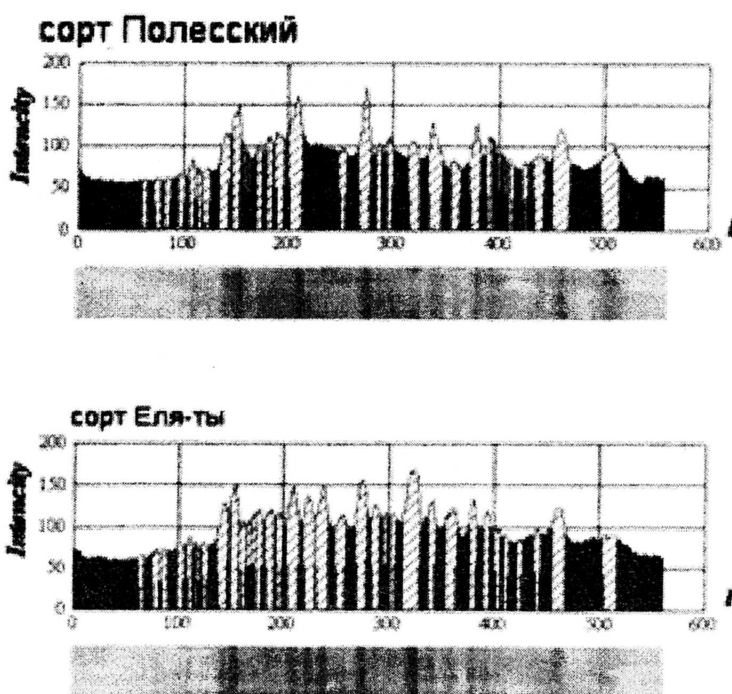


Рис. 2. Электрофоретические спектры и денситограммы солерастворимых белков семян галеги сортов Полесский и Еля-ты. Интенсивность выражена в пикселах.

## МЕТОД РЕКОНСТРУКЦИИ ГЕНОТИПА ДЛЯ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СЛЕДОВ ОТСУТСТВУЮЩИХ ЛИЦ

**И.С. Цыбовский, Н.Н.Кузуб, С.А.Котова, В.М.Веремейчик,  
Б.Ю.Вадецкий, Л.И.Кунцевич**

Научно-исследовательский институт проблем криминологии, криминалистики и судебной экспертизы Министерства юстиции Республики Беларусь

Термин "идентификация" происходит от латинского слова "identificare" (тождественный) и означает установление тождества того или иного объекта. Идентифицировать, отождествить означает решить вопрос - не является ли определенный предмет искомым. Идентификация в криминалистике отличается тем, что ее результаты используются в качестве доказательств в судах, что требует определенного процессуально установленного порядка ее осуществления и документального оформления