

ВОЗМОЖНА ЛИ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ У РАСТЕНИЙ?

Е. Б. Гугля¹✉, А. А. Котлобай², Е. К. Секретова³, П. В. Волкова³, И. В. Ямпольский^{1,2}¹Лаборатория химии природных соединений, НИИ трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва²Группа синтеза природных соединений, Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва³Московская гимназия на Юго-Западе № 1543, Москва

На основе открытого недавно механизма биолюминесценции высших грибов и сходства структуры люциферина грибов и некоторых метаболитов растений поставлена задача поиска растений, содержащих субстрат(ы) реакции грибной люминесценции. В результате скрининга коллекции растений европейской части России обнаружено 10 видов, экстракты листьев которых проявляют биолюминесцентную активность. Установлено, что изученные виды растений синтезируют не одно, а множество активных соединений. Все люминесцентные субстраты, содержащиеся в растениях, не идентичны грибному люциферину (3-гидрокси-гиспидину) и химически нестабильны, что препятствует выделению индивидуальных соединений. Данное исследование можно считать первым шагом в создании автономно люминесцентного растения на базе фермент-субстратной системы высших грибов.

Ключевые слова: биолюминесценция грибов, люминесцентные биоинженерные растения, люциферины, метаболиты растений

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 14-50-00131.

Благодарности: авторы благодарят Людмилу Абрамову и Никиту Тихомирова за помощь при сборе и определении образцов растений. Работа выполнена с использованием оборудования центра коллективного пользования ИБХ РАН (ЦКП ИБХ).

✉ **Для корреспонденции:** Гугля Елена Борисовна
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; eguglya@gmail.com

Статья получена: 19.02.2017 **Статья принята к печати:** 10.04.2017

BIOLUMINESCENCE: IS IT POSSIBLE FOR A PLANT?

Guglya EB¹✉, Kotlobay AA², Sekretova E³, Volkova PV³, Yampolsky IV^{1,2}¹Laboratory of Chemistry of Natural Compounds, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia²Total Synthesis Laboratory, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia³Moscow South-West High School No. 1543, Moscow, Russia

An extensive collection of plants gathered in the European part of Russia was screened for a substrate of fungal luciferase. This work was inspired by the recently discovered mechanism of bioluminescence in higher fungi and the structural similarity of fungal luciferin with some plant metabolites. Of all studied leaf extracts obtained from 200 different plants, bioluminescent activity was discovered in 10 species. Each of these species contained a plurality of active compounds. All the luminescent substrates were not identical to fungal luciferin (3-hydroxyhispidin) and were chemically unstable, rendering the attempt to isolate individual compounds for further structural characterization yet unsuccessful. This study is the first step towards engineering a self-luminescent plant based on a fungal enzyme-substrate bioluminescent system.

Keywords: fungal bioluminescence, engineered luminescent plants, luciferins, plant metabolites

Funding: this work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 14-50-00131).

Acknowledgements: the authors thank Lyudmila Abramova and Nikita Tikhomirov for their assistance in collecting and sorting plant samples. The present research was carried out at the facilities of the Shared Resource Center of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry.

✉ **Correspondence should be addressed:** Elena Guglya
ul. Ostrovityanova, 1, Moscow, Russia, 117997; eguglya@gmail.com

Received: 19.02.2017 **Accepted:** 10.04.2017

Биолюминесценция (БЛ) — это видимое свечение живых организмов. Этот феномен был впервые продемонстрирован *in vitro* более ста лет назад Dubois [1]. Исследователь смешивал полученные холодным и горячим способами вытяжки из тканей светящихся органов жуков *Pyrophorus noctilucus*. Экстракт, приготовленный в холодной воде, содержал термолабильный фермент люциферазу, а полученный в горячей воде экстракт содержал термостабильный люциферин. Таким образом, испускание света смесью двух экстрактов было результатом фермент-субстратной

реакции. Термин «биолюминесценция» впервые использовал Harvey [2]. Во всех известных биолюминесцентных системах в реакции участвует кислород, в результате происходит образование продукта реакции — оксिलюциферина. Переход молекулы оксिलюциферина из возбужденного состояния в основное сопровождается световым излучением.

Биолюминесценция широко распространена в царствах животных и грибов, но люминесцентного растения в природе не известно ни одного [3]. Более 30 лет назад

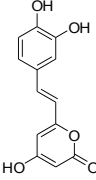
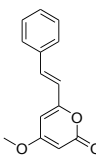
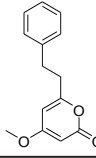
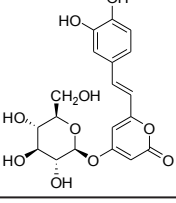
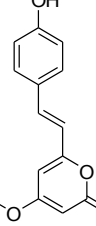
была предпринята первая попытка создания искусственного светящегося растения [4]. На основе хорошо изученной БЛ системы светляка было получено биоинженерное растение *Nicotiana tabacum* путем внедрения в него гена люциферазы. При смешении экстракта такого растения и раствора люциферина и АТФ или же при погружении интактного растения в указанный раствор обнаруживалось БЛ свечение. Изображение светящегося растения было продемонстрировано при его экспозиции на рентгеновской пленке. Позже было выполнено еще несколько работ [5, 6], а недавно даже открыт проект по созданию светящегося растения [7], но принципиально новых результатов не было получено. Результаты наших последних исследований БЛ высших грибов дали основание полагать, что можно достичь большего, используя особенности этой фермент-субстратной системы.

Если у животных биолюминесцентные системы специфичны для каждого таксона, то механизм люминесценции высших грибов, напротив, единообразен [8]. В 1961 г. в БЛ грибов было выделено два этапа [9]. Сначала предшественник люциферина восстанавливается НАД(Ф)Н-зависимым ферментом в истинный люциферин, который затем окисляется кислородом воздуха в результате катализируемой люциферазой реакции и производит видимое световое излучение с длиной волны 520–530 нм [10]. После многочисленных безуспешных попыток [11, 12] предшественник люциферина все же был выделен из плодового тела нелюминесцентного гриба *Pholiota squarrosa*; им оказался гиспидин (6-(3,4-дигидроксистирил)-4-гидрокси-2-пиранон) [13] — хорошо известный вторичный метаболит растений и грибов [14] (табл. 1). В этой же работе гиспидин удалось энзиматически преобразовать в люциферин, который оказался 3-гидроксилированным производным гиспидина [13] (рис. 1).

Из литературных источников известны работы по выделению гиспидина и его производных из таких растений, как *Alpinia zerumbet* [15–17], *Pistacia atlantica* [18], *Peganum harmala* [19], *Pteris ensiformis Burm* [20], *Cassia alata* [21], *Rheum tataricum* [22] и прочих (табл. 1). Широкая распространенность гиспидина среди растений и грибов, а также существование похожих соединений среди метаболитов растений натолкнуло нас на мысль о возможности создания автономно люминесцентного биоинженерного растения путем внедрения гена люциферазы в растение, способное синтезировать субстрат этого фермента. Как и другие метаболиты растений, производные гиспидина сейчас являются объектом пристального внимания ис-

следователей, работающих в области фармацевтики. Гиспидин и его производные проявляют биологическую активность, имеют антиоксидантные и противоопухолевые свойства, а также способны предотвращать ожирение, и они рассматриваются в качестве возможной основы для разработки лекарственных средств [16–19].

Таблица 1. Растения, содержащие гиспидин и его производные

Наименование соединения	Структура	Растение	Ссылка
Гиспидин		<i>Alpinia zerumbet</i>	[15–17]
		<i>Pistacia atlantica</i>	[18]
		<i>Peganum harmala</i>	[19]
5,6-Дегидрокаваин		<i>Alpinia zerumbet</i>	[15–17]
Дигидро-5,6-дегидрокаваин		<i>Alpinia zerumbet</i>	[15–17]
Гиспидин 4-О-β-D-глюкопиранозид		<i>Pteris ensiformis Burm</i>	[20]
Бис-норянгонин		<i>Cassia alata</i>	[21]
		<i>Rheum tataricum</i>	[22]

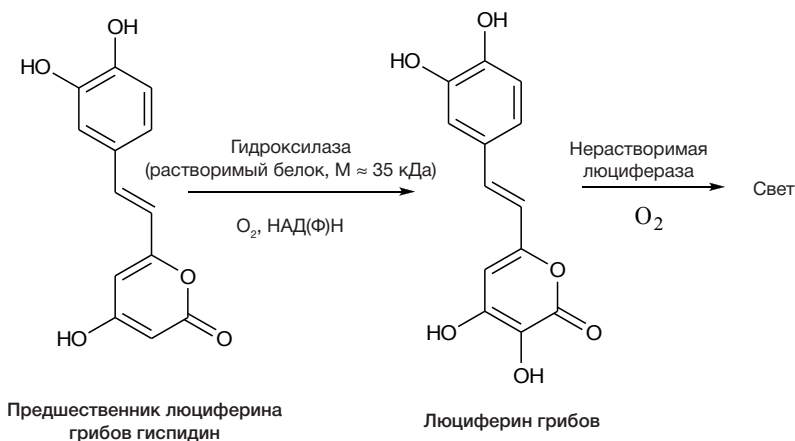


Рис. 1. Механизм люминесценции грибов

Целью нашей работы был поиск субстрата(ов) реакции грибной биоломинесценции в растениях, произрастающих в европейской части России, и выделение соответствующих активных соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экстракты растений

Все образцы растений были собраны в июне 2015 г. на биостанции «Озеро Молдино» Московской гимназии на Юго-Западе № 1543 (Тверская область) (табл. 1S, представлена в электронной версии статьи на сайте журнала). Собирали только листья. Все образцы были заморожены и хранились при температуре -70°C ; некоторые были высушены под вакуумом.

При первоначальном скрининге растений в качестве растворителя был использован ацетон. Извлечение целевых компонентов из растительного сырья — хорошо разработанная группа методов [23]. Для получения экстракта часть листа весом 30–500 мг помещали в пробирку объемом 2 мл, содержащую 0,3–1,5 мл растворителя, и смешивали в течение 20 мин в шейкере BioShake XP (Analytik Jena AG, Германия) при скорости 1800 об/мин при комнатной температуре. Затем экстракт переносили в другую пробирку и центрифугировали при температуре 5°C и ускорении 10 000 g на центрифуге Centrifuge 5424 R (Eppendorf, Германия). После чего полученный раствор мог быть использован для твердофазной экстракции (ТФЭ) или разделения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или же высушен в вакууме на центрифуге miVac Duo (SP Scientific, США). Перед проведением дальнейших операций высушенный остаток повторно растворяли в соответствующем растворителе и центрифугировали. Состав экстрагирующего растворителя для высушенного остатка мог быть отличен от растворителя при первой экстракции, в частности, к органическому растворителю добавляли буферный раствор.

Для выполнения ТФЭ использовали картриджи C18 (500 мг; Phenomenex, США). На картридж наносили исходный экстракт объемом 0,5–1 мл, затем производили смыв образца с сорбента, последовательно меняя состав растворителей (каждая ступень объемом 1–2 мл): вначале смесь ацетонитрила и воды в соотношении 1 : 1, затем ацетонитрилом и ацетоном.

Ферментные экстракты грибов были приготовлены, как описано в работе [13].

Биоломинесцентный анализ

Для анализа смешивали два компонента: экстракт грибного фермента и органический растительный экстракт. Разбавленный экстракт ферментов гриба в объеме 3 мкл и органический растительный экстракт в объеме 3, 10 или 15 мкл добавляли в пробирку, содержащую 100 мкл буфера (при концентрации NaH_2PO_4 0,2 М и Na_2SO_4 0,5 М и pH 8,0) с 0,1 % N-додецил- β -D-мальтозида, смесь взбалтывали и немедленно помещали в кювету люминометра Glomax 20/20 (Promega, США). Люминесценцию измеряли в течение 10 с; время интегрирования сигнала составляло 1 с (табл. 2). В качестве органических экстрактов, содержащих потенциальный субстрат, тестировались экстракты из листьев, экстракты из сушеных остатков первых экстрактов, фракции после ТФЭ или же фракции после ВЭЖХ.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Разделение методом ВЭЖХ проводили на хроматографе Nexera X2 (Shimadzu, Япония), оснащенном автодозатором SIL-30AC, диодно-матричным детектором SPD-M20A и коллектором фракций FRC-10A. Были использованы разные хроматографические колонки (табл. 3). Колонки и детектор не термостатировались (находились при комнатной температуре), температура автодозатора составляла 5°C . Состав подвижной фазы: компонент А — водный раствор ацетата аммония в концентрации 0,02 М

Таблица 2. Образцы для измерения биоломинесценции

Рисунок/таблица	Приготовление образца	Растворитель/общий объем, мкл	Объем для измерения, мкл
Табл. 4	Экстракт замороженных листьев, из 100 мг	Ацетон/300	3
Рис. 2	Экстракт мороженых листьев <i>P. natans</i> в ацетоне, из 100 мг, объем экстракта 300 мкл, высушен и растворен повторно	Растворитель АВ*/100	3
Рис. 3; 4, А, Б (синий)	Экстракты сухих листьев <i>R. nigrum</i> (А) и <i>B. pendula</i> (Б), из 100 мг	EtOH/1000 MeOH/1000	3 3
Рис. 3; 4, А, Б (красный)	ТФЭ фракции тех же экстрактов	Ацетон/1000	3
Рис. 3; 4, В	Экстракт листьев <i>B. pendula</i> , из 100 мг свежих и мороженых, из 50 мг сушеных	MeOH/1000	10
Рис. 4	ВЭЖХ фракции экстракта <i>B. pendula</i> , 500 мкл, высушены и растворены повторно	MeOH/50	10
Рис. 5	ВЭЖХ фракции экстракта <i>P. natans</i> , 1000 мкл, высушены и растворены повторно	Растворитель АВ/100	10
Рис. 6	ВЭЖХ фракции экстракта <i>B. pendula</i> , 1000 мкл, высушены и растворены повторно	MeOH/50	10
Рис. 7	ВЭЖХ фракции экстракта <i>P. natans</i> , 300 мкл, высушены и растворены повторно	Растворитель АВ/50	15
Рис. 8, А	ВЭЖХ фракции экстракта <i>P. natans</i> , 500 мкл	Элюент для ВЭЖХ/500	10
Рис. 8, Б	ВЭЖХ фракции экстракта <i>P. natans</i> , 500 мкл	Элюент для ВЭЖХ/500	10

Примечание. * — АВ, бинарный растворитель (А — ацетон, В — 0,1 М NH_4Ac , pH 6,5).

при pH 5,5, компонент В — ацетонитрил, метанол или ацетон (состав и градиент подвижной фазы представлены в табл. 3). Ацетонитрил и метанол были со степенью чистоты «для ВЭЖХ», ацетон — «х. ч.».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для обнаружения люцифериноподобных субстратов в taxonomически различных растениях был проведен скрининг собранной коллекции 200 образцов. Каждый приготовленный растительный органический экстракт смешивали с раствором грибного фермента и сразу же измеряли его люминесценцию. В итоге было обнаружено 10 люминесцирующих образцов растений (табл. 4).

Если для первоначального скрининга мы использовали один растворитель — ацетон, то для достижения максимальной люминесценции образца с обнаруженным активным субстратом состав растворителей варьировали. Это приводило к некоторой количественной разнице в наблюдаемых значениях БЛ. Высушивание экстракта и повторное растворение в меньшем объеме растворителя позволяло сконцентрировать образец в несколько раз. Для повторного растворения сухого остатка к органическому растворителю мог быть добавлен буфер с тем или иным значением pH, причем значение pH могло быть критичным для сохранности активности экстракта. Так, для работы с замороженными листьями *P. natans* наилучшими

оказались следующие условия: экстракция ацетоном из растения (первый экстракт) и использование смеси ацетона с водно-ацетатным буфером (pH 6,5) в соотношении 7 : 3 для повторного растворения сухого остатка (рис. 2).

Все экстракты люминесцентно активных растений были проверены на стабильность. Они были высушены и растворены повторно, затем выдержаны в течение нескольких часов при температуре 0 °С и при комнатной температуре. Измерение БЛ активности после каждой операции показало, что все субстраты нестабильны (табл. 4). В результате сушки люминесцентная активность снижалась более чем на 50 %. Самая большая величина интенсивности биолюминесценции была установлена для экстракта *P. natans*, и она уменьшилась на порядок после того, как экстракт выдержали некоторое время при комнатной температуре.

При выдержке экстрактов на льду обнаружено заметное увеличение во времени БЛ активности экстрактов, по крайней мере в течение нескольких часов. Его наблюдали для многих образцов растений (табл. 4, рис. 3, А, Б). В частности, для *R. nigrum* зафиксировано 10-кратное увеличение. Временные зависимости биолюминесцентной активности различались не только для разных видов растений, но и для экстрактов одного вида, полученных из растительного материала, обработанного по-разному (свежих, сушеных и замороженных листьев), а также экстрактов и полученных методом ТФЭ фракций тех же экстрактов. Экстракты сухих листьев *B. pendula* проявили

Таблица 3. Параметры ВЭЖХ

Рисунок	Колонка	Подвижная фаза*, компонент В	Образец
5	Discovery C18, 5 мкм, 4,6 × 150 мм	MeCN, градиент 30–90 % при 0–5 мин, 90 % при 5–10 мин, скорость потока 1 мл/мин	Замороженные листья <i>P. natans</i> , 300 мг в 1 мл ацетона, 500 мкл экстракта высушено и растворено в 130 мкл бинарного растворителя, объем на колонку 100 мкл
6	ZORBAX SB-C18, 5 мкм, 9,4 × 150 мм	MeOH, градиент 60–100 % при 0–6 мин, 100 % при 6–45 мин, скорость потока 2 мл/мин	Свежие листья <i>B. pendula</i> , 400 мг в 1500 мкл MeOH; фракция после ТФЭ, ввод на колонку 800 мкл активной фракции в MeCN
7	TSK ODS-120T, 5 мкм, 4,6 × 250 мм	Ацетон, градиент 40–90 % при 0–7 мин, 90 % при 7–30 мин, скорость потока 1 мл/мин	Высушенные листья <i>P. natans</i> , 50 мг в 500 мкл бинарного растворителя, объем на колонку 200 мкл
8, А	Lichrosorb Diol, 10 мкм, 4,6 × 250 мм	MeCN, градиент 90–80 % при 0–7 мин, скорость потока 1 мл/мин	Замороженные листья <i>P. natans</i> , 70 мг на 200 мкл ацетона, объем на колонку 100 мкл
8, Б	Synergi Polar RP 80A, 4 мкм, 2 × 150 мм	MeCN, градиент 70–95 % при 0–5 мин, 95 % при 5–14 мин, скорость потока 0,7 мл/мин	Фракция между 3 и 3,5 мин первой хроматографии, сконцентрированная до 100 мкл

Примечание. * — компонент А — 0,02 М NH₄Ac, pH 5,5.

Таблица 4. Биолюминесцентная активность экстрактов растений

Растение	Интенсивность люминесценции экстракта замороженных листьев, отн. ед.	Интенсивность люминесценции переработанного экстракта, %		
		в сравнении с исходным экстрактом	после выдержки в течение 2 ч при 20 °С в сравнении с люминесценцией до этой процедуры	после выдержки в течение 2 ч при 0 °С в сравнении с люминесценцией до этой процедуры
<i>Andromeda polifolia</i>	6 600	30	35	нет данных
<i>Betula pendula</i>	11 500	25	40	90
<i>Chamaedaphne calyculata</i>	7 900	35	40	120
<i>Potamogeton natans</i>	290 000	25	6	150
<i>Pyrola rotundifolia</i>	1 500	55	70	130
<i>Ribes nigrum</i>	11 000	40	30	330
<i>Ribes rubrum</i>	8 500	35	20	140
<i>Salix aurita</i>	11 000	20	15	нет данных
<i>Salix pentandra</i>	10 000	30	15	60
<i>Stachys sylvatica</i>	11 000	20	25	нет данных

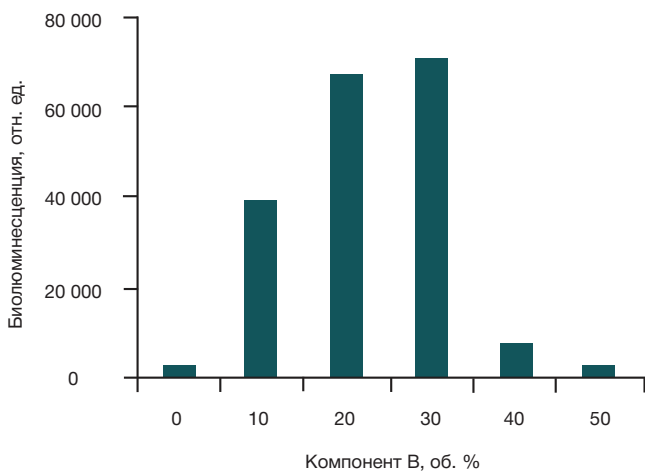


Рис. 2. Зависимость биоломинесценции от содержания компонента В в бинарном растворителе АВ (А — ацетон, В — 0,1 М NH₄Ac, рН 6,5) для высушенного и повторно растворенного экстракта *P. natans*

стабильность, зато уровень биоломинесценции экстрактов замороженных и свежих листьев значительно увеличился (рис. 3, В). Кроме того, часто (но не всегда) 10-секундные кинетические кривые при измерении БЛ экстрактов *B. pendula* были восходящими, хотя обычно они являются нисходящими (рис. 4).

Основываясь на том, что самое большое значение люминесценции исходного экстракта было зафиксировано у образцов *P. natans*, этот вид был выбран в качестве кандидата для продолжения эксперимента, а именно выделения биоломинесцентного субстрата методом ВЭЖХ. Оптимизированный состав подвижной фазы для ВЭЖХ на колонке типа С18 отличался по сравнению с условиями для выделения 3-гидроксигиспидина: как компонент А использовали водно-ацетатный буфер в концентрации 0,02 М при рН 5,5 (в отличие от 0,1 % муравьиной кислоты для 3-гидроксигиспидина). Содержание органического компонента В было увеличено и при градиентном элюировании достигало 95 %.

Фракции после ВЭЖХ были высушены вакуумно, заново растворены с 20-кратным концентрированием, после чего была измерена их БЛ активность (рис. 5). В полученном хроматографическом профиле образца были отмечены две области, содержащие люминесцентно активные компоненты, что указывало на содержание более чем одного субстрата. Контур ультрафиолетового/видимого излучения в диапазоне 200–800 нм свидетельствовал о наличии многих неразделенных компонентов в областях люминесцентной активности.

Для получения большего количества нестабильного субстрата при хроматографировании мы вносили различные модификации в используемый нами метод, а также выбирали для тестирования другие виды растений. На рис. 6 показан результат одного из разделений. В качестве материала использованы свежие листья *B. pendula*. Исходный экстракт из 400 мг листьев экстрагировали в 1500 мкл метанола и 1000 мкл этого экстракта фракционировали на картриджах С18. Была измерена активность фракций, и самая активная из них в объеме 800 мкл без предварительного высушивания была внесена на препаративную колонку С18. После измерения БЛ активности фракций на 45-минутной хроматограмме было выявлено много активных зон. В самых активных фракциях в начале хроматограммы обнаружались многочисленные

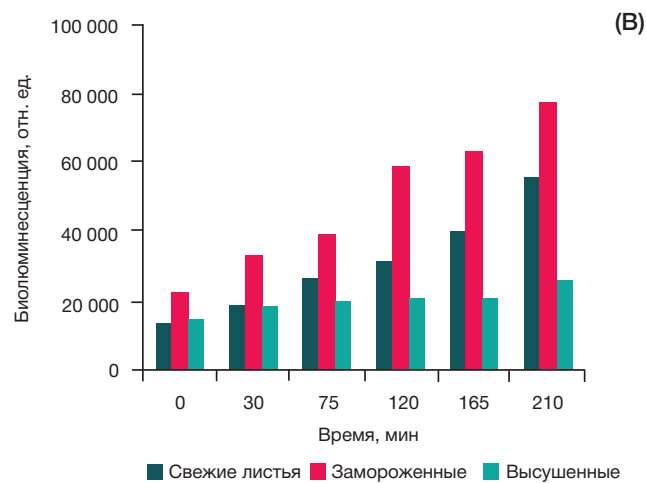
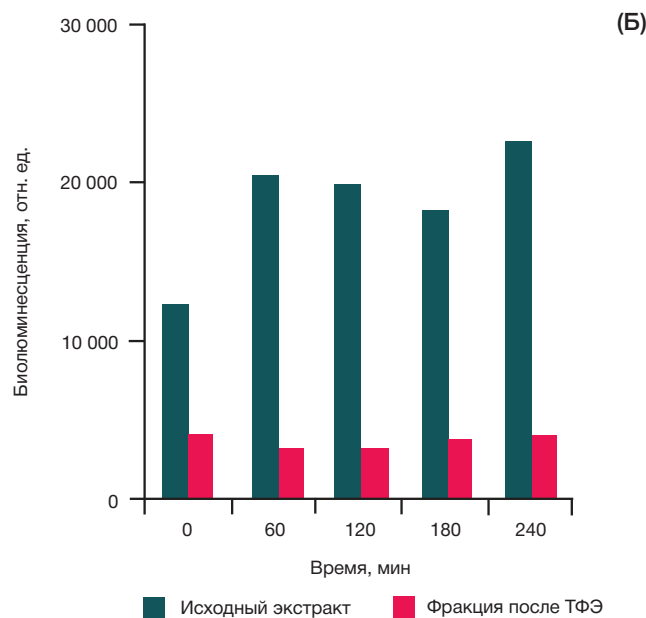
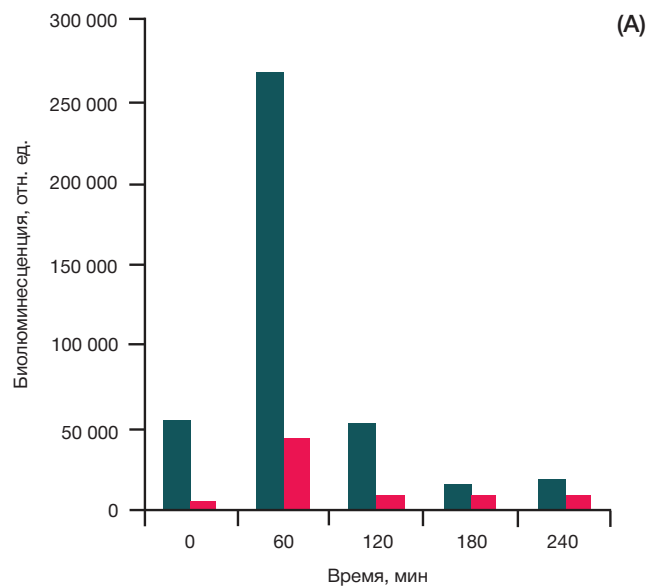


Рис. 3. Зависимость биоломинесценции от времени для экстрактов листьев и ТФЭ фракций, выдержка при 0 °С: (А) — *R. nigrum*; (Б) — *B. pendula*; (В) — экстракты из свежих, мороженных и сушеных листьев *B. pendula*

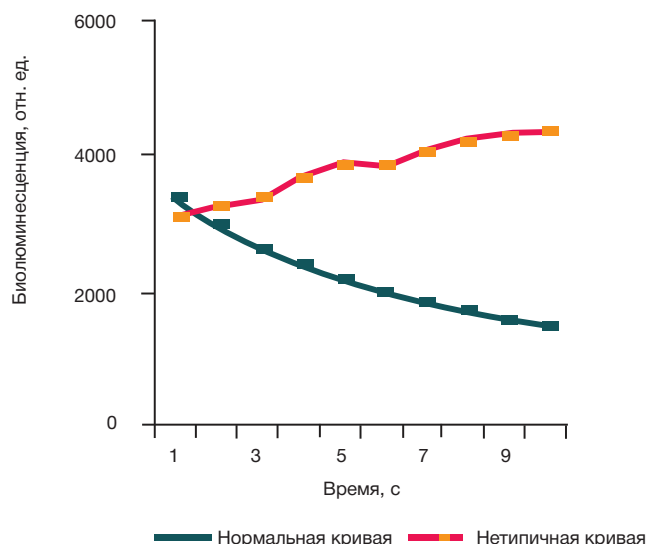


Рис. 4. Кривые измерения биолуминесцентной активности двух фракций *V. penidula*, после ВЭЖХ

неразделенные пики, несколько активных фракций присутствовали в конце хроматограммы. Никакой корреляции между основными хроматографическими пиками и люминесцентной активностью установить было невозможно. Следует отметить, что биолуминесцентная активность, как правило, сопровождалась наличием зеленой окраски фракций (поглощение около 650 нм). Была проведена попытка разделения отдельных фракций на той же колонке, но из-за химической нестабильности биолуминесцентная активность после повторной хроматографии не выявилась.

В следующем опыте была сделана попытка использовать ацетон в качестве компонента подвижной фазы для ВЭЖХ. Ацетон не вполне подходит при спектрофотометрическом детектировании, так как поглощает в нижней области спектра (300 нм и менее). Учитывая имеющиеся данные, мы предположили, что биолуминесцентные субстраты должны поглощать в области более 300 нм, и это позволяет использовать ацетон. Полученная хрома-

тограмма и профиль активности показаны на рис. 7. Результаты измерений указывают на присутствие нескольких активных компонентов. Однако величина активности и соответствующая масса активных компонентов были недостаточно высокими, чтобы перейти к второй ступени хроматографии.

И наконец, кроме вышеперечисленного, для экстракта *P. natans* мы применили двумерную хроматографию с быстрым разделением на полярной колонке и последующим разделением самой активной фракции на колонке с обращенной фазой (рис. 8). Чтобы минимизировать потери вещества и сохранить максимальное количество субстрата, исходные экстракты и фракции перед измерением активности не высушивались. Самая активная фракция, отмеченная между 3 и 3,5 мин хроматограммы на первой колонке, была сконцентрирована до 100 мкл и нанесена на вторую колонку. На хроматограмме второго разделения было выделено два пика в районе 11,5 и 12 мин, но разделение было неполным, а интенсивность люминесценции оказалась низкой.

Была проведена оценка потерь активных соединений в *P. natans* на каждом шаге разделения путем соответствующего измерения БЛ (табл. 5). Рассчитывали общую активность растворов исходных экстрактов и фракций с учетом изменения их объемов. Оказалось, что потери происходили после каждой операции и к концу эксперимента сохранялось лишь 0,2 % исходной величины активности.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение образцов листьев растений, содержащих соединения с БЛ активностью, показало, что наша первоначальная гипотеза о присутствии в них гиспидина или 3-гидроксигиспидина не подтвердилась. Во всех случаях для реакции люминесценции не требовалось присутствия НАД(Ф)Н, что указывало на большее сходство активных растительных компонентов, необходимых для люминесценции, с грибным люциферинном, но не с гиспидином. Однако при выборе условий хроматографии, аналогичных тем, что были использованы при выделении грибного



Рис. 5. Разделение экстракта *P. natans* методом ВЭЖХ (УФ-детектор при 430 нм; синяя линия), люминесценция фракций (красная линия) и состав подвижной фазы (голубая линия). Остальное в табл. 2 и 3

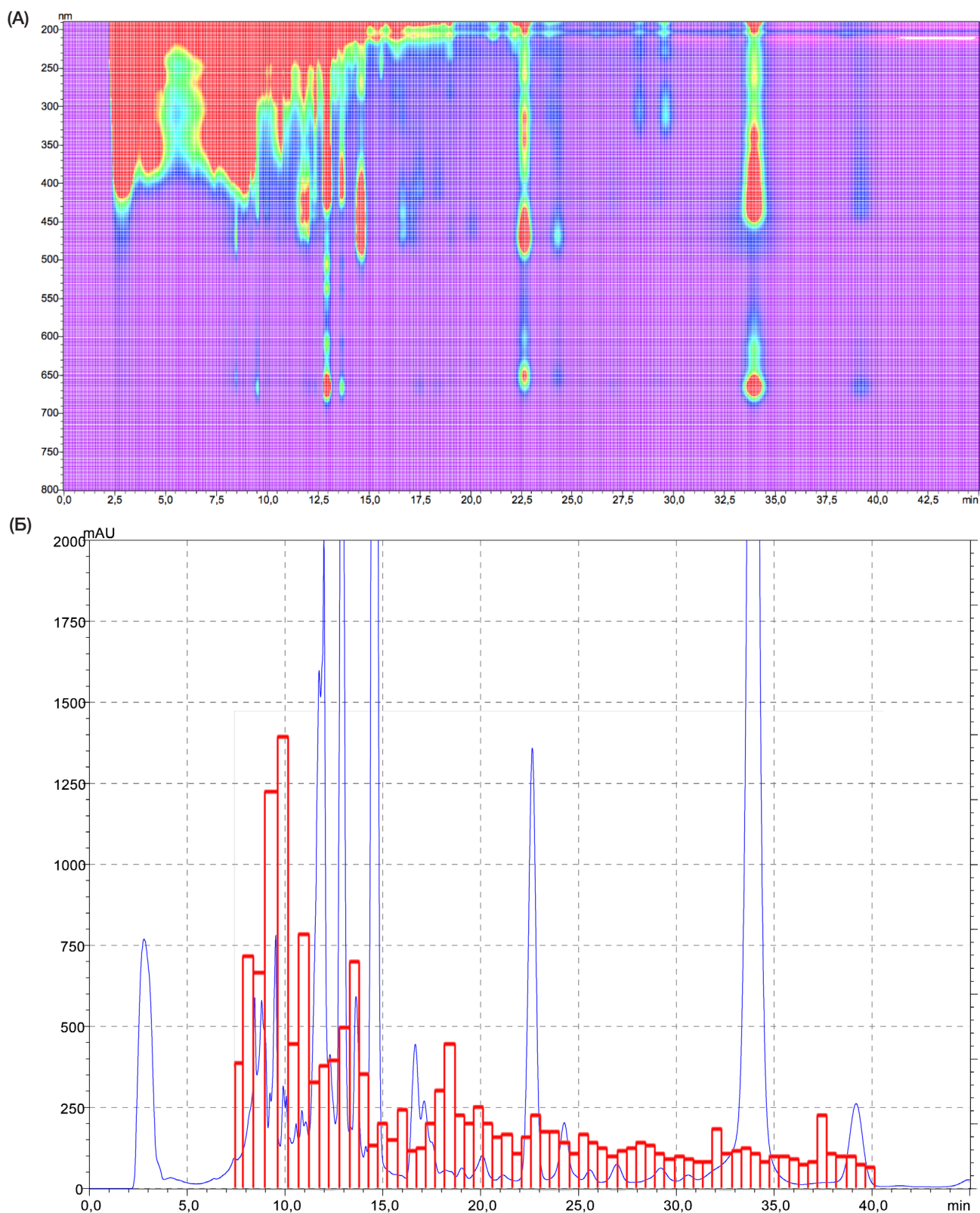


Рис. 6. Разделение методом ВЭЖХ и люминесценция экстракта *B. pendula*: (А) — профиль ультрафиолетового/видимого излучения; (Б) — хроматограмма (синяя линия) и биоломинесцентная активность (красная линия). Остальные условия в табл. 2 и 3

люциферина [13], никаких активных компонентов во фракциях ВЭЖХ выявить не удалось.

Наличие многих активных фракций при хроматографическом разделении экстрактов свидетельствует о том, что каждое растение синтезирует не одно, а несколько соединений, являющихся субстратами для люцифера-

зы гриба. Кроме того, различие хроматографических условий для разделения компонентов экстрактов разных растений показывает, что наборы таких соединений весьма разнообразны.

Обнаруженное при выдержке экстрактов на льду аномальное увеличение во времени биоломинесцентной

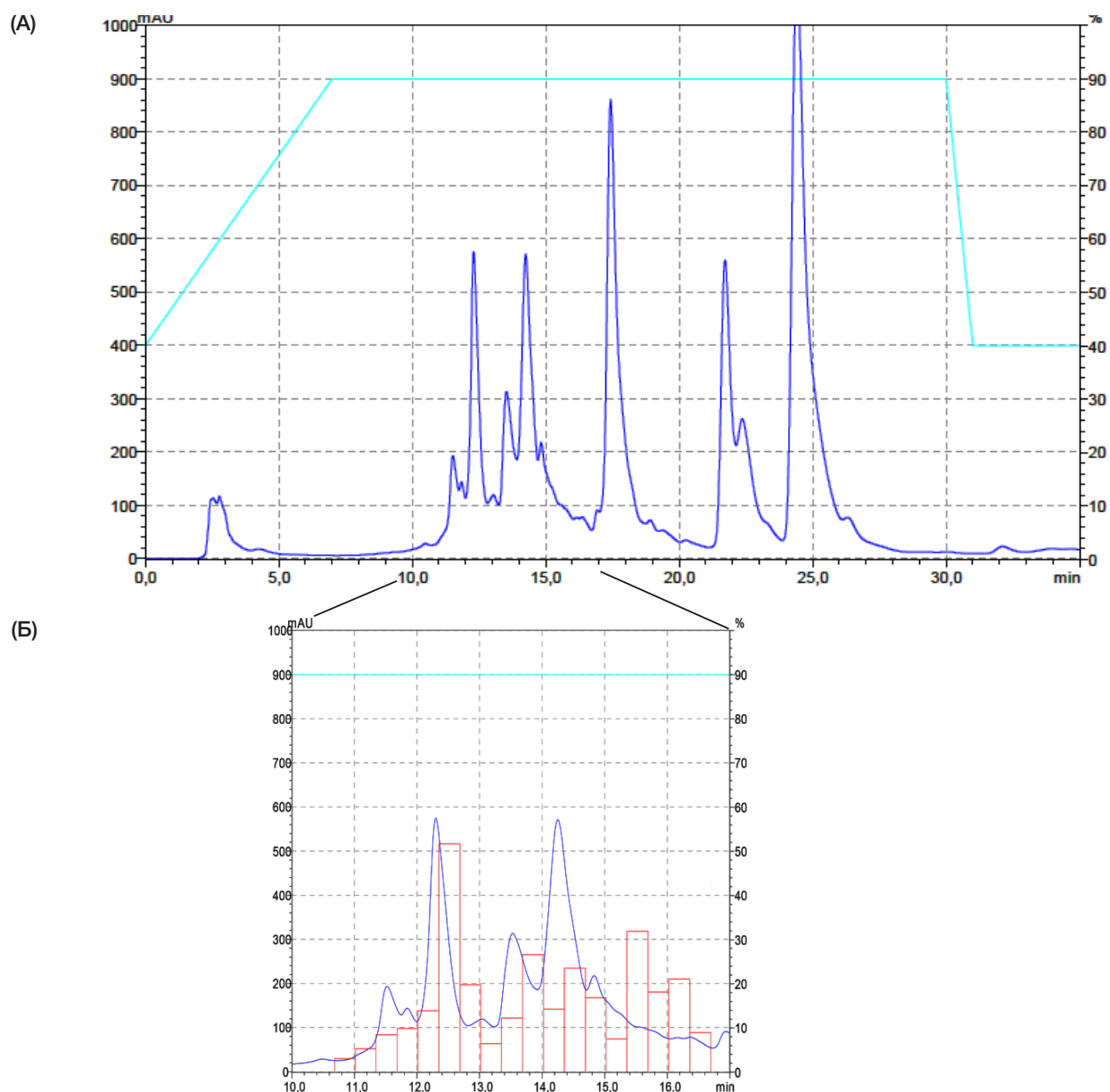


Рис. 7. Разделение экстракта *P. natans* методом ВЭЖХ с использованием ацетона в качестве компонента подвижной фазы: **(А)** — хроматограмма (УФ-детектор при 430 нм; синяя линия), **(Б)** — часть хроматограммы между 10 и 17 мин (синяя линия), люминесценция фракций (красная линия) и состав подвижной фазы (голубая линия). Остальное в табл. 2 и 3

активности органических экстрактов позволяет предполагать, что в них могут протекать реакции, приводящие к снижению концентрации одних активных соединений и повышению концентрации других соединений. Однако ни одного стабильного субстрата обнаружить не удалось, так как люминесценция экстрактов всех 10 растений быстро снижалась при комнатной температуре.

Нами были применены различные модификации методов подготовки экстрактов и их сепарации, чтобы определить, какой вариант позволит удовлетворить противоречивым требованиям максимального извлечения, максимальной сохранности и селективного выделения индивидуального нестабильного соединения из сложной смеси растительного экстракта. В одних случаях экстракты предварительно фракционировали с помощью ТФЭ перед проведением ВЭЖХ, а в других — сразу вводились на хроматографическую колонку. Для дополнительного концентрирования мы пробовали сушить экстракты и повтор-

но растворять в меньшем объеме растворителя, это же касалось растворов хроматографических фракций перед измерением люминесценции; использовали разные органические растворители как компоненты подвижной фазы для ВЭЖХ; применили последовательную хроматографию на колонках разной полярности (двумерную хроматографию).

К сожалению, стабильность всех обнаруженных активных соединений оказалась недостаточной для достижения поставленной цели — выделения какого-либо субстрата в количестве, достаточном для установления его структуры и свойств.

Выводы

В природе не существует биолюминесцентных растений, поэтому их создание методами синтетической биологии

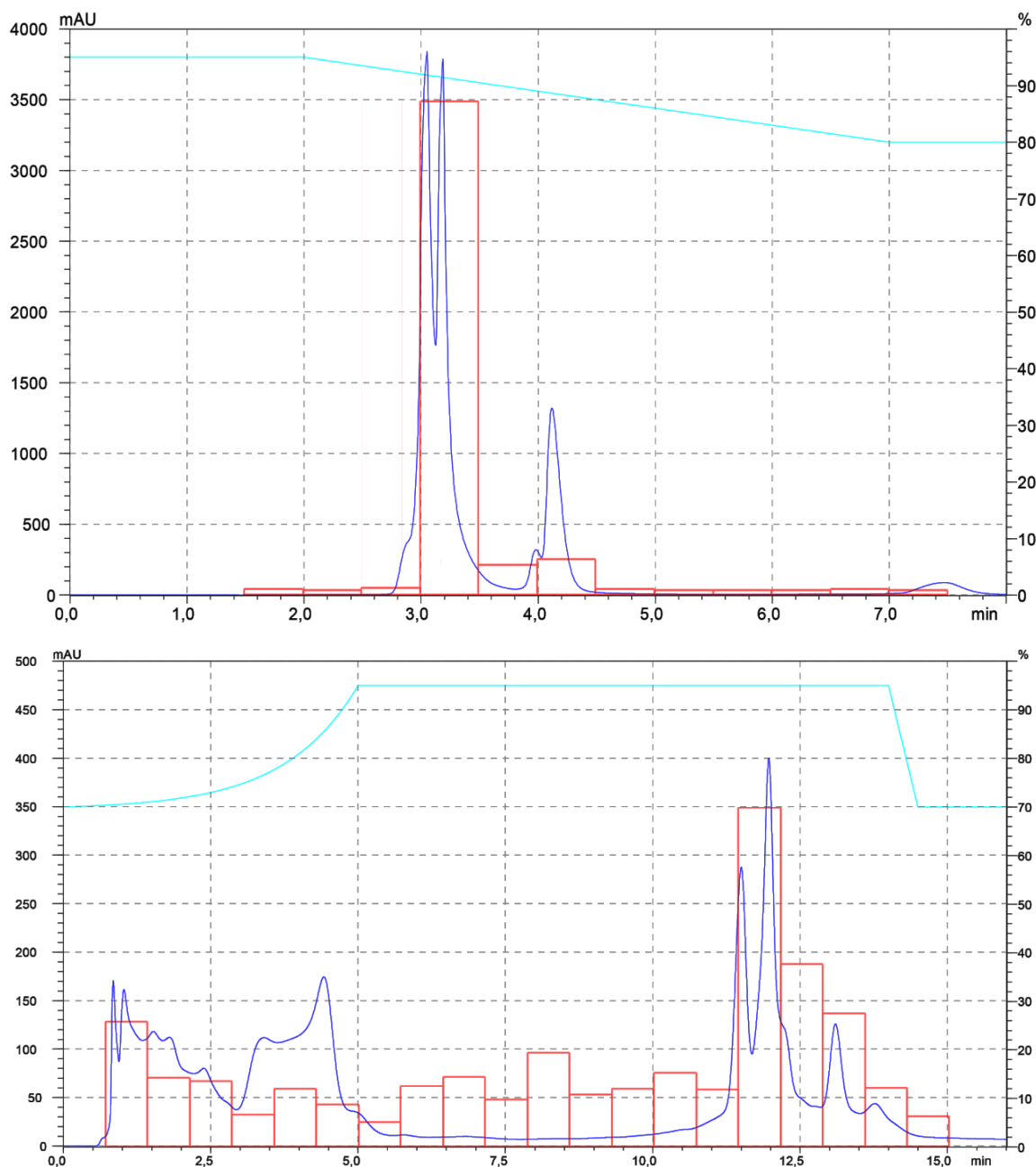


Рис. 8. Разделение экстракта *P. natans* методом двумерной ВЭЖХ: хроматограммы (УФ-детектор при 430 нм; синяя линия), люминесценция (красная линия) и состав подвижной фазы (голубая линия). (А) — колонка с диольной фазой, (Б) — колонка с обращенной фазой. Остальное в табл. 2 и 3

Таблица 5. Потери активности в процессе разделения (к рис. 8)

Фаза	Активность а, отн. ед.	V_1/V_2^*	Общая активность A^{**} , отн. ед.	Общая активность по сравнению с предыдущей, %	Общая активность по сравнению с исходной, %
Экстракция	280 000	100/1	28 000 000	100	100
Хроматография, этап 1	52 000	500/10	260 000	9	9
Фракционирование	45 000	500/10	230 000	87	8
Сушка	27 000	100/3	890 000	39	3
Хроматография, этап 2	6 500	500/10	33 000	37	1
Фракционирование	1 200	500/10	59 000	18	0,2

Примечание. * — V_1 — общий объем раствора, V_2 — объем раствора для измерения; ** — $A = a \cdot V_1/V_2$.

представляет собой интересную задачу. В результате проведенного исследования мы выяснили, что некоторые компоненты растений могут реагировать с люциферазой гриба и реакция сопровождается люминесценцией. Все потенциальные субстраты, содержащиеся в изученных в данной работе растениях, оказались химически нестабильными, что не позволило провести их выделение и охарактеризовать химическую структуру. Тем не менее настоящая работа позволяет сделать следующие выводы, полезные для дальнейших попыток создания автономно люминесцентных растений: люминесцентные субстраты

люциферазы, имеющиеся в экстрактах растительного сырья, не идентичны грибному люциферину (3-гидрокси-гиспидину); изученные виды растений синтезируют множество различных активных соединений. Таким образом, наше исследование можно считать первым шагом в создании люминесцентного растения. По-видимому, наиболее перспективным направлением дальнейшей работы по созданию люминесцентных растений представляется поиск генов, ответственных за синтез 3-гидроксигиспидина, а также гена люциферазы грибов, и экспрессия этих генов в трансгенных растениях.

Литература

- Dubois R. Fonction photogenique des pyrophores. C R Seances Soc Biol Fil. 1885; 37: 559–62. French.
- Harvey EN. A History of Luminescence from the Earliest Times Until 1900. Philadelphia, USA: American Philosophical Society; 1957.
- Shimomura O. Bioluminescence: Chemical Principles and Methods. Singapore: World Scientific Publishing; 2006.
- Ow DW, DE Wet JR, Helinski DR, Howell SH, Wood KV, Deluca M. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. Science. 1986 Nov 14; 234 (4778): 856–9.
- Koncz C, Olsson O, Langridge WHR, Schell J, Szalay AA. Expression and assembly of functional bacterial luciferase in plants. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Jan; 84 (1): 131–5.
- Barnes WM. Variable patterns of expression of luciferase in transgenic tobacco leaves. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Dec; 87 (23): 9183–7.
- Evans A. Glowing Plants: Natural Lighting with no Electricity. Kickstarter campaign [Internet]. [cited 2017 Apr 3]; [about 20 screens]. Available from: <https://www.kickstarter.com/projects/antonyevans/glowing-plants-natural-lighting-with-no-electricity>
- Oliveira AG, Desjardin DE, Perry BA, Stevani CV. Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages. Photochem Photobiol Sci. 2012 May; 11 (5): 848–52.
- Airth RL. Characteristics of cell-free fungal bioluminescence. In: McElroy WD, Glass B, editors. Light and Life. Baltimore, Md.: Johns Hopkins Press; 1961. p. 262–73.
- Airth RL, Foerster GE. The isolation of catalytic components required for cell-free fungal bioluminescence. Arch Biochem Biophys. 1962 Jun; 97: 567–73.
- Isobe M, Uyakul D, Goto T. Lampteromyces bioluminescence. II. Lampteroflavin, a light emitter in the luminous mushroom Lampteromyces japonicus. Tetrahedron Lett. 1988; 44: 1169–72.
- Hayashi S, Fukushima R, Wada N. Extraction and purification of a luminiferous substance from the luminous mushroom Mycena chlorophos. Biophysics (Nagoya-shi). 2012 Jul 6; 8: 111–4.
- Purtov KV, Petushkov VN, Baranov MS, Mineev KS, Rodionova NS, Kaskova ZM, et al. The Chemical Basis of Fungal Bioluminescence. Angew Chem Int Ed Engl. 2015 Jul 6; 54 (28): 8124–8.
- Lee IK, Yun BS. Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus* spp., and their medicinal importance. J Antibiot (Tokyo). 2011 May; 64 (5): 349–59.
- Tu PTB, Tawata S. Anti-Obesity Effects of Hispidin and *Alpinia zerumbet* Bioactives in 3T3-L1 Adipocytes. Molecules. 2014 Oct 15; 19 (10): 16656–71.
- Be Tu PT, Chompoo J, Tawata S. Hispidin and related herbal compounds from *Alpinia zerumbet* inhibit both PAK1-dependent melanogenesis in melanocytes and reactive oxygen species (ROS) production in adipocytes. Drug Discov Ther. 2015 Jun; 9 (3): 197–204.
- Nguyen BC, Taira N, Tawata S. Several herbal compounds in Okinawa plants directly inhibit the oncogenic/aging kinase PAK1. Drug Discov Ther. 2014 Dec; 8 (6): 238–44.
- Yousfi M, Djeridane A, Bombarda I, Chahrazed-Hamia, Duhem B, Gaydou EM. Isolation and characterization of a new hispolone derivative from antioxidant extracts of *Pistacia atlantica*. Phytother Res. 2009 Sep; 23 (9): 1237–42.
- Benarous K, Bombarda I, Iriepa I, Moraleda I, Gaetan H, Linani A, et al. Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase: In silico and in vitro studies. Bioorg Chem. 2015 Oct; 62: 1–7.
- Wei HA, Lian TW, Tu YC, Hong JT, Kou MC, Wu MJ. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and oxidative burst in polymorphonuclear neutrophils by caffeic acid and hispidin derivatives isolated from sword brake fern (*Pteris ensiformis* Burm.). J Agric Food Chem. 2007 Dec 26; 55 (26): 10579–84.
- Samappito S, Page J, Schmidt J, De-Eknamkul W, Kutchan TM. Molecular characterization of root-specific chalcone synthases from *Cassia alata*. Planta. 2002 Nov; 216 (1): 64–71.
- Samappito S, Page JE, Schmidt J, De-Eknamkul W, Kutchan TM. Aromatic and pyrone polyketides synthesized by a stilbene synthase from *Rheum tataricum*. Phytochemistry. 2003 Feb; 62 (3): 313–23.
- Sarker SD, Nahar L, editors. Natural Products Isolation. Methods in Molecular Biology, vol. 864. New York: Springer Science+Business Media; 2012.

References

- Dubois R. Fonction photogenique des pyrophores. C R Seances Soc Biol Fil. 1885; 37: 559–62. French.
- Harvey EN. A History of Luminescence from the Earliest Times Until 1900. Philadelphia, USA: American Philosophical Society; 1957.
- Shimomura O. Bioluminescence: Chemical Principles and Methods. Singapore: World Scientific Publishing; 2006.
- Ow DW, DE Wet JR, Helinski DR, Howell SH, Wood KV, Deluca M. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. Science. 1986 Nov 14; 234 (4778): 856–9.
- Koncz C, Olsson O, Langridge WHR, Schell J, Szalay AA. Expression and assembly of functional bacterial luciferase in plants. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Jan; 84 (1): 131–5.
- Barnes WM. Variable patterns of expression of luciferase in transgenic tobacco leaves. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Dec; 87 (23): 9183–7.
- Evans A. Glowing Plants: Natural Lighting with no Electricity. Kickstarter campaign [Internet]. [cited 2017 Apr 3]; [about 20 screens]. Available from: <https://www.kickstarter.com/projects/antonyevans/glowing-plants-natural-lighting-with-no-electricity>
- Oliveira AG, Desjardin DE, Perry BA, Stevani CV. Evidence

- that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages. *Photochem Photobiol Sci*. 2012 May; 11 (5): 848–52.
9. Airth RL. Characteristics of cell-free fungal bioluminescence. In: McElroy WD, Glass B, editors. *Light and Life*. Baltimore, Md.: Johns Hopkins Press; 1961. p. 262–73.
 10. Airth RL, Foerster GE. The isolation of catalytic components required for cell-free fungal bioluminescence. *Arch Biochem Biophys*. 1962 Jun; 97: 567–73.
 11. Isobe M, Uyakul D, Goto T. *Lampteromyces* bioluminescence. II. Lampteroflavin, a light emitter in the luminous mushroom *Lampteromyces japonicus*. *Tetrahedron Lett*. 1988; 44: 1169–72.
 12. Hayashi S, Fukushima R, Wada N. Extraction and purification of a luminiferous substance from the luminous mushroom *Mycena chlorophos*. *Biophysics (Nagoya-shi)*. 2012 Jul 6; 8: 111–4.
 13. Purtov KV, Petushkov VN, Baranov MS, Mineev KS, Rodionova NS, Kaskova ZM, et al. The Chemical Basis of Fungal Bioluminescence. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2015 Jul 6; 54 (28): 8124–8.
 14. Lee IK, Yun BS. Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus* spp., and their medicinal importance. *J Antibiot (Tokyo)*. 2011 May; 64 (5): 349–59.
 15. Tu PTB, Tawata S. Anti-Obesity Effects of Hispidin and Alpinia zerumbet Bioactives in 3T3-L1 Adipocytes. *Molecules*. 2014 Oct 15; 19 (10): 16656–71.
 16. Be Tu PT, Chompoo J, Tawata S. Hispidin and related herbal compounds from *Alpinia zerumbet* inhibit both PAK1-dependent melanogenesis in melanocytes and reactive oxygen species (ROS) production in adipocytes. *Drug Discov Ther*. 2015 Jun; 9 (3): 197–204.
 17. Nguyen BC, Taira N, Tawata S. Several herbal compounds in Okinawa plants directly inhibit the oncogenic/aging kinase PAK1. *Drug Discov Ther*. 2014 Dec; 8 (6): 238–44.
 18. Yousfi M, Djeridane A, Bombarda I, Chahrazed-Hamia, Duhem B, Gaydou EM. Isolation and characterization of a new hispolone derivative from antioxidant extracts of *Pistacia atlantica*. *Phytother Res*. 2009 Sep; 23 (9): 1237–42.
 19. Benarous K, Bombarda I, Iriepa I, Moraleda I, Gaetan H, Linani A, et al. Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase: In silico and in vitro studies. *Bioorg Chem*. 2015 Oct; 62: 1–7.
 20. Wei HA, Lian TW, Tu YC, Hong JT, Kou MC, Wu MJ. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and oxidative burst in polymorphonuclear neutrophils by caffeic acid and hispidin derivatives isolated from sword brake fern (*Pteris ensiformis* Burm.). *J Agric Food Chem*. 2007 Dec 26; 55 (26): 10579–84.
 21. Samappito S, Page J, Schmidt J, De-Eknamkul W, Kutchan TM. Molecular characterization of root-specific chalcone synthases from *Cassia alata*. *Planta*. 2002 Nov; 216 (1): 64–71.
 22. Samappito S, Page JE, Schmidt J, De-Eknamkul W, Kutchan TM. Aromatic and pyrone polyketides synthesized by a stilbene synthase from *Rheum tataricum*. *Phytochemistry*. 2003 Feb; 62 (3): 313–23.
 23. Sarker SD, Nahar L, editors. *Natural Products Isolation. Methods in Molecular Biology*, vol. 864. New York: Springer Science+Business Media; 2012.