Изучение волн активных форм кислорода с помощью генетически кодируемых сенсоров

**Печёрина А. А.^{А*}, Агеева М. Н.^Б, Здобнова Т. А.^А, Брилкина А. А.^Б,
Воденеев В. А.^А**

^А Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, кафедра биофизики, Нижний Новгород, Россия. *E-mail: pechorinaa@gmail.com

^Б Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, кафедра биохимии и биотехнологии, Нижний Новгород, Россия

Растения подвергаются в течение жизни различным абиотическим и биотическим воздействиям. Эти воздействия могут вызывать формирование активных форм кислорода (АФК), которые негативно влияют на функционирование мембран и ферментов. Но, кроме этого, АФК играют сигнальную функцию у растений. В растении под действием различных стрессоров могут образовываться как местный сигнал АФК, так и распространяющийся в нераздраженные области сигнал. Быстрое распространение на большие расстояния сигнала АФК объясняют его совместным распространением с кальциевым сигналом. Эти две особенности – время и дальность распространения – накладывают ограничение на визуализацию этих сигналов. Визуализация быстрых изменений этих сигналов во всем растении возможна с помощью использования генетически-кодируемых сенсоров и систем полномасштабного флуоресцентного имиджинга. Последним на данный момент прорывом в визуализации АФК является генетически кодируемый флуоресцентный H₂O₂-чувствительный сенсор HyPer7. Это ратиометрический сенсор, который имеет пики возбуждения при 400 и 499 нм и пик эмиссии при 516 нм. Отличительной особенностью этого сенсора является его рН-нечувствительность, что позволяет классифицировать получаемый флуоресцентный сигнал как АФК-индуцируемый. Целью работы было создание и проверка полученных растений табака (*Nicotiana tabacum*) флуоресцентным H₂O₂-чувствительным сенсором HyPer7.

Растения табака с сенсором HyPer7 были получены с помощью агробактериальной трансформации. Трансформация листовых фрагментов табака проводилась методом кокультивирования с *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGL0, несущего бинарную векторную систему рН7WG2-HyPer7, на агаризованной среде Мурасиге и Скуга. После инкубации экспланты пересаживали на среду для регенерации с антибиотиками канамицином, устойчивость к которому несет вектор, и цефотаксимом, воздействию которого подвержены агробактерии. Регенерировавшие

растения проверяли с помощью системы лазерной сканирующей конфокальной микроскопии Axio Observer Z1 LSM 710 NLO/Duo (Carl Zeiss, Германия) и получали флуоресцентные изображения клеток.

Далее проверяли работу сенсора HyPer7 в целом растении в установке флуоресцентного имиджинга DVS-03 (ИФТ РАН, Россия) и использовали для возбуждения сенсора светодиоды 395/25 нм и 490/20 нм, флуоресцентные изображения создавали с помощью CMOS-камеры в диапазоне 535/43 нм с экспозицией 2000 мс. Для проверки реакции сенсора на экзогенную H_2O_2 на лист наносили раствор 10% H_2O_2 в 0,05% адьюванте Сильвет 408, в качестве контроля использовали раствор 0,05% Сильвет 408. Соотношение флуоресценции F490/F395 повысилось в месте раздражения в ответ на это раздражение. Затем смотрели распространение волны АФК по всему листу при локальном нагреве части листа элементом Пельтье до 65°C в течение 5 минут. Было зафиксировано быстрое распространяющееся изменение флуоресценции сенсора по всему листу. Параметры волн АФК были сопоставлены с волнами кальция, визуализированными с помощью генетически кодируемого флуоресцентного сенсора Case12, была выполнена оценка этих волн в ответ на один и тот же стимул.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что растения с генетически кодируемыми сенсорами отличный инструмент для визуализации сигнальных веществ как на уровне клеток, так и на уровне целого растения.

Поддержано Программой 10 Экспериментальной Лаборатории Астрофизики и Геофизике НЦФМ

Характеристика показателей антиоксидантной системы трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, выращенных в условиях загрязнения почвы ионами никеля (II)

Приступа К. В.^{A*}, Кукулянская Т. А.^A, Храмова Е. А.^B

^A Белорусский государственный университет, кафедра биохимии, Минск, Беларусь.

*E-mail: kristina.pristupa@mail.ru

^B Белорусский государственный университет, кафедра генетики, Минск, Беларусь.

Растения, произрастающие в неблагоприятных условиях, подвергаются сильному стрессу, который может быть обусловлен загрязнением почв тяжёлыми металлами, засухой, засолением, воздействием высоких и низких температур и т.д. [1]. При стрессовых воздействиях значительно повышается интенсивность свободнорадикальных окислительных процессов. Одним из элементов, способных в высоких концентрациях индуцировать развитие стресса в растениях, является никель (II). Несмотря на