

УДК 577.342

М. С. РАДЮК, Е. А. БУДАКОВА, В. П. ДОМАНСКИЙ, Н. В. КОЗЕЛ

**ВЛИЯНИЕ СВЕТОДИОДНОГО ОСВЕЩЕНИЯ РАЗНОГО
СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА *FeSOD*
В КЛЕТКАХ *SPIRULINA PLATENSIS***

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, e-mail: kmu@tut.by

При выращивании *Spirulina platensis* под светодиодными источниками света выявлено снижение уровня экспрессии гена *FeSOD*. Предполагается, что активация фотосинтетических процессов, которая приводит к увеличению продуктивности водоросли при светодиодном освещении, может вызывать также усиление окислительных процессов в клетках *Spirulina platensis*. При увеличении интенсивности освещения таких источников фотосинтетически активного света степень окислительного воздействия может возрасти, что на фоне уменьшения уровня экспрессии гена *FeSOD* приведет к снижению устойчивости водоросли к стрессу и, как следствие, к снижению продуктивности или гибели культуры.

Ключевые слова: *Spirulina platensis*, антиоксидантная система, фотосинтетически активный свет, спектральный состав, светодиоды.

M. S. RADYUK, E. A. BUDAKOVA, V. P. DOMANSKII, N. V. KOZEL

**EFFECT OF LED LIGHTING OF DIFFERENT SPECTRAL COMPOSITION
ON GENE EXPRESSION *FeSOD* IN THE CELLS OF *SPIRULINA PLATENSIS***

*Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: kmu@tut.by*

When growing *Spirulina platensis* under the LED light sources a reduction in the level of *FeSOD* gene expression has been showed. Photosynthetic activation, which leads to increased productivity of the algae processes in LED lighting, can also assume to cause an increase in oxidative processes in cells of *Spirulina platensis*. Oxidative effects can increase while enhancing of intensity of illumination of these sources of photosynthetically active light. Taking into account reducing of *FeSOD* gene expression, algae stability to stress will reduce, and as a consequence it will lead to a decrease culture productivity or its destruction.

Keywords: *Spirulina platensis*, antioxidant system, photosynthetically active light, the spectral composition of the LEDs.

Введение. Синезеленая водоросль (цианобактерия) *Spirulina platensis* (Nordstedt) Geitler является перспективным объектом промышленной биотехнологии в связи с возможностью получения биомассы, обогащенной различными ценными веществами – антиоксидантами β-каротином и фикоцианином, а также полиненасыщенными жирными кислотами [1]. Использование при биотехнологическом производстве хозяйственно ценных видов водорослей, в частности *Spirulina*, светодиодных источников фотосинтетически активного света представляет большой интерес как с точки зрения высокой энергоэффективности таких осветителей, так и с точки зрения получения оптимального спектрального состава для создания наиболее благоприятных условий для роста и развития фотосинтезирующего организма. Однако имеются данные, свидетельствующие о том, что светодиодное освещение с определенным спектральным составом может оказывать существенное стрессовое воздействие на растения, выражающееся в накоплении в клетках активных форм кислорода, а также в интенсификации процессов перекисного окисления липидов [2].

Специфическим ферментом, препятствующим повреждающему влиянию активных форм кислорода, в частности супероксидного анион-радикала, на биологические структуры, является супероксиддисмутаза (СОД) [3]. Этот антиоксидантный фермент катализирует дисмутацию супероксидных анион-радикалов в молекулярный кислород и перекись водорода, а также участвует в каскаде

реакций, катализируемых ферментами антиоксидантной системы, включающей также аскорбат-пероксидазу, каталазу и глутатионредуктазу [4]. Активность СОД в условиях окислительного стресса регулируется на уровне экспрессии генов, кодирующих синтез фермента, и изменяется в широких пределах в зависимости от интенсивности стрессового воздействия. Известно, что в клетках *Spirulina* содержится большое количество СОД, которая может быть использована в медицинских и научных целях [5, 6]. При этом преобладающей изоформой СОД в клетках водоросли является изоформа, содержащая в активном центре железо – Fe-СОД [7]. Влияние спектрального состава света на экспрессию генов, кодирующих в клетках *Spirulina* синтез СОД и, в частности, Fe-СОД, не изучено.

Цель данной работы – выявление особенностей экспрессии гена, кодирующего Fe-СОД, в клетках *Spirulina platensis* в условиях светодиодного освещения разного спектрального состава для определения степени развития окислительного стресса в клетках водоросли и способности *Spirulina* сопротивляться стрессовому воздействию.

Материалы и методы исследования. В экспериментах использовали трихомную синезеленую водоросль (цианобактерию) *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Nordstedt) Geitler (штамм IBCE S-2 из коллекции Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси) [8]. *Spirulina platensis* выращивали на стандартной среде Зарроука [9] в стеклянных колбах объемом 200 мл (рабочий объем 100 мл) в режиме 14 ч света/10 ч темноты при температуре 25 ± 2 °С в течение 7 дней. Для выращивания водоросли использовали светодиодный осветитель, сконструированный в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [10], с различными комбинациями синего (450–465 нм), голубого (465–485 нм), желтого (590–595 нм) и красного (630–650 нм) светодиодов фирмы Philips (потребляемая мощность одного светодиода около 1 Вт), а также люминесцентную лампу Philips PL-S 11W/827/2P с потребляемой мощностью 11 Вт, цветовой температурой 2700 К и светоотдачей 64 Лм/Вт в качестве контроля. Интенсивности световых потоков лампы и светодиодного осветителя изначально были выравнены по энергии и составляли 5 мВт/см². Продуктивность *Spirulina* определяли по изменению биомассы, которую оценивали по поглощению и светорассеянию суспензии при 560 нм на спектрофотометре Metertech SP-830 Plus (Тайвань) [11].

Для анализа экспрессии гена, кодирующего Fe-СОД, из клеток *Spirulina*, выращенной при светодиодном освещении с различным спектральным составом, выделяли РНК, на матрице которой синтезировали кДНК. Для выделения РНК использовали TRI-reagent [12] согласно протоколу фирмы Sigma-Aldrich (sigma-aldrich.com). Синтез кДНК проводили, согласно протоколу фирмы ThermoFisher Scientific (thermofisher.com), с помощью RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit в амплификаторе MJ Mini Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Полученную кДНК использовали для ПЦР-анализа уровня экспрессии гена, кодирующего синтез Fe-СОД (*FeSOD*) в клетках *Spirulina* в зависимости от спектрального состава светодиодного излучения.

Подбор праймеров, специфичных к гену *FeSOD* и гену-нормализатору *16SrRNA*, проводили, используя последовательности мРНК выбранных генов, найденных в базе данных Nucleotide (NCBI). Далее при помощи программы Primer Blast NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) подбирали несколько пар праймеров, специфичных к выбранным генам. Праймеры подбирали с наименьшим количеством шпилек, дуплексов, оптимальным соотношением GC пар и минимальным различием между температурами плавления. Праймеры синтезировали в лаборатории ДНК-праймеров Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Нуклеотидная последовательность прямых (F) и обратных (R) праймеров, используемых для анализа экспрессии генов *FeSOD* и *16SrRNA* в клетках *Spirulina platensis*

Ген	Белок	Праймеры	Температура отжига, °С	Продукт, пар нуклеотидов
<i>SpFeSOD</i>	Fe-супероксиддисмутаза <i>Spirulina</i>	F–GGTGGTCAACCTACAGGAGC R–CAAGCCCCAACCACTACCGAA 5'→3'	60	119
<i>Sp16SrRNA</i>	16S субъединица рибосомы <i>Spirulina</i>	F–AAGTCATCATGCCCCCTTACG R–AGCGATTCCCTTCATGC 5'→3'	60	158

ПЦР проводили на амплификаторе MJ Mini Thermal Cycler в следующих условиях: 1) предварительная денатурация – 95 °С, 3 мин; 2) плавление – 94 °С, 30 с; отжиг – 56–62 °С, 45 с; элонгация – 72 °С, 45 с, 34 цикла; 3) конечная элонгация – 72 °С, 15 мин; 4) охлаждение – 5 °С, 20 мин.

Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 2 %-ном агарозном геле, в ТАЕ-буфере (0,04 М Трис-ацетат, рН 8,0, 1 mM ЭДТА) при напряжении 110 В и токе 144 мА в течение 45–50 мин. Визуализацию геля осуществляли под ультрафиолетовым светом при помощи системы гель-документирования GelDoc 2000 (Bio-Rad, США). Для проверки соответствия линейных размеров полученного ПЦР-продукта теоретически рассчитанным проводили сравнение соответствующих электрофоретических зон с маркером линейных размеров ДНК.

Результаты и их обсуждение. Для выращивания фотосинтезирующих организмов в условиях искусственного освещения в последнее время часто используют светодиодные осветители, содержащие светодиоды с полосами испускания в красной и синей областях спектра. Использование именно таких источников света объясняется тем, что в фотосинтезирующих организмах в качестве основных пигментов-светосборщиков выступают хлорофилл и каротиноиды, которые наиболее эффективно поглощают свет в красной и синей областях спектра [13, 14]. Но для синезеленых водорослей, в частности для *Spirulina*, содержащей большое количество фикоцианина и β -каротина, такой спектральный состав может быть не оптимальным, в связи с чем кроме классических красного и синего светодиодов и их комбинации (красный:синий – 2:1 по энергии излучения) при выращивании *Spirulina* нами использован осветитель с более сложной конструкцией, в спектре излучения которого содержался дополнительно желтый и голубой свет (красный:желтый:голубой:синий – 3:3:1:1 по энергии излучения). Как показано нами ранее [15], все использованные варианты светодиодного освещения, за исключением синего, позволяют добиться повышения продуктивности *Spirulina* по сравнению с контролем: при использовании только красного света – на 31 %, совместно красного и синего (2:1) – на 20, совместно красного, желтого, голубого и синего (3:3:1:1) – на 17 %. При использовании только синего света наблюдается уменьшение на 46 % продуктивности водоросли, основной причиной чего может быть снижение фотосинтетической активности клеток *Spirulina platensis* в связи с отсутствием в спектральном составе освещения желтого и красного света, наиболее эффективно поглощаемого фикоцианином (максимум поглощения фикоцианина – 620 нм).

Несмотря на увеличение продуктивности *Spirulina* во всех вариантах, кроме варианта с использованием синего света, при величине светового потока в 5 мВт/см² анализ световых кривых накопления биомассы водоросли под красным светом показал, что при увеличении интенсивности освещения происходит снижение продуктивности *Spirulina* относительно контроля (рис. 1). Это может быть следствием фотоингибирования фотосинтетических процессов в клетках водоросли, вызванного развитием окислительного стресса при облучении суспензии *Spirulina* высокими дозами света, наиболее эффективно поглощаемого светособирающими пигментами.

При стрессовом воздействии одним из наиболее быстрых ответов антиоксидантной системы на генерацию в клетке активных форм кислорода является изменение экспрессии генов, кодирующих в клетке синтез СОД [2]. Мы предполагаем, что анализ экспрессии гена *FeSOD* может дать представление о степени развития окислительного стресса в клетках водоросли и способности *Spirulina* сопротивляться стрессовому воздействию.

Для анализа экспрессии гена *FeSOD* в клетках *Spirulina* в условиях светодиодного освещения разного спектрального состава использовали ПЦР-анализ с предварительной оптимизацией условий проведения реакции. Оптимизация протокола ПЦР-анализа с праймерами для гена *FeSOD* при различных температурах отжига праймеров

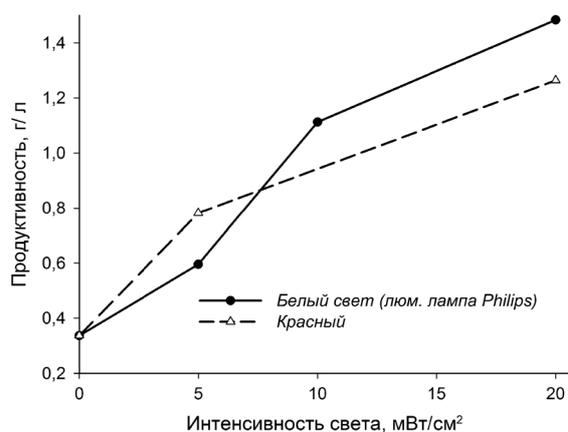


Рис. 1. Изменение продуктивности *Spirulina platensis*, выращиваемой под люминесцентной лампой Philips или светодиодным осветителем с красными светодиодами, в зависимости от интенсивности света

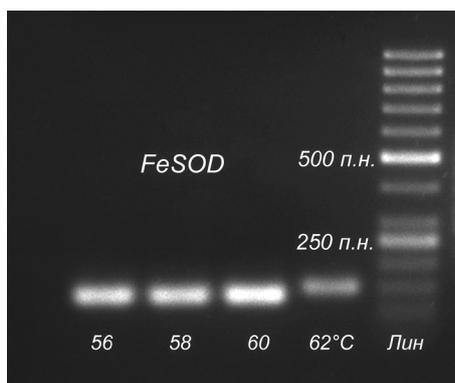


Рис. 2. Оптимизация ПЦР-анализа с праймерами на ген *FeSOD* *Spirulina platensis* при разных температурах (56–62 °С) отжига праймеров

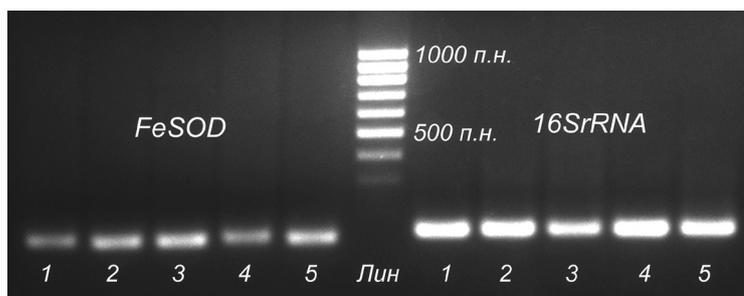


Рис. 3. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации кДНК, синтезированной на матрице РНК, выделенной из клеток *Spirulina platensis*, с праймерами на ген *FeSOD* и ген-нормализатор *16SrRNA*: 1 – красный + желтый + голубой + синий (в соотношении 3:3:1:1 по энергии излучения), 2 – красный, 3 – красный + синий (в соотношении 2:1 по энергии излучения), 4 – синий, 5 – белый свет

показала, что оптимальной температурой отжига для накопления продукта амплификации гена *FeSOD* является температура 60 °С (рис. 2).

Один из снимков продуктов амплификации с праймерами для гена *FeSOD* и гена-нормализатора *16SrRNA* *Spirulina* после их разделения с помощью агарозного гель-электрофореза представлен на рис. 3.

Полученные средние из трех повторностей уровней экспрессии гена *FeSOD* в клетках *Spirulina*, выращенной при различной комбинации светодиодов, представлены в табл. 2. За 1,0 принят уровень экспрессии гена *FeSOD* в клетках *Spirulina*, выращенной под белым светом (контроль). ПЦР-анализ показал, что наиболее низкий уровень экспрессии гена *FeSOD* наблюдается в клетках *Spirulina*, выращенной под синими светодиодами, – 0,56 от контроля (табл. 2). Уровни экспрессии этого гена в клетках *Spirulina*, выращенной при комбинации красного, желтого, голубого и синего светодиодов (3:3:1:1), а также только красного света, были выше, чем в варианте с использованием синего света, но ниже, чем в контроле (0,72 и 0,77 соответственно по отношению к белому свету). Уровень экспрессии гена *FeSOD* в клетках, выращенных при комбинации красного и синего светодиодов, достоверно не отличался от контроля. Существенное снижение экспрессии гена *FeSOD* в отдельных вариантах светодиодного освещения может стать фактором, ограничивающим устойчивость клеток *Spirulina* к стрессовому воздействию.

Т а б л и ц а 2. Относительные уровни экспрессии гена *FeSOD* в клетках *Spirulina platensis*, выращенной при различной комбинации светодиодов

Показатель	Свет				
	красный + желтый + голубой + синий (3:3:1:1)	красный	красный + синий (2:1)	синий	белый (контроль)
Уровень экспрессии гена <i>FeSOD</i> , отн. ед.	0,72 ± 0,04	0,77 ± 0,06	1,03 ± 0,10	0,56 ± 0,09	1,0

П р и м е ч а н и е. За 1,0 принят уровень экспрессии гена *FeSOD* в клетках *Spirulina platensis*, выращенной под белым светом.

Заключение. Таким образом, несмотря на повышенную продуктивность образцов, выращенных под красным, а также комбинированным красным, желтым, голубым и синим светом [15], для них характерно снижение уровня экспрессии гена *FeSOD*. Мы предполагаем, что активация фотосинтетических процессов, которая приводит к увеличению продуктивности водоросли, может вызывать также усиление окислительных процессов в клетках *Spirulina platensis*. При увеличении интенсивности освещения таких источников фотосинтетически активного света степень окислительного воздействия может возрасти, что на фоне уменьшения уровня экспрессии гена *FeSOD* приведет к снижению устойчивости водоросли к стрессу и, как следствие, к снижению продуктивности или гибели культуры.

Список использованной литературы

1. Продуктивность спирулины при использовании источников света различного типа / С. С. Мельников [и др.] // Вес. НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2011. – № 3. – С. 41–45.
2. Вязов, Е. В. Содержание активных форм кислорода, продуктов перекисного окисления липидов и проницаемость клеточных мембран в растениях огурца (*Cucumis sativus*) в условиях узкополосного освещения / Е. В. Вязов, Н. В. Шалыго // Вес. НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2013. – № 2. – С. 71–74.
3. Бараненко, В. В. Супероксиддисмутаза в клетках растений / В. В. Бараненко // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 6. – С. 265–274.
4. Asada, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions / K. Asada // Plant Physiol. – 2006. – Vol. 141. – P. 391–396.
5. Determination of superoxide dismutase activities in different cyanobacteria for scavenging of reactive oxygen species / S. Gunes [et al.] // J. of biol. active prod. from Nature. – 2015. – Vol. 5, N 1. – P. 25–32.
6. Vonshak, A. *Spirulina platensis* (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology / A. Vonshak. – London, 1997. – 233 p.
7. Comparative analysis of cyanobacterial superoxide dismutases to discriminate canonical forms / B. Priya [et al.] // BMC Genomics. – 2007. – Vol. 8. – P. 435.
8. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей / С. С. Мельников [и др.]. – Минск, 2011. – 101 с.
9. Draft genome sequence of *Arthrospira platensis* C1 (PCC9438) / C. Supapon [et al.] // Stand. Genomic Sci. – 2012. – Vol. 6, N 1. – P. 43–53.
10. Доманский, В. П. Особенности выращивания *Spirulina platensis* при использовании светодиодных источников света / В. П. Доманский, Н. В. Козел // Вес. НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2013. – № 3. – С. 56–59.
11. Promotive Effect of 5-aminolevulinic acid on the growth and photosynthesis of *Spirulina platensis* / K. Sasaki [et al.] // J. of Fermentation and Bioengineering. – 1995. – Vol. 79, N 5. – P. 453–457.
12. Chomczynski, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples / P. Chomczynski // Biotechniques. – 1993. – Vol. 15, N 3. – P. 532–537.
13. Фотосинтез и продуктивность растений картофеля в условиях различного спектрального облучения / Ю. Ц. Мартиросян [и др.] // С.-х. биология. – 2013. – № 1. – С. 107–112.
14. Фотохимическая и фосфорилирующая активность хлоропластов и мезоструктура листьев китайской капусты при выращивании под светодиодами / О. В. Аверчева [и др.] // Физиол. раст. – 2010. – Т. 57. – С. 404–414.
15. Влияние спектрального состава светодиодного излучения на структуру фотосинтетического аппарата *Spirulina platensis* / Н. В. Козел [и др.] // Вес. НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2015. – № 2. – С. 44–48.

Поступила в редакцию 16.12.2015