

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИОННЫХ ДЕТЕРГЕНТОВ ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ БЕЛКОВ МУКИ СЕМЯН МУТАНТОВ СОРГО, НЕСУЩИХ ГЕНЕТИЧЕСКУЮ КОНСТРУКЦИЮ ДЛЯ РНК-САЙЛЕНСИНГА ГЕНА ГАММА-КАФИРИНА

Селиванова М. Н.¹, Селиванов Н. Ю.¹, Эльконин Л. А.²

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ Саратовский научный центр РАН (ИБФРМ РАН), Саратов

² ФГБНУ ФАНЦ Юго-Востока, Россия, Саратов

Selivanova@yandex.ru

Сорго - перспективная засухоустойчивая зерновая культура. Одним из инновационных подходов для увеличения питательной ценности семян сорго является применение методов генной инженерии. Повышение экстрагируемости и перевариваемости кафиринов - запасных белков семян сорго представляется основной задачей в этом направлении.

В работе исследовали экстрагируемость запасных белков муки семян сорго сорта Аванс и его мутантов, несущих генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга гена гамма-кафирина, (поколение T1). Для экстракции использовали группу ионных детергентов: ДОХ (дезоксихолат Na – природный анионный детергент), SDS (додецилсульфат Na – анионный детергент, широко используемый для экстракции белков), СТАВ (цетилтриметиламмоний бромид, являющийся катионным аналогом SDS). Эффективность экстракции анализировали по данным SDS электрофореза в градиентном геле с использованием буферной системы Laemmli.

Показано, что использованные ионные детергенты различаются по экстрагирующей эффективности в отношении запасных белков семян сорго. ДОХ сольбилизирует сопутствующие белки, но практически не экстрагирует кафирины. SDS селективно экстрагирует кафирины, что позволяет выявить различия их содержания в муке разных мутантов. Наибольшая эффективность экстракции белков наблюдается при использовании СТАВ, который сольбилизирует максимальное количество и кафиринов, и белков других групп.

Для исследования субъединичного состава экстрагируемых белков был проведен анализ образцов в присутствии и в отсутствии дитиотрейтола (ДТТ) - восстановителя S-S связей. Установлено, что ДТТ вызывает качественное изменение полипептидных профилей образцов. Сопоставление электрофоретических спектров демонстрирует, что основная часть белков группы кафиринов экстрагируются в двух субъединичной, и в меньшей степени трех субъединичной формах. Также установлено, что ДОХ и СТАВ эффективно экстрагируют единый набор сопутствующих белков некафириновой группы. Фракция сопутствующих белков, в отличие от кафиринов, экстрагируется в мономерной форме.

Показано выраженное увеличение экстрагируемости белков кафириновой группы, а также низкомолекулярной фракции сопутствующих белков у мутантов с конструкцией для сайленсинга гамма-кафирина. Для ревертанта, у которого произошла утрата конструкции для сайленсинга, наоборот, отмечается снижение экстрагируемости запасных белков различных групп.

Результаты исследования демонстрируют определяющую роль межмолекулярного взаимодействия межсубъединичных S-S связей в процессе упаковки белков кафиринов различных классов в семенах сорго. Выявленные различия в экстрактивности запасных белков различных классов у полученных мутантов сорго могут опосредоваться изменением структуры белковых телец эндосперма, в частности, соотношением кафиринового кристаллоида и аморфного белкового матрикса.

Исследования проведены при поддержке Российского Научного фонда (грант №24-16-00063).

Ключевые слова: SDS-электрофорез, ионные детергенты, экстракция белков, кафирины, РНК-сайленсинг, сорго.

STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF IONIC DETERGENTS FOR THE EXTRACTION OF FLOUR PROTEINS FROM THE SEEDS OF SORGHUM MUTANTS CARRYING A GENETIC CONSTRUCT FOR RNA SILENCING OF THE GAMMA-KAFIRIN GENE

Selivanova M. N.¹, Selivanov N. Y.¹, Elkonin L. A.²

¹ *Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences IBPPM RAS, Saratov*

² *FANC of the South-East, Russia, Saratov*

Sel1ivanoova@yandex.ru

Sorghum is a promising drought-resistant grain crop. One of the innovative approaches to increase the nutritional value of sorghum seeds is the use of genetic engineering methods. Increasing the extractability and digestibility of kafirins, the storage proteins of sorghum seeds, seems to be the main task in this direction.

The work investigated the extractability of storage proteins of sorghum seed flour of the Avance variety and its mutants carrying a genetic construct for RNA silencing of the gamma-kafirin gene (generation T1). For extraction, a group of ionic detergents was used: DOX (Na deoxycholate - a natural anionic detergent), SDS (Na dodecyl sulfate - an anionic detergent, widely used for protein extraction), CTAB (cetyltrimethylammonium bromide, which is a cationic analogue of SDS). Extraction efficiency was analyzed by SDS gradient gel electrophoresis using the Laemmli buffer system.

The ionic detergents used were shown to differ in their extraction efficiency for sorghum seed storage proteins. DOX solubilizes non-kafirin group proteins, but practically does not extract kafirins. SDS selectively extracts kafirins, which makes it possible to identify differences in their content in the flour of different mutants.

It has been shown that the ionic detergents used differ in the efficiency of protein extraction for storing sorghum seeds. DOX solubilizes proteins that do not belong to the kafirin group, but practically does not extract kafirins. SDS selectively extracts different kafirins proteins, which makes it possible to identify differences in their content in the flour of different mutants. The highest efficiency of protein extraction is observed when using CTAB, which solubilizes the maximum amount of both kafirins and proteins of other groups.

To study the subunit composition of extracted proteins, samples were analyzed in the presence and absence of dithiothreitol (DTT), a S-S bond reducer. It was established that DTT causes a qualitative change in the polypeptide profiles of the samples. A comparison of electrophoretic spectra demonstrates that the main part of the kafirin group proteins are extracted in two subunit and three subunit forms. It was also found that DOX and CTAB efficiently extracted a single set of associated non-kafirin group proteins. The fraction of non kafirins proteins, unlike kafirins, is extracted in monomeric form.

A pronounced increase in the extractability of proteins of the kafirin group, as well as the low-molecular fraction of accompanying proteins, was shown in mutants with a construct for silencing gamma-kafirin. For a revertant in which the silencing construct has been lost, on the contrary, there is a decrease in the extractability of storage proteins of various groups.

The results of the study demonstrate the significant role of intermolecular interaction and intersubunit S-S bonds in the process of packaging of kafirin proteins of various classes in sorghum seeds. The identified differences in the extractivity of storage proteins of different classes in the obtained sorghum mutants may be mediated by changes in the structure of endosperm protein bodies, in particular, by the ratio of kafirin crystalloid and amorphous protein matrix.

The research was carried out with the support of the Russian Science Foundation (grant No. 24-16-00063).

Keywords: SDS electrophoresis, ionic detergents, protein extraction, kafirins, RNA silencing, sorghum.