

1) ) а есть неактивные пептиды, производимые организмом просто так??

***АКТИВНЫЙ ПЕПТИД,  
ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ ЛУКОВИЦ ЛУКА  
РЕПЧАТОГО ALLIUM SERA L.***

*Лаборатория Физиологически активных биополимеров №323*

*Выполнил: студент 5-го курса РХТУ им. Д.И. Менделеева  
Рощин А.О.*

*Научный руководитель: к.б.н. н.с.  
Куликова О.Г.*

1) Важнейшие – минимум спорно! 2) две группы законов физики, ну вы помните 3) белки первой группы никакой функции не несут? 4) в первой группе все изучены и именно такие функции имеют, а во второй группе функции, даже малоизученные, другие?

# Пептиды

- **Важнейший класс низкомолекулярных биорегуляторов.**
- **В растительных системах допускают существование двух групп пептидов**
- **I группа - пептиды, участвующие в ростовых процессах, межклеточной сигнализации, устойчивости растений к патогенам и т.д. Эти пептиды образуются в результате селективного расщепления белков-предшественников.**
- **II группа, клеточные эффекты для которой пока мало изучены - результат протеолитической деградации белков, имеющих собственную хорошо изученную функцию.**

# Мембранотропные гомеостатические тканеспецифические биорегуляторы (МГТБ)

- **Обнаружены ранее в различных тканях млекопитающих и растений**
- **Стимулируют процессы репарации и восстановления тканей *in vivo***
- **Оказывают протекторное действие на клетки *in vitro***
- **Характеризуются отсутствием видовой, но наличием тканевой специфичности.**

1) К ЧЕМУ ВООБЩЕ ПЕРВОЕ УТВЕРЖДЕНИЕ? КОГДА БЫЛИ ОБНАРУЖЕНЫ? 2) ТАКИ ПРИ ЧЁМ ТУТ ВАШ ПЕПТИД, ВЕДЬ МГТБ не ускоряют/запускают рост, значит ваш не МГТБ 3) про специфичность – требуются пояснения, то есть видовой нет – значит один пептид не будет на все виды лука действовать одинаково, или на все виды растений? Тогда как же ваши лекарства из растений на людей действуют (см. дисер куликовой)

# Мембранотропные гомеостатические тканеспецифические биорегуляторы (МГТБ)

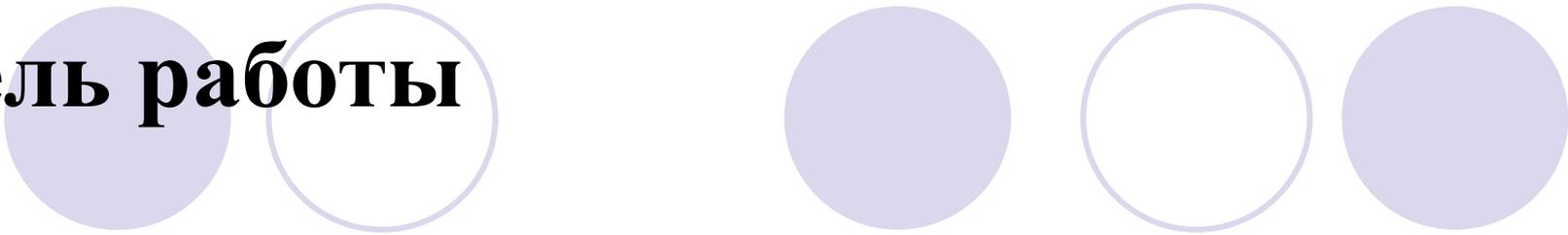
Характеризуются сложным составом:

Пептидно-белковый комплекс ( $10^{-8}$  -  $10^{-15}$  мг/мл)

- Биологически активные пептиды;
- Связанные с ними посредством ионов  $\text{Ca}^{2+}$  высокомолекулярные белки-модуляторы;
- Липиды, углеводы;

с кем связаны белки-модуляторы? 4) так мгтб комплекс, или индивидуальные соединения? 5) кстати, к чему тут эти концентрации, при концентрациях больше и меньше они уже ничего не регулируют? И есть доказательства?

# Цель работы



- *Выделение эндогенного пептида из луковиц лука репчатого *Allium* сера L. и установление его активности.*

# Объект исследования

Лук репчатый (*Allium cepa* L.)

- многолетнее растение семейства Амариллисовых (AGP II).

Лук репчатый проявляет следующие свойства:

- антиаллергическое
- противовоспалительное
- антимикробное
- противогрибковое

По действию – это их хотелки, не более, доказательств нет внятных! Да, конец предложения – что то тут с русским языком...

Обладает противораковым, антимуtagenным и антигипергликемическим и др действиями.

# Задачи исследования

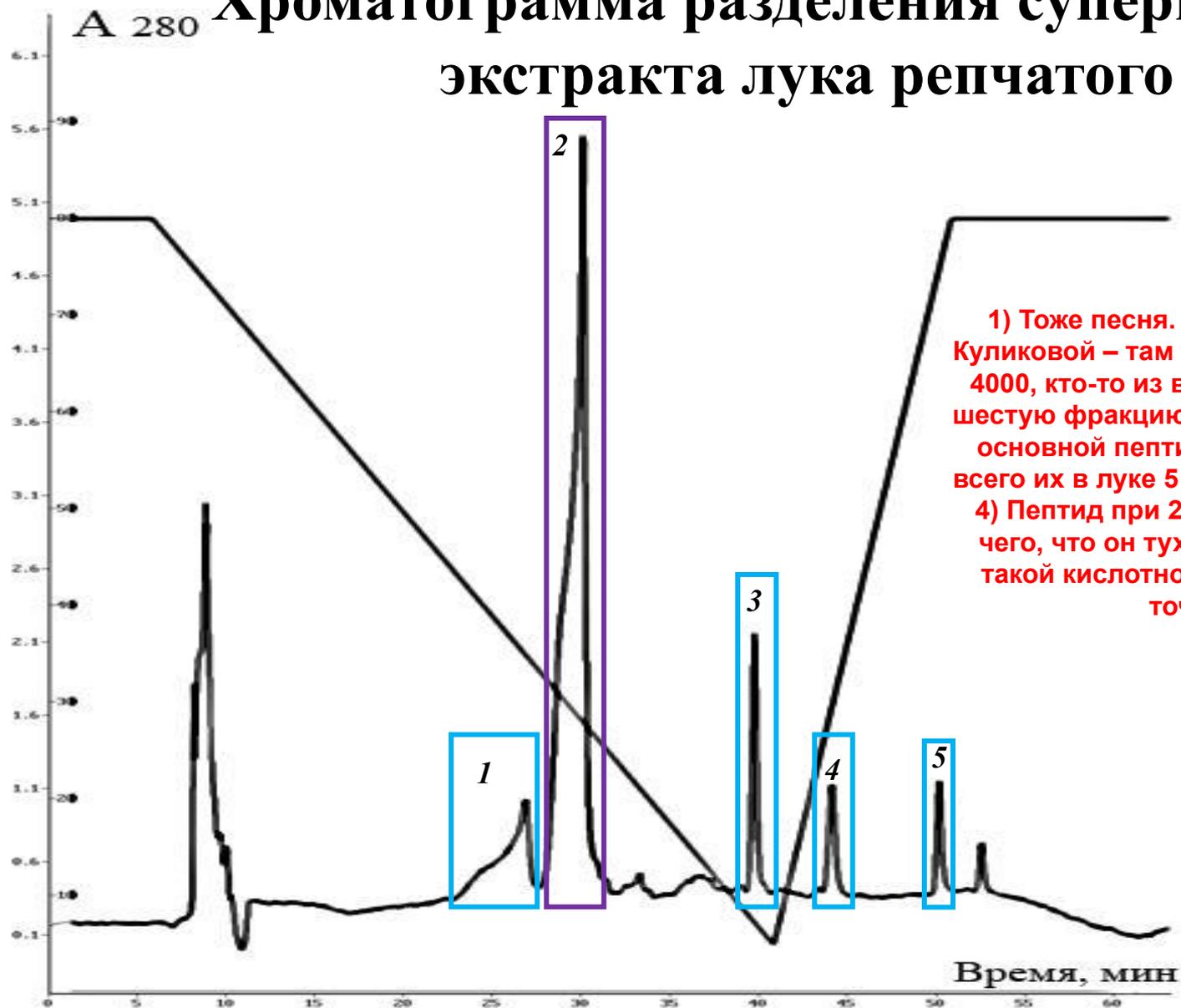
- Получение экстракта ткани лука репчатого (*Allium cepa* L.);
- Выделение пептида из супернатанта экстракта ткани лука репчатого (*Allium cepa* L.) с помощью фракционирования растительного экстракта с последующим разделением методом обращённо-фазовой ВЭЖХ;
- Идентификация полученного пептида методом MALDI-TOF масс-спектрометрического и аминокислотного анализов;
- Исследование биологической активности полученного пептида на модели прорастания семян лука репчатого.

# Методика фракционирования экстракта



1) 21 день на центрифуге??? 2) ПРО ДИАЛИЗ ПРИ +4! ПРИ КОМНАТНОЙ ВСЁ ДЕЛАЕТЕ! И СКОЛЬКО РАЗ? И КАКАЯ ВОДИЧКА БЫЛА? вранье 3) ха, уже отсюда вопрос – как соблюдали на всех этапах стерильность? Ответ – НИКАК!!!! 4) +40 на испарителе, таки точность поддержания температуры какова, ибо 41 уже начинается смерть пептидов пожалуй, тут хватит, работа уже стала равна нулю...

# Хроматограмма разделения супернатанта экстракта лука репчатого

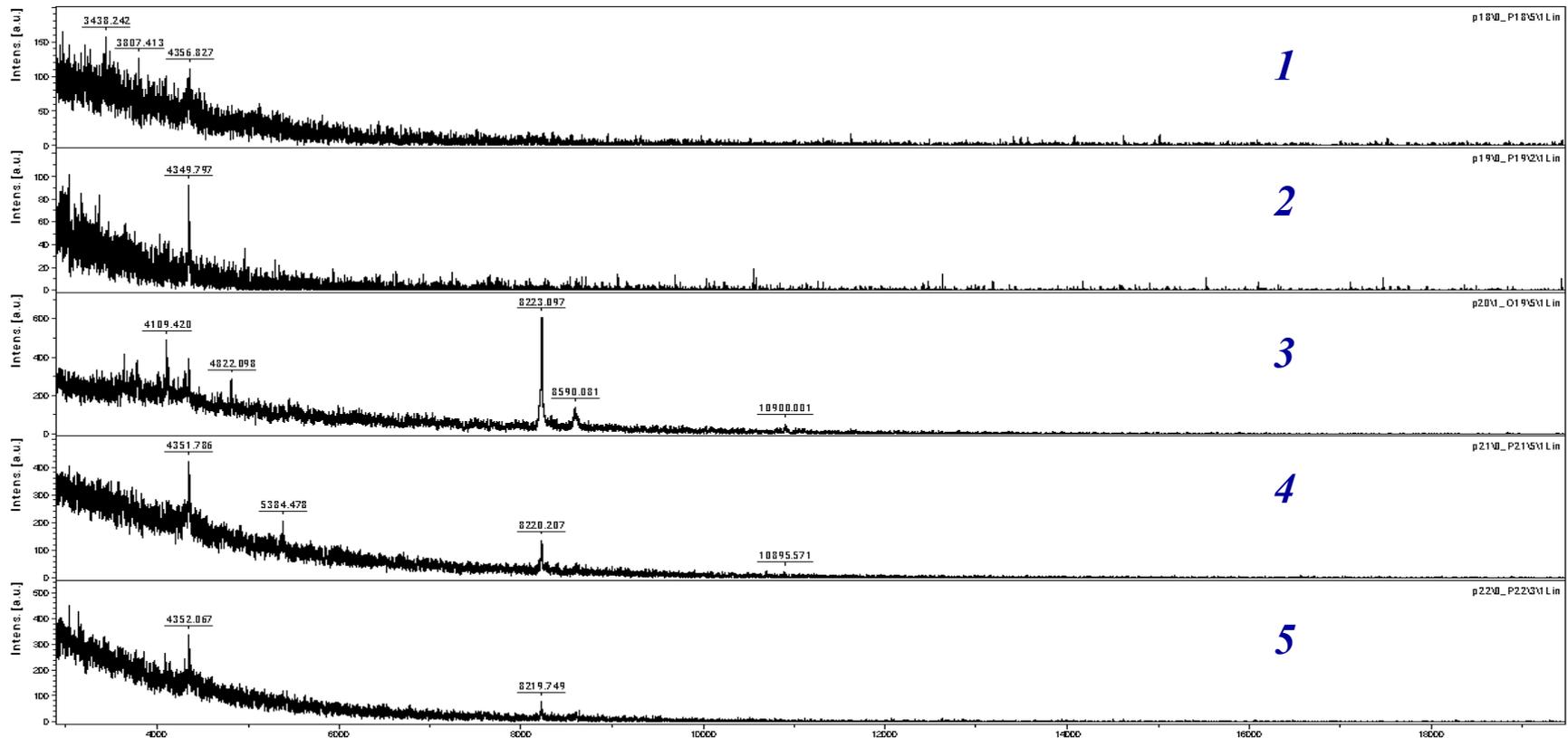


1) Тоже песня. Смотрим работу Куликовой – там только один пик на 4000, кто-то из вас двоих 2) зачем шестую фракцию обидели 3) значит основной пептид ваш второй? И всего их в луке 5 штук, так, али нет? 4) Пептид при 2.2 пэаш гоним, ни чего, что он тухнуть должен при такой кислотности, частично уж точно?

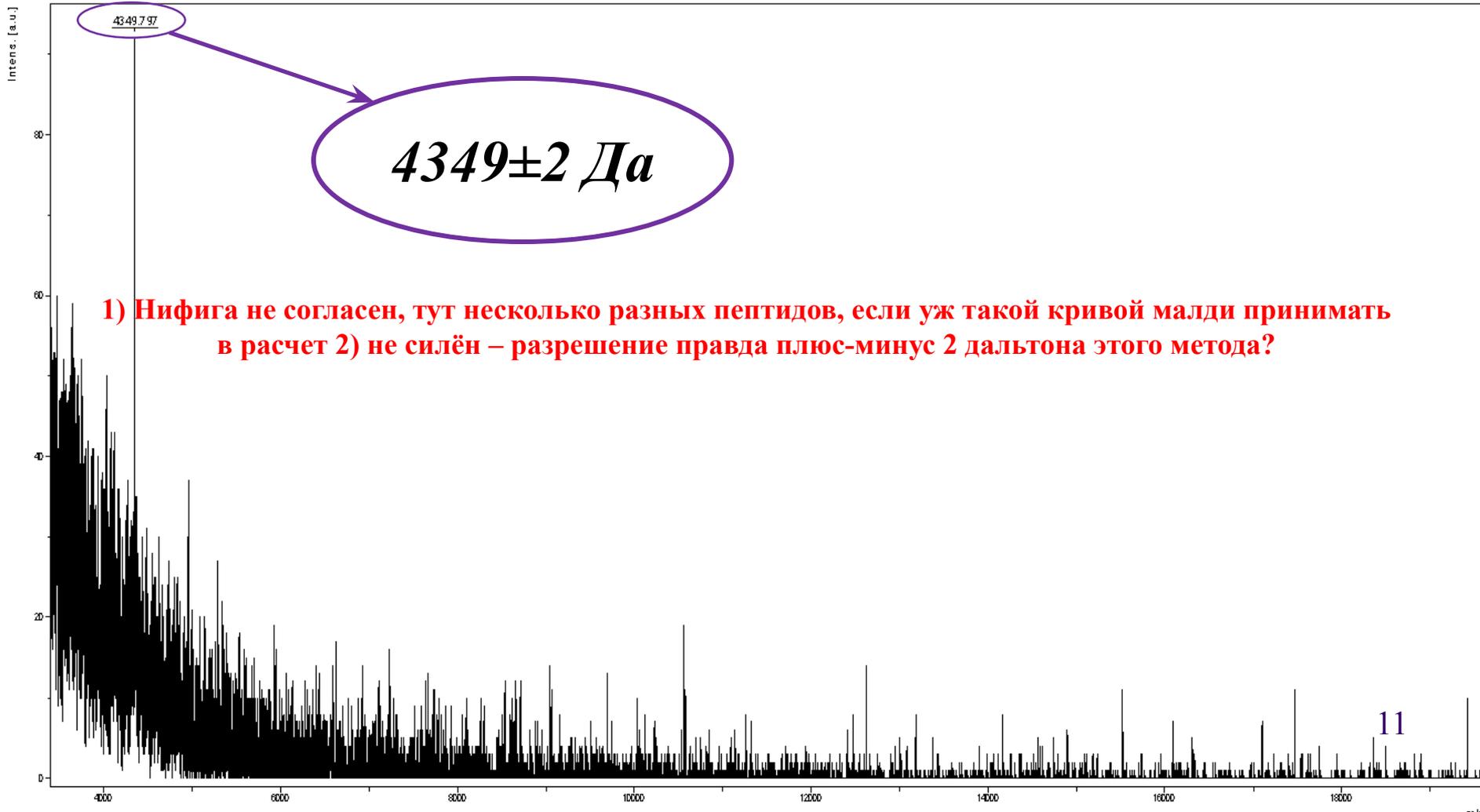
*Колонка (4.6×250 мм) Kromasil C18 (Россия). Элюцию осуществляли в градиенте концентрации ацетонитрила (24-96%) в 0.1%-ной трифторуксусной кислоте (pH 2.2) со скоростью 0.5 мл/мин в течение 70 мин. Детекцию проводили при 280 нм.*

# MALDI-TOF масс-спектры фракций 1-5

- 1) куча мусорных пиков помечена, которые в шумах, с такой чистотой работать нельзя, тут не понять чистота или смесь веществ – в итоге чистота и однородность пептида не доказаны, забудьте вообще о нём  
2) ну где тут 4036 пептид куликовой из диссертации? ))) 3) ПРИКОЛЬНЫЕ ТАМ ЕСТЬ ПЕПТИДИКИ НА 10000, ЭТО БЕЛОК, КОТОРЫЙ УЖЕ ДАВНО Д.Б. ОТВАЛИТЬСЯ ПРИ ТАКОЙ-ТО ОБРАБОТКЕ 4) ОПЯТЬ-ТАКИ СТЕРИЛЬНОСТЬ 5) во фракции 2 даже с таким разрешением несколько пиков



# MALDI-TOF масс-спектр фракции 2



1) Нифига не согласен, тут несколько разных пептидов, если уж такой кривой малди принимать в расчет 2) не силён – разрешение правда плюс-минус 2 дальтона этого метода?

# Результаты анализа аминокислотного состава

1) Исходя из предыдущего слайда тут у вас не один пептид, а несколько, вы вообще неясно чем занимаетесь, и эта смесь суммарная аминокислот для всех пептидов, завязывайте со сказками

Название аминокислоты	Сокращение	Количество аминокислот
Аспарагиновая кислота + аспарагин	Asx	2
Серин	Ser	6
Глутамин + глутаминовая кислота	Glx	5
Аланин	Ala	2
Глицин	Gly	17
Треонин	Thr	2
Пролин	Pro	2
Валин	Val	1
Метионин	Met	1
Изолейцин	Ile	1
Лейцин	Leu	2
Тирозин	Tyr	1
Фенилаланин	Phe	1
Лизин	Lys	2
Гистидин	His	1
Аргинин	Arg	1

## Итого:

- Молекулярная масса согласно анализу:

4346,06 Да

- Молекулярная масса согласно MALDI-TOF методу:

4349,70 Да

- Таким образом

$\Delta = 3,64$  Да

**Результаты исследования пептида с молекулярной массой  $4349 \pm 2$  Да на модели прорастания семян лука репчатого, концентрация соответствует  $10^{-12}$  мг/мл**

**Эксперимент был проведен согласно ГОСТу 12038-84**

	<b>Длина побега, мм</b>	<b>Масса побега, мг</b>
<b>Контроль *</b>	<b><math>28,6 \pm 2,9</math></b>	<b><math>9,52 \pm 1,1</math></b>
<b>Опыт *</b>	<b><math>39,9 \pm 3,6</math></b>	<b><math>13,7 \pm 1,3</math></b>
<b>Эффект, %</b>	<b>39-41</b>	<b>42-44</b>

**\* Данные статистически достоверны при  $p < 0.05$**

# Выводы

- 1) Из ткани луковиц лука репчатого *Allium* сера L. был выделен эндогенный пептид с молекулярной массой  $4349 \pm 2$  Да и определен его аминокислотный состав;
- 2) Показано, что данный пептид с молекулярной массой  $4349 \pm 2$  Да оказывает стимулирующее действие на прорастание семян лука репчатого *Allium* сера L.

Если читали внимательно выше – то оба вывода не верны.

# Публикации и конференции



Круто, первое место за такое???? С ужасом думаю, что же тогда было вообще на этой сессии



1) Сборник тезисов XII Международной Молодежной Конференции ИБХФ РАН-ВУЗЫ "Биохимическая Физика", Школа "Современные проблемы биохимической физики", 29-31 октября 2012 г., Москва

2) Сборник тезисов XII Международной Молодежной Конференции ИБХФ РАН-ВУЗЫ "Биохимическая Физика", Школа "Современные проблемы биохимической физики", 28-30 октября 2014г., Москва



**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!!!**

))))))

**Спасибо за внимание!**

