

УДК 581.1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕКТИНОВОЙ АКТИВНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОК МИКРОВОДОРОСЛЕЙ В КАЧЕСТВЕ ТЕСТ-ОБЪЕКТА – МЕТОД АЛЬГОАГГЛЮТИНАЦИИ

© 1993 г. Т. Н. Фалькович, Н. А. Пронина, В. Е. Семененко

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева
Российской академии наук, Москва

Поступила в редакцию 16.07.92 г.

Проведен скрининг различных микроводорослей с целью выяснения возможности использования их в качестве тест-объектов для определения лектиновой активности. На примере реакции с конканавалином А показано, что достаточно высокой способностью к агглютинации при взаимодействии с лектином обладают клетки мутанта *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15, не имеющего клеточной стенки. Агглютинация клеток *Chlorella vulgaris* и *Dunaliella salina* в присутствии лектина не была установлена. Сравнение гем- и альгоагглютинации обнаружило достаточно высокую чувствительность метода альгоагглютинации, что позволяет упростить методику тестирования лектинов, а также расширяет возможности поиска новых лектинов, выявление которых с помощью традиционных методов определения может быть затруднено отсутствием в эритроцитах (или других объектах животного происхождения) углеводсвязывающих участков, специфичных к лектинам растительного происхождения.

Лектины – Chlamydomonas reinhardtii CW-15 – тест-объект – альгоагглютинация.

Лектины – специфические углеводсвязывающие белки неимунной природы, которые вызывают агглютинацию клеток и/или преципитацию гликоконъюгатов [1]. Интерес к этому классу соединений обусловлен их участием в физико-химических процессах, которые лежат в основе межклеточных контактов, узнавания и самосборки биологических структур, защите растений от патогенных микроорганизмов. Этот интерес объясняется также тем, что лектины широко используются для выявления и изучения углеводов в растворах и на клеточных поверхностях. Лектины служат ценным инструментом в биологических и медицинских исследованиях, таких как разделение и характеристика гликопротеинов и гликопептидов, гистохимическое изучение клеток и тканей, фракционирование лимфоцитов и клеток костного мозга при их трансплантации и многих других [2]. В связи с этим актуальным является поиск новых способов тестирования лектиновой активности, которые позволят выявить ранее неизвестные лектины.

Методы определения лектиновой активности основаны на способности лектинов агглютинировать клетки, что обусловлено наличием в каждой молекуле лектина по крайней мере двух углеводсвязывающих участков, с помощью которых лектины связываются с клетками. Известны не-

сколько способов определения лектиновой активности. Традиционно наиболее распространенным из них является метод агглютинации эритроцитов животных и человека. Однако использование этого метода имеет целый ряд ограничений, связанных со сложностями поддержания вивария, хранения эритроцитов в состоянии, пригодном для анализа. Разработанные методы консервации эритроцитов позволяют использовать их для определения лектиновой активности ограниченное время (несколько суток). Применение традиционного способа агглютинации эритроцитов не всегда позволяет выявить лектиновую активность в растительных клетках из-за отсутствия у эритроцитов соответствующих углеводсвязывающих центров [3]. В связи с этим для тестирования лектинов, наряду с гемагглютинацией используют различные способы определения лектиновой активности, основанные на агглютинации лейкоцитов, лимфоцитов, клеток опухолей, микроорганизмов и простейших [4], протопластов растений [5], углеводсвязывающих липосом [6].

Микроорганизмы широко используются для определения лектиновой активности, однако микроводоросли до сих пор не применялись для тестирования лектинов. Можно было предположить, что благодаря огромному разнообразию видов, возможности культивирования в полностью контролируемых условиях, короткому жизненному циклу одноклеточные водоросли послужат удобным тест-объектом для определения

Адрес для корреспонденции: Т.Н. Фалькович, 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35, Институт физиологии растений РАН.

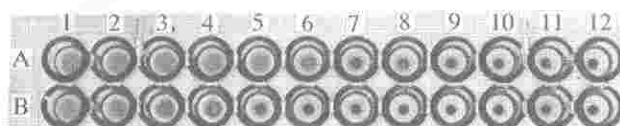


Рис. 1. Определение лектиновой активности с помощью гемагглютинации и альгоагглютинации. А – агглютинация кроличьих эритроцитов (гемагглютинация). В – агглютинация клеток *C. reinhardtii* (альгоагглютинация). Реакцию проводили путем последовательного четырехкратного разведения конканавалина А от 1 лунки (250 мкг/мл) к 12 ($1.5 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл). Концентрация в первой лунке 0.25 мкг/мл.

лектиновой активности. Целью настоящей работы явилась проверка этого предположения и разработка способа тестирования лектинов с помощью агглютинации клеток микроводорослей.

МЕТОДИКА

В качестве объектов исследования использовали одноклеточные водоросли из коллекции культур микроводорослей [7] Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (IPPAS):

Chlorella vulgaris var. *vulgaris* sp. К IPPAS С-1 – имеет характерную для водорослей целлюлозную клеточную стенку,

Dunaliella salina Teod. IPPAS D-209 – природная форма, лишенная клеточной стенки,

Chlamydomonas reinhardtii CW-15 IPPAS D-221 – мутант, лишенный клеточной стенки.

Культивирование водорослей осуществляли в накопительном режиме в стерильных условиях при постоянном освещении, оптимальной для каждой культуры температуре и непрерывном барботировании газовой смесью, содержащей 1.7 - 2% CO_2 . Суспензию клеток уплотняли с помощью центрифугирования при 2000 об/мин (центрифуга К-23, "Yanezkii", Германия) в течение 15 мин. Осажденные клетки промывали физиологическим раствором и ресуспендировали в фосфатном буфере 0.1 М KH_2PO_4 , 0.1 М NaOH , 0.9% NaCl (рН 7.4). Концентрация ресуспендированных клеток составляла 2% по объему. Полученную суспензию использовали для определения лектиновой активности методом альгоагглютинации.

В качестве контроля использовали реакцию агглютинации конканавалином А ("Sigma", Германия) кроличьих эритроцитов (2%), подготовленных стандартным методом [8]. Исходная концентрация лектина составляла 1 мг/мл. Реакцию проводили в планшетах для иммунологических реакций. Лектиновую активность определяли по наименьшей концентрации белка, вызывающего

видимую агглютинацию. Альгоагглютинацию проводили таким же образом в 10-кратной повторности. При визуальной оценке минимальная концентрация лектина, вызывающая агглютинацию, совпадала во всех повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Агглютинирующую способность клеток водорослей определяли в пластиковых планшетах с U-образными лунками. В каждую лунку вносили 150 мкл буфера, затем раститровывали путем последовательного четырехкратного разведения коммерческого препарата конканавалина А, исходно содержащего 1 мг/мл, и добавляли в каждую лунку 50 мкл суспензии водорослей, приготовленной как описано выше. Для развития реакции агглютинации планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2-х ч. Результаты реакции оценивали визуально по характеру седиментации клеток. Определяли минимальную концентрацию конканавалина, при которой еще наблюдалась агглютинация клеток микроводорослей. В тех лунках, где белок вызывал агглютинацию, клетки водорослей покрывали дно лунки равномерным слоем. В случае отсутствия агглютинации они оседали за время экспозиции в центре лунки, образуя четко очерченное пятно ("пуговку").

В результате проведения скрининга различных микроводорослей на возможность использования их в качестве тест-объекта для определения лектиновой активности наилучшие результаты были получены, как видно из табл. 1, в случае использования мутанта *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15, лишенного клеточной стенки [9]. Следует отметить при этом, что культуру *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 выращивали на полностью минеральных питательных средах, и она сохраняла при этом основной признак – отсутствие клеточной стенки [10]. Агглютинация клеток *Chlorella* sp. К происходила только в первой лунке при концентрации конканавалина 0.25 мг/мл. Возможно это связано с тем, что клеточная стенка ограничивала доступ к углеводным детерминантам, связывающим лектины. Клетки *Dunaliella salina*, несмотря на то, что они не имеют клеточной стенки, не взаимодействовали с конканавалином А, вероятно, из-за свойств оболочки этих водорослей или отсутствия углеводных участков, специфичных к конканавалину А.

На рис. 1 представлена сравнительная картина результатов определения лектиновой активности с помощью кроличьих эритроцитов (гемагглютинация) и клеток *C. reinhardtii* (альгоагглютинация). При агглютинации *C. reinhardtii* конканавалином А устойчивая реакция наблюдалась уже через 1 ч. Наименьшая концентрация лектина, которая вызывала агглютинацию клеток водорослей составляла 0.980 мкг/мл. Эта величина

превышала значение, полученное методом гемагглютинации (0.244 мкг/мл), т.е. альгоагглютинация имела меньшую чувствительность. Поскольку размеры клеток *C. reinhardtii* и эритроцитов близки (10 - 12 мкм у *C. reinhardtii* и 7 - 8 мкм у эритроцитов) и для тестирования лектинов их брали в одинаковой концентрации, то различия в активности реакции агглютинации, полученные с использованием конканавалина А не определяются, по-видимому, величиной поверхности взаимодействия телец с лектином, а зависят от физиолого-морфологических особенностей водорослей. Возможно, чувствительность агглютинации водорослей может быть повышена с помощью предподготовки тест-объекта. Для эритроцитов такую подготовку проводят путем их трипсинизации.

Полученные нами результаты свидетельствуют о принципиальной возможности применения фотосинтезирующих микроорганизмов для определения лектиновой активности. Необходимо подчеркнуть, что применение метода альгоагглютинации позволяет судить о результатах реакции через 1 ч, в то время как реакция гемагглютинации заканчивается через 2 ч после начала реакции. Кроме того, клетки *C. reinhardtii* могут поддерживаться в состоянии, пригодном для тестирования лектинов длительное время (водоросли можно культивировать неограниченное время) в отличие от эритроцитов, которые сохраняются только несколько суток. Таким образом, в дополнение к гемагглютинации мы предлагаем способ определения лектиновой активности путем альгоагглютинации. Применение этого способа вероятно позволит осуществлять поиск новых лектинов, которые нельзя выявить с помощью традиционных методов из-за того, что эритроциты (или другие объекты животного происхождения) могут не иметь углеводсвязывающих участков, специфичных к лектинам из растительных клеток.

Дальнейшая обработка метода, возможно, позволит увеличить его чувствительность, что является предметом нашего дальнейшего исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goldstein I.J., Hughes R.C., Monsigny M. et al. What Should be Called a Lectin? // Nature. 1980. V. 285. P. 66.

Таблица 1. Сравнительная характеристика вызываемой конканавалином А агглютинации клеток различных культур микроводорослей и эритроцитов кролика

| Тест-объект | Титр агглютинации, отн. ед. | Минимальная агглютинирующая концентрация лектина, мкг/мл |
|--|-----------------------------|--|
| Эритроциты кролика | 4096 | 0.244 |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CW-15 | 1024 | 0.980 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> * | 4 | 250 |
| <i>Dunaliella salina</i> | — | — |

* В литературе известна как *Chlorella sp. K.*

2. Sharon N., Lis H. Lectins. L.: Chapman and Hall, 1989. 121 p.
3. Etzler M.E. Plant Lectins: Molecular and Biological Aspect // Ann. Rev. Plant. Physiol. 1985. V. 36. P. 209.
4. Hill D.R., Hewlett E.L., Pearson R.D. Lectin Binding by *Giardia lamblia* // Infect. and Immunol. 1981. V. 34. N. 5. P. 733.
5. Larkin P.J. Plant Protoplast Agglutination by Lectins // Plant physiol. 1978. V. 61. N. 4. P. 501.
6. Дворкин В.М., Видерштайн Г.Я. Изучение некоторых факторов, влияющих на взаимодействие углеводовсодержащих липосом (RCAI) // Биохимия. 1984. Т. 49. № 11. С. 1862.
7. Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР / Под ред. В.Е. Семененко. М.: ИФР АН СССР. 1991. 227 с.
8. Kishinevsky B.D., Law I.J., Strijdom B.W. Detection of Lectins in Nodulated Peanut and Soybean Plants // Planta. 1988. V. 176. N. 1. P. 10.
9. Семененко В.Е., Пронина Н.А., Купцова Е.С., Фалькович Т.Н. Способ определения лектиновой активности: А. с. № 4915690 СССР (положительное решение от 1.03.1990).
10. Владимирова М.Г., Маркелова А.Г. Автотрофный рост лишённого клеточной стенки мутанта *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 в условиях интенсивной культуры // Физиология растений. 1980. Т. 27. № 6. С. 1180.

Представлено Э.И. Выскребенцевой