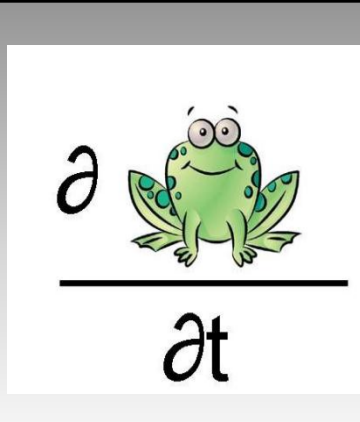




# Новый ингибитор трипсина из *Beta vulgaris*.

## Выделение и характеристика.

Возвская В., Карелина Е., Синдаловская М., Янина Е.  
Лаборатория системной биологии



## Введение

В процессе эволюции растения выработали защитные механизмы, против вредителей и патогенных микроорганизмов. Компонентами таких механизмов являются ингибиторы протеиназ.

Важной научной задачей является поиск ингибиторов трипсина с другой специфичностью. Известно, что клубни свеклы подвергаются грибковому поражению. В литературе не найдено информации об ингибиторах протеиназ, выделенных из свеклы.

## Материалы и методы

**Материалы:** свекла (*Beta vulgaris*) в качестве исследуемого образца и мука гороха (*Pisum sativa*) в качестве контроля (рис.1).



Рисунок 1. Исходные материалы

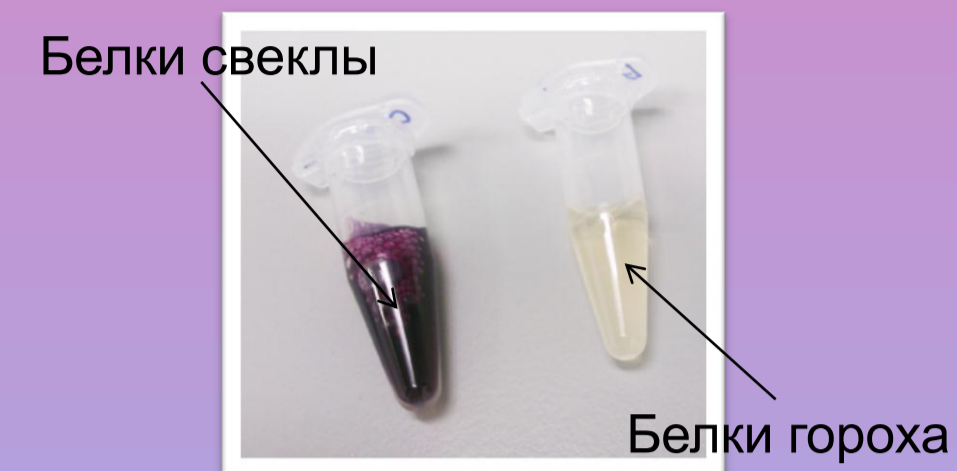


Рисунок 2. Полученные белковые смеси

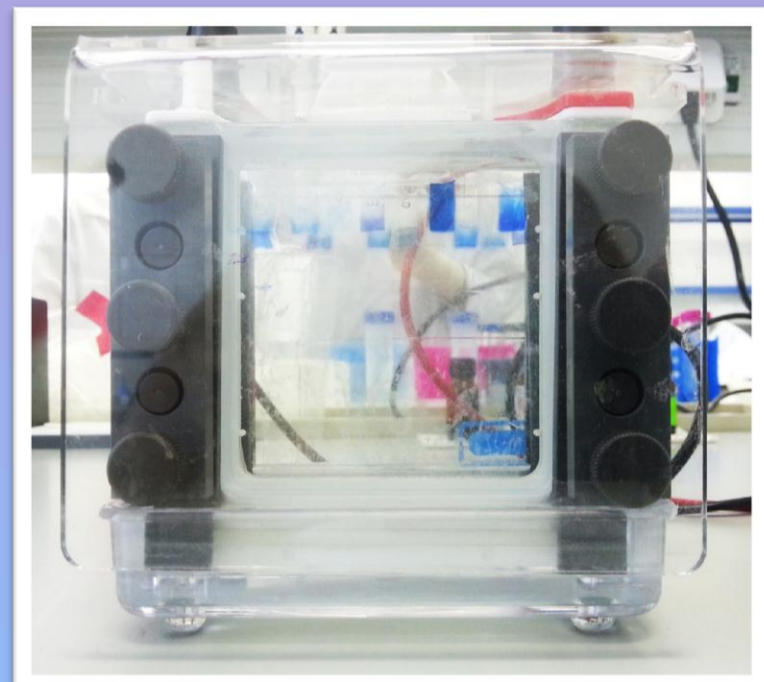


Рисунок 3. Электрофорез



Рисунок 4. TECAN sunrise

Для исследования полученных образцов использовались методы электрофореза в 12% ПААГ (рис.3), ферментативной кинетики(рис.4) и микробиологии(рис.5,рис.6):ингибирующая активность выделенных белков проверялась на *Aspergillus flavus* и *Escherichia coli*.

**Методы:** выделение белка велось путем гомогенизации объектов и последующей очистки полученных образцов методами фильтрования, центрифугирования, термообработки и доведения pH(рис.2).

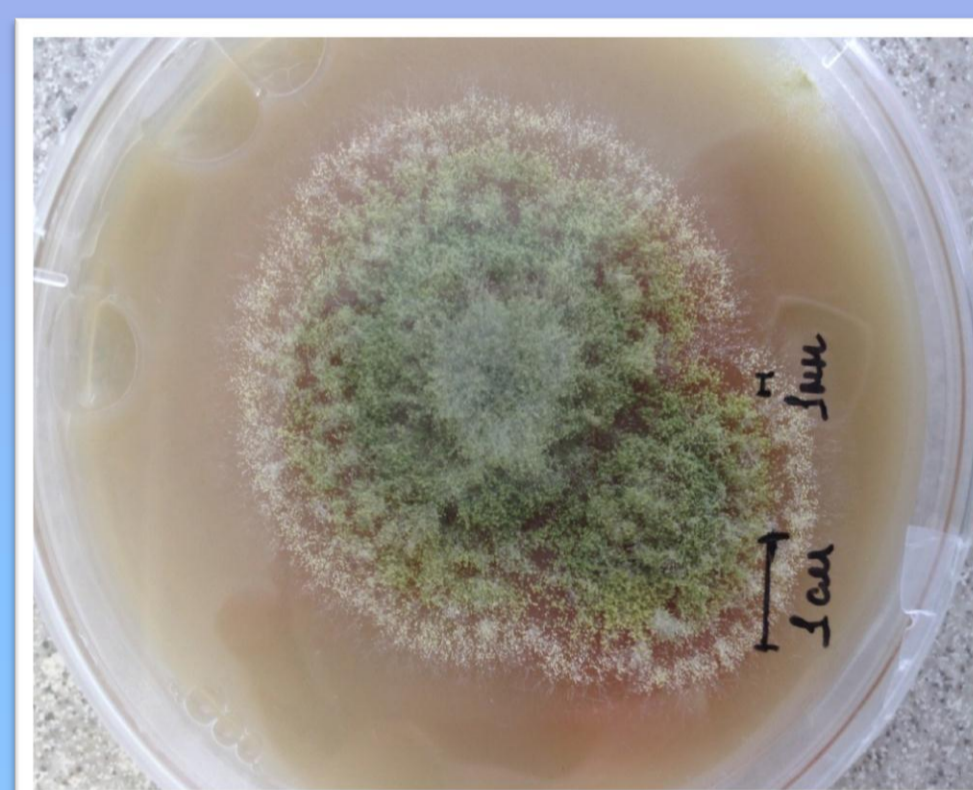


Рисунок 5. Aspergillus flavus



Рисунок 6. Escherichia coli

## Результаты

После разделения полученного препарата белков в полиакриламидном геле мы получили 7 полос для препарата гороха и 9 полос для свеклы(соответственно на одну полосу приходится 0.07 mg/ml и 0.03 mg/ml).На геле в образце гороха мы увидели мажорные полосы в районе 15-20 кДа. Из литературы известно, что молекулярный вес ингибиторов трипсина гороха лежит в пределах 8-19,5 кДа[1]. Таким образом мы наблюдаем полосы ингибиторов в геле(рис.8).

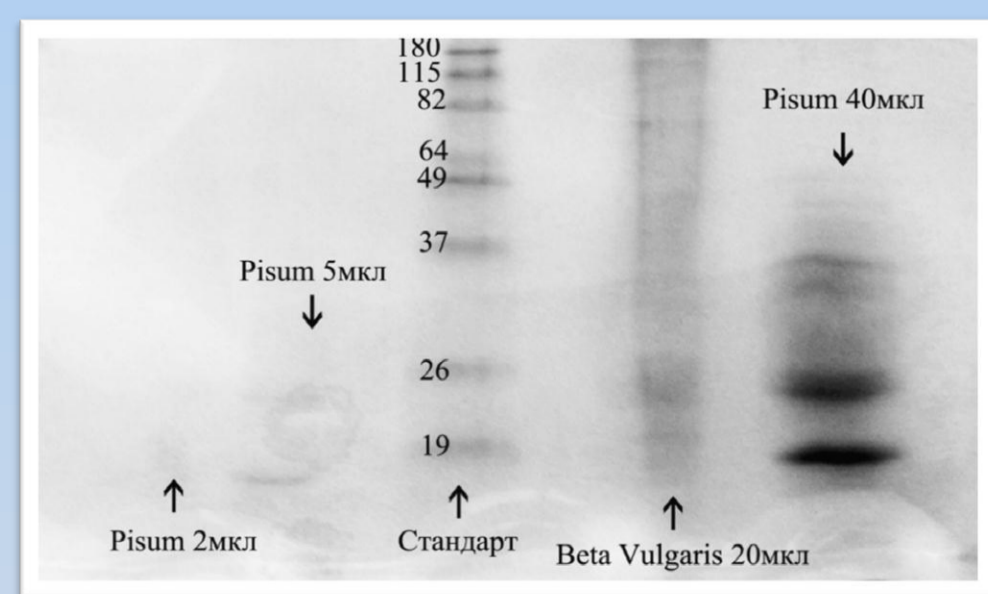
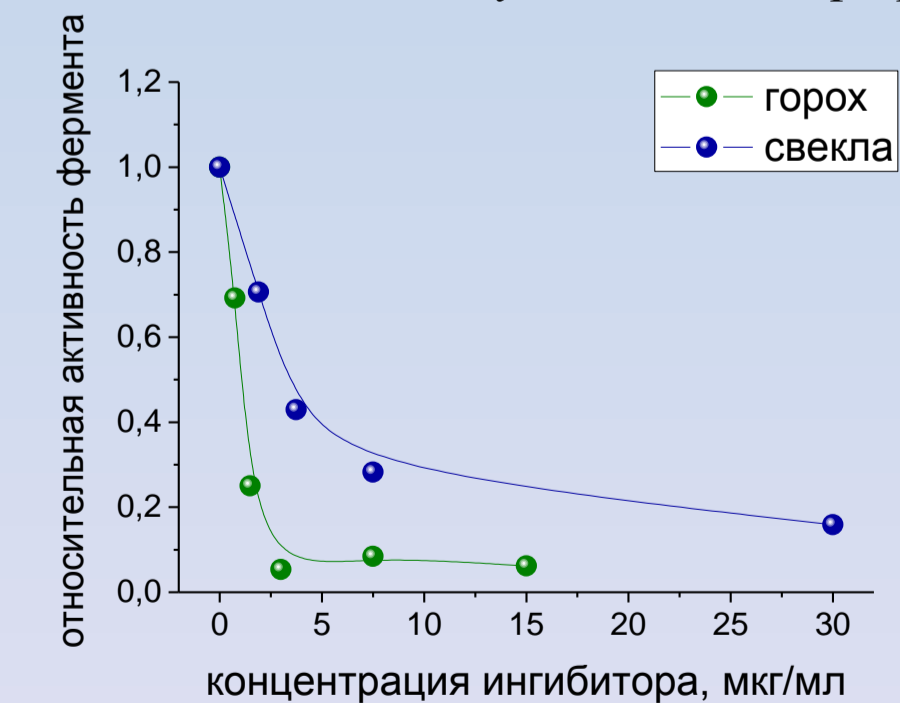
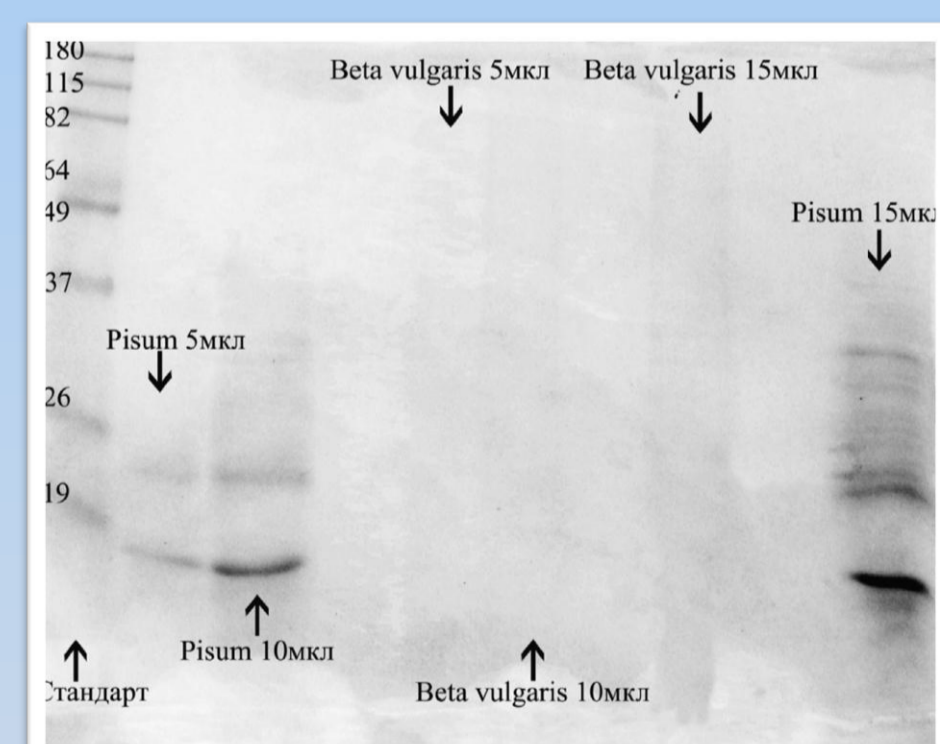


Рисунок 8. Электрофорез белковой смеси *Pisum sativa* и *Beta vulgaris*.



С помощью методов ферментативной кинетики мы выяснили, что ингибиторная активность концентрационно зависима(рис.9) Выяснилось, что ингибирующая активность свеклы ниже, чем у гороха(рис.10).

Рисунок 10. Зависимость активности фермента от концентрации ингибитора.

Мы не увидели ингибирующей активности препаратов белка в тесте подавления роста *Escherichia coli* и *Aspergillus flavus*.

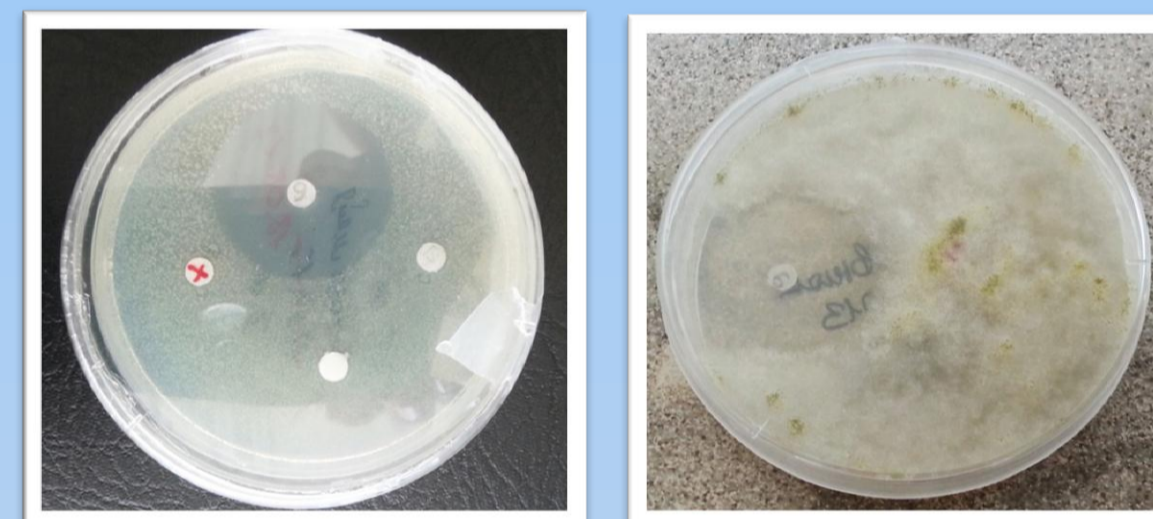


Рисунок 7. Эксперимент проверки чувствительности *E.coli* и *A. flavus*

Положительным контролем для *Escherichia coli* являлось 250µg ампицилина. Отрицательным контролем являлась Luria-Bertani.

Положительным контролем для *Aspergillus flavus* являлся 50 ng клотримазола. Отрицательным контролем являлась Luria-Bertani( рис.7).

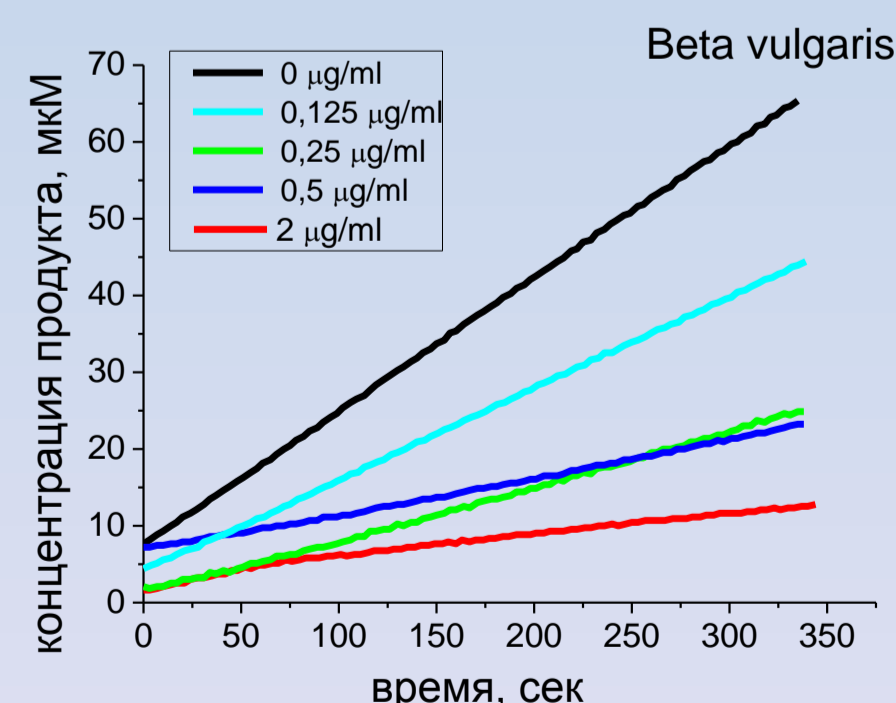
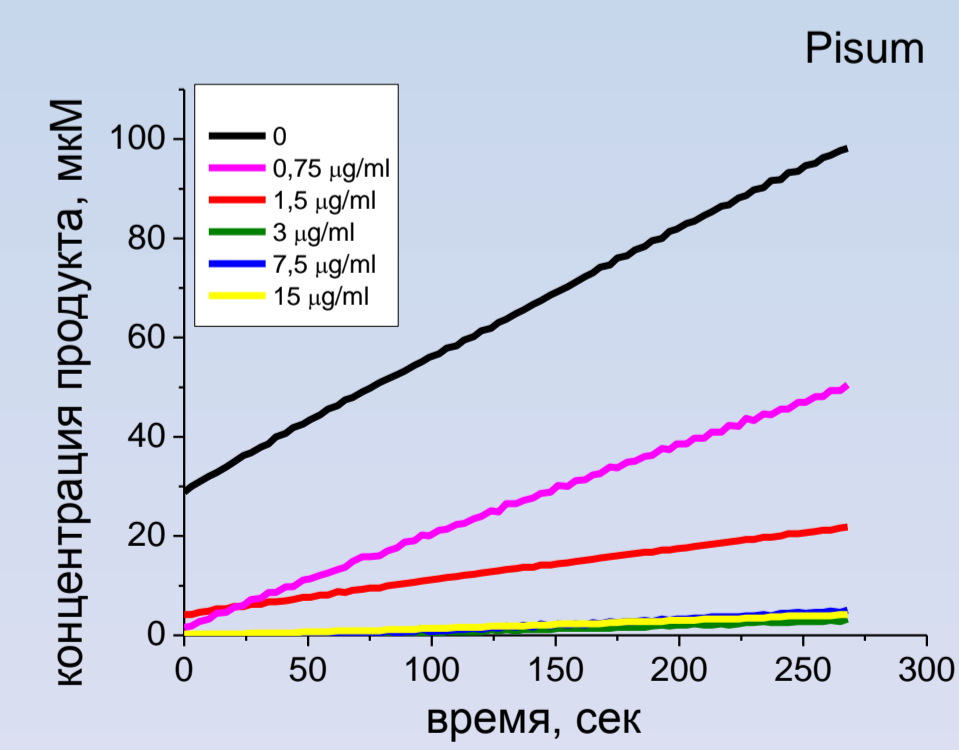


Рисунок 9. Концентрационная зависимость наработки продукта от времени



## Выводы

- 1) Нами получены смеси белков из *Pisum* и *Beta vulgaris* с концентрациями 3 mg/ml и 0,6 mg/ml соответственно, которые содержат ингибиторы трипсина.
- 2) Данные ингибиторы инактивируют трипсин в ноль.  
 $IC_{50}$  (*Pisum sativa*)=0,14 mg/ml;  $IC_{50}$  (*Beta vulgaris*)=0,37 mg/ml.
- 3) Полученные белки в данных концентрациях ( $C_{Pisum sativa}$  =3 mg/ml;  $C_{Beta vulgaris}$  =0,6 mg/ml) не влияют на рост *Escherichia coli* и *Aspergillus flavus*.

[1] Aluko RE et al. J AOAC Int. 2008