

УДК 581.557:579.22

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ МЕТОДІВ ЕКСТРАГУВАННЯ ТА РОЗДІЛЕННЯ БІЛКІВ ДЛЯ ПРОТЕОМНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ БІЛКОВИХ ПРОФІЛІВ КОРЕНІВ І БУЛЬБОЧОК СОЇ

Ю.Ю. КОНДРАТЮК, П.М. МАМЕНКО, А.С. ЛЕВІШКО, Г.М. ДРОЗДЕНКО, С.Я. КОЦЬ

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17
e-mail: kondratyuk_yulya@ukr.net*

Найважливішим етапом у будь-якому протеомному дослідженні є екстрагування та приготування білкових зразків. Краща розчинність білків забезпечує якісніше їх розділення в гелі й, відповідно, ідентифікацію більшої кількості поліпептидів, а відтак — точніше виявлення відмінностей в експресії генів, що їх кодують. Проте низка методичних труднощів, пов'язаних насамперед зі складністю організації рослинної клітини, змушує добирати методи отримання препаратів білків у кожному конкретному випадку. В зв'язку з цим було проведено моніторинг методів отримання та електрофоретичного розділення білкових екстрактів із коренів і бульбочок сої, вирощеної за інокуляції Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* на фоні різного азотного забезпечення. Відібрано найефективніші методи для подальшого виявлення кількісних та якісних змін білкових профілів сої.

Ключові слова: *Glycine max* (L.) Merr., мікробно-рослинний симбіоз, азотфіксація, протеом, методи екстрагування білків, електрофорез.

Останнім часом дедалі більше уваги приділяється розробці нових технологій для швидкої та автоматизованої ідентифікації білків, однак найважливішим етапом у будь-якому протеомному дослідженні залишається отримання білкових препаратів [6, 14]. Ідеальний метод передбачає екстрагування й розчинення всього пулу білків, що містяться у зразку, з мінімальним включенням артефактів і небілкових компонентів. Проте з урахуванням величезного різноманіття поліпептидів за внутрішньоклітинною локалізацією, молекулярною масою, зарядом, гідрофобними властивостями, посттрансляційними модифікаціями, здатністю до утворення комплексів досі не вдалося створити універсальний метод екстрагування всього протеому хоча б якогось одного організму: умови проведення екстрагування потрібно добирати щоразу залежно від матеріалу й мети протеомного дослідження [16, 20].

Зі ще більшими проблемами стикаються при проведенні протеомних досліджень рослин. Значною мірою це пов'язано зі складнощами вирішення методичних проблем приготування білкових препаратів із рослинних тканин, які містять «баластні» для такого аналізу речовини: вторинні метаболіти, фенольні сполуки, ліпіди, органічні й нуклеїнові кислоти, полісахариди клітинних стінок, а також значно домінуючі в зелених тканинах хлоропластні білки, наприклад такі, як рибулозобісфосфаткарбоксілаза [8, 9, 13]. Деякі з цих сполук впливають на сам процес

© Ю.Ю. КОНДРАТЮК, П.М. МАМЕНКО, А.С. ЛЕВІШКО, Г.М. ДРОЗДЕНКО, С.Я. КОЦЬ, 2013

отримання білкових препаратів, інші можуть взаємодіяти з білками і при цьому істотно знижувати якість результатів подальшого протеомного аналізу (ускладнювати електрофоретичне розділення поліпептидів, впливати на кількість і чіткість розділених білкових смуг тощо) [15]. Крім цього, у клітинах рослин відносно нижчий порівняно з тваринними та бактеріальними клітинами вміст загального білка [10]. З огляду на це ефективне екстрагування білків із рослинних тканин є основною передумовою досягнення успішних результатів протеомного аналізу.

Саме тому метою нашої роботи було проведення моніторингу сучасних методів екстрагування білків, добір оптимальних для отримання препаратів із коренів та бульбочок сої за інокуляції різними за ефективністю Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* і електрофоретичного розділення одержаних білкових зразків.

Методика

У роботі використано Tn5-мутанти штаму *B. japonicum* 646: активний 21-2 та малоактивний 107, отримані методом транспозонового мутагенезу у відділі симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики НАН України [1–3].

Рослини сої (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Васильківська вирощували в умовах вегетаційного досліду в 16-кілограмових посудинах Вагнера на промитому річковому піску вологістю 60 % повної вологоємності за природного освітлення. Джерелом мінерального живлення слугувала поживна суміш Гельригеля, збагачена мікроелементами (молібден, бор, манган, мідь), з 1 та 0,25 норми азоту (1 норма азоту відповідає 708 мг $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ на 1 кг субстрату). Перед посівом простерилізоване 70 %-м розчином етанолу і промите під проточною водою протягом 1 год насіння інокулювали суспензіями бульбочкових бактерій різної ефективності, кількість бактерій становила 10^7 клітин в 1 мл.

Ефективність методів отримання білкових зразків порівнювали після екстрагування білків фенольним і SDS-буферами. У першому випадку застосовували метод, описаний Вангом [19]: 100 мг розтертого в рідкому азоті зразка коренів або бульбочок сої ресуспендували в екстракційному буфері, що містив 0,1 М *трис*-HCl, рН 8,0, 2 % SDS, 30 % сахарози, 5 % β-меркаптоетанолу, 1мМ фенілметилсульфоксиду та *трис*-HCl насичений фенол. Зразок енергійно струшували протягом 10 хв і витримували 1 год за температури -20°C . Розчин центрифугували протягом 5 хв при 16 000 об/хв і 4°C . Відбирали фенольний шар і проводили преципітацію білків трьома об'ємами попередньо охолодженого 0,1 М амоніацетату протягом 2 год за температури -20°C . Преципітовані білки осаджували центрифугуванням за 16 000 об/хв, 4°C протягом 5 хв. Отриманий осад відмивали один раз попередньо охолодженим 0,1 М амоніацетатом і один раз попередньо охолодженим 80 %-м ацетоном. Отримані білкові осадки ресуспендували в 30 мМ *трис*-HCl, рН 8,5.

Другий метод отримання білкових екстрактів полягав у SDS-екстрагуванні білків із наступним осадженням ацетоном [21]. Для цього 100 мг розтертого в рідкому азоті зразка коренів або бульбочок сої ресуспендували в такому екстракційному буфері: 0,175 М *трис*-HCl, 5 % SDS, 15 % гліцерин, 0,3 М ДТГ. Зразок енергійно струшували протягом 30 с і витримували 1 год за температури -20°C . Рештки клітин осаджували цент-

рифугуванням за 10 000 об/хв, 4 °С протягом 15 хв. Преципітацію білків проводили охолодженим ацетоном, що містив 10 % трихлороцтової кислоти, протягом 1 год за –20 °С. Преципітовані білки осаджували центрифугуванням за 10 000 об/хв, 4 °С протягом 15 хв. Білковий осад двічі промивали охолодженим 80 %-м розчином ацетону і розчиняли в 30 мМ *трис*-HCl, рН 8,5.

Концентрацію сумарного білка в отриманих екстрактах визначали за методом Бредфорда [4].

Білкові профілі отриманих зразків аналізували методом електрофорезу. Для цього готували зразки з концентрацією сумарного білка 100 мкг/мл і проводили поліакриламідний гель-електрофорез у денатуруючих умовах за Леммлі (12 %-й розподілювальний гель) [12]. Паралельно отримані білкові екстракти розділяли електрофоретично за допомогою біоаналізатора Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) з використанням стандартного протоколу й реакційної системи виробника.

Результати та обговорення

Відомо, що екстрагування білків і приготування препаратів із тканин цукрової тростини, томатів, бананів, авокадо, тютюну, сої ускладнене через високий вміст у них таких речовин, як фенольні й терпенові сполуки, органічні кислоти, вуглеводи, протеолітичні й окиснювальні ферменти [17]. Протеомні дослідження таких рослин, як рис та арабідопсис, досягли великих успіхів, а от вивченню особливостей протеому однієї з безумовно найперспективніших сільськогосподарських культур — сої — приділяється значно менша увага [5]. Масштабні протеомні дослідження сої розпочалися лише 10—15 років тому, а оптимізація методів екстрагування та розчинення білків — тільки в останні роки [11]. Під час проведення порівняльного аналізу отриманих трьома способами білкових профілів різних тканин сої та рису було виявлено значно менше плям на білкових картах першої, що могло бути результатом неповної екстракції білків сої [18]. З огляду на це запропоновано різні методики отримання білкових препаратів із різних тканин сої (табл. 1) з одночасним акцентуванням уваги на необхідності корекції їх у кожному конкретному випадку.

Після аналізу великого масиву методів екстрагування білків із різних тканин сої ми обрали дві методики, що різнилися як екстракційними, так і преципітувальними буферами. За цими методиками отримано білкові екстракти коренів і бульбочок сої, інокульованої Tn5-мутантами *B. japonicum* і вирощеної за різного азотного забезпечення. Ефективність методів оцінювали за вмістом сумарного білка в отриманих екстрактах (табл. 2). Істотної різниці за цим показником у білкових екстрактах коренів і бульбочок сої не виявлено, що свідчить про однакову ефективність і фенольного, і SDS-екстрагування для зразків сої за інокуляції як активним Tn5-мутантом бульбочкових бактерій 21-2, так і неактивним — 107. Не виявлено також залежності ефективності екстрагування білків від кількості внесеного в ґрунт мінерального азоту. Тому в подальшому ми керувались практичними аспектами виконання даних методик і зупинились на другому методі екстрагування.

Згідно з даними табл. 1, одним із найпоширеніших підходів протеомного дослідження є електрофоретичний аналіз [15]. Двовимірний еле-

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ

ТАБЛИЦЯ 1. Методи протеомних досліджень білкових екстрактів, отриманих із різних тканин сої [11]

Тканина	Екстракційний буфер	Буфер для розчинення/лізису білків	Метод протеомного аналізу
Зріле насіння	4 % CHAPS, 5 М сечовина, 2 М тиосечовина, 65 мМ ДТТ, 0,8 % амфоліти (рН 3–10)	—	1-D SDS PAGE, 2-DE, IPG, MALDI-TOF MS, Q-TOF
	50 % фенол, 0,45 М сахароза, 5 мМ ЕДТА, 0,2 % β-меркаптоетанол, 50 мМ <i>трис</i> -HCl, рН 8,8	8 М сечовина, 2 М тиосечовина, 2 % CHAPS, 2 % тритон X-100, 50 мМ ДТТ, 2 мМ TBP, 0,5 % амфоліти	1-D SDS PAGE, 2-DE, IPG, MALDI-TOF MS
	10 % ТХО в ацетоні, 0,07 % β-меркаптоетанол	9 М сечовина, 1 % CHAPS, 1 % ДТТ, 1 % амфоліти (рН 3–10)	1-D SDS PAGE, 2-DE, IPG, MALDI-TOF MS, LC-MS/MS
Насіння, що проростає	50 % фенол, 0,45 М сахароза, 5 мМ ЕДТА, 0,2 % β-меркаптоетанол, 50 мМ <i>трис</i> -HCl, рН 8,8	8 М сечовина, 2 М тиосечовина, 2 % CHAPS, 2 % тритон X-100, 50 мМ ДТТ, 0,5 % амфоліти	1-D SDS PAGE, 2-DE, IPG, MALDI-TOF MS
Кореневі волоски	50 % фенол, 0,45 М сахароза, 5 мМ ЕДТА, 0,2 % β-меркаптоетанол, 50 мМ <i>трис</i> -HCl, рН 8,8	8 М сечовина, 2 М тиосечовина, 2 % CHAPS, 2 % тритон X-100, 50 мМ ДТТ, 0,5 % амфоліти	1-D SDS PAGE, 2-DE, IPG, MALDI-TOF MS
Корінь і гіпоко- тиль	Фосфатно-сольовий буфер, рН 7,6 (65 мМ K ₂ HPO ₄ , 2,6 мМ KH ₂ PO ₄ , 400 мМ NaCl, 3 мМ NaNO ₃) з наступною преципітацією 10 %-м розчином ТХО	9,5 М сечовина, 2 % NP-40, 5 % PVP, 5 % β-меркаптоетанол, 2 % амфоліти, рН 3–10	1-D SDS PAGE, 2-DE, IEF, ESI-Q/TOF-MS/MS
Корені	10 % ТХО в ацетоні, 0,07 % ДТТ, 1 % PVP	7 М сечовина, 2 М тиосечовина, 2 % CHAPS, 1 % ДТТ, 2 % амфоліти, рН 3–10	1-D SDS PAGE, 2-DE, IPG, MALDI-TOF MS
Листки	10 % ТХО в ацетоні, 0,07 % β-меркаптоетанол	9 М сечовина, 1 % CHAPS, 1 % ДТТ, 1 % амфоліти (рН 3–10)	1-D SDS PAGE, 2-DE, IPG, MALDI-TOF MS, LC-MS/MS
	100 мМ <i>трис</i> -HCl, рН 8,8, 50 мМ ДТТ, 10 мМ ЕДТА, 1 мМ ФМСФ, інгібітори протеаз	8,5 М сечовина, 2,5 М тиосечовина, 5 % CHAPS, 2 % тритон X-100, 1 % амфоліти (рН 3–10), 100 мМ ДТТ	IPG, 2-DE, 1-D SDS PAGE

ктрофорез, розроблений для високоякісного розділення білків, залишається методом дослідження білкових профілів у нативних умовах і виявлення в них кількісних та якісних змін [13, 16], а електрофорез у поліакриламідному гелі за денатурувальних умов застосовують, коли білки потрібно розділити за їх молекулярною масою чи виявити у зразках можливі інтерферуючі агенти [7]. Тому наступним етапом нашої роботи було порівняння електрофоретичних методів розділення білків: класичного поліакриламідного гель-електрофорезу за Леммлі та електрофорезу за допомогою біоаналітичної системи Agilent 2100 Bioanalyzer System.

ТАБЛИЦЯ 2. Вміст сумарного білка в екстрактах бульбочок і коренів сої, отриманих різними методами

Варіант		Вміст сумарного білка, мг/г тканини	
		Фенольний метод	SDS-метод
Корені			
21-2	0,25 норми азоту	1,2±0,06	1,3±0,07
	1 норма азоту	1,3±0,07	1,2±0,06
107	0,25 норми азоту	0,9±0,04	0,9±0,05
	1 норма азоту	1,1±0,06	1,1±0,05
Бульбочки			
21-2	0,25 норми азоту	1,0±0,05	1,0±0,06
	1 норма азоту	1,0±0,06	1,1±0,06
107	0,25 норми азоту	1,2±0,06	1,2±0,07
	1 норма азоту	1,1±0,05	1,0±0,06

У результаті порівняння обох методів розділення білків доведено значну перевагу застосування комерційної аналітичної системи (рис. 1).

Як видно з рис. 1, для чітко видимого розділення рослинних білків методом класичного електрофорезу в поліакриламідному гелі треба значно збільшувати кількість нанесеного на доріжки сумарного білка. Водночас для роботи на біоаналізаторі таких концентрацій цілком достатньо, причому в процесі підготовки зразків до розділення аналізатором білкові препарати розбавлялись ще в 200 разів, тому цей метод є доцільнішим для дослідження саме рослинних зразків порівняно з тваринними й бактеріальними з огляду на менший вміст у них сумарного білка [10].

Крім набагато вищої роздільної здатності аналізатора порівняно з класичною електрофоретичною системою і, відповідно, більш високоякісними результатами, біоаналізатор Agilent 2100 Bioanalyzer System не лише механічно розділяє білки у гелі, а й одразу ж автоматично аналізує

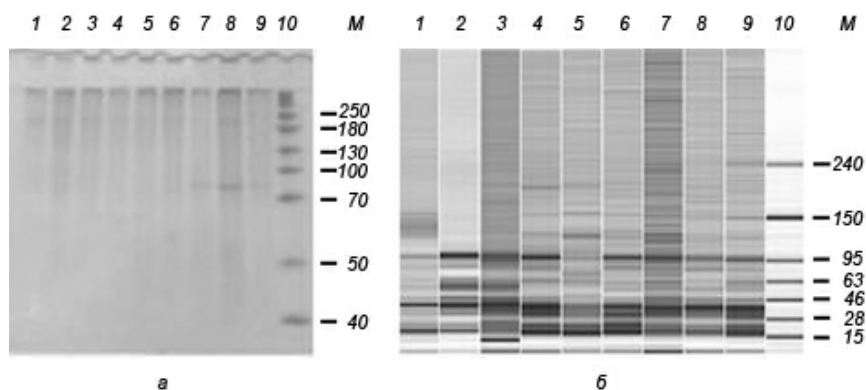


Рис. 1. Електрофореграми білкових профілів коренів і бульбочок сої:

a — отримана методом ПААГ за Леммлі; *б* — отримана за допомогою біоаналізатора Agilent 2100 Bioanalyzer System; 1–6 — білкові екстракти коренів сої; 7–9 — білкові екстракти бульбочок; 10 — суміш маркерних білків; *M* — маркери молекулярних мас

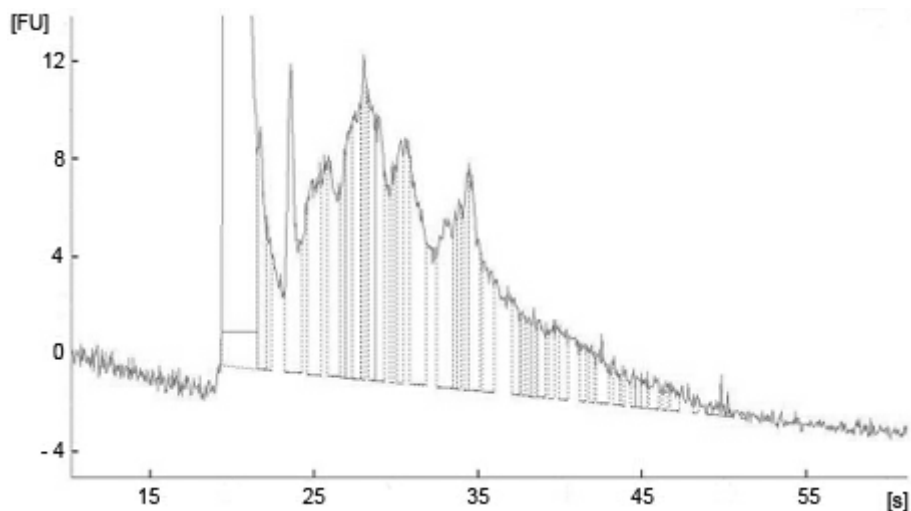


Рис. 2. Схематичне зображення результатів електрофоретичного розділення білків за допомогою біоаналізатора Agilent 2100 Bioanalyzer System

їх спектри: з дуже високою точністю обчислює молекулярні маси й концентрації поліпептидів, їх відносний вміст у зразку, подає результати у вигляді електрофореграм і графіків, які одразу ж можна порівнювати між собою (рис. 2, табл. 3).

ТАБЛИЦЯ 3. Зведена таблиця кількості, концентрації та відносного вмісту білків у зразку, наведеному на рис. 2

Number of peaks found: 56		Total Area: 238,8	
Total Rel. Conc: 11315,4 pg/μl		Noise: 0,4	
Peak table for sample 10: Sample 10			
Peak	Size [kDa]	Rel. Conc. [pg/μl]	% of Total
1	4,7	0,0	0,00
2	5,0	0,0	0,00
3	13,9	678,3	5,99
4	19,7	1440,2	12,73
5	25,9	427,2	3,78
6	29,4	242,2	2,14
7	33,0	489,4	4,33
8	37,1	236,4	2,09
9	42,5	966,2	8,54
10	48,1	322,2	2,85
11	56,0	162,9	1,44
12	59,0	332,5	2,94
13	62,8	144,5	1,28
14	67,4	245,8	2,17
15	74,6	173,7	1,54
16	82,4	236,1	2,09
17	88,4	183,9	1,63
18	101,1	528,5	4,67
19	119,0	375,3	3,32
20	121,0	126,2	1,12

Отже, у результаті моніторингу та аналізу сучасних методів протеомного дослідження рослинних об'єктів загалом і сої зокрема ми підібрали оптимальні методи отримання білкових екстрактів та їх електрофоретичного розділення для подальшого виявлення кількісних і якісних змін білкових профілів за різних умов вирощування рослин сої. Оскільки соя є однією з сільськогосподарських культур першочергового агрономічного й економічного значення, вона потрапляє в ряд об'єктів, які потребують обов'язкового детального протеомного аналізу. Глибоке дослідження протеому сої дасть змогу не лише оперативно порівнювати і характеризувати її сорти, мутанти і трансгенні лінії, а й виявляти вплив на них біотичних та абіотичних чинників, прогнозувати функції білків, клонувати відповідні гени. У свою чергу, ідентифікація нових генів і розшифрування функцій білків, синтез яких вони кодуєть, дасть підґрунтя для генно-інженерного поліпшення стійкості сої до стресів, що є необхідним для її вирощування у сучасних умовах.

1. Коць С.Я., Моргун В.В., Тихонович І.А. и др. Биологическая фиксация азота: генетика азотфиксации, генетическая инженерия штаммов. Т. 3. — Киев: Логос, 2011. — 404 с.
2. Маліченко С.М., Воробей Н.А., Даценко В.К., Коць С.Я. Одержання та первинний скринінг за симбіотичними властивостями транспозантів бульбочкових бактерій сої // Сучасні проблеми фізіології та інтродукції рослин: Матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. до 90-річчя від дня народження професора О.Ф. Михайлова. — Дніпропетровськ: Вид-во Дніпропетр. нац. ун-ту, 2005. — С. 32—33.
3. Маліченко С.М., Даценко В.К., Василюк В.М., Коць С.Я. Транспозоновий мутагенез штамів *Bradyrhizobium japonicum* // Физиология и биохимия культ. растений. — 2007. — 39, № 5. — С. 409—418.
4. Bradford M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — 72. — P. 248—254.
5. Carpentier S.C., Panis B., Vertommen A. et al. Proteome analysis of non-model plants: a challenging but powerful approach // Mass Spectrometry Reviews. — 2008. — 27. — P. 354—377.
6. Cho W. Proteomics technologies and challenges // Genomics, Proteomics and Bioinformatics. — 2007. — 5, N 2. — P. 77—85.
7. Cilia M., Fish T., Yang X. et al. A comparison of protein extraction methods suitable for gel-based proteomic studies of aphid proteins // J. Biomolec. Techniques. — 2009. — 20. — P. 201—215.
8. Espagne C., Martinez A., Valot B. et al. Alternative and effective proteomic analysis in Arabidopsis // Proteomics. — 2007. — 7. — P. 3788—3799.
9. Granier F. Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis // Electrophoresis. — 1988. — 9, N 11. — P. 712—718.
10. Isaacson T., Damasceno C.M.B., Saravanan R.S. et al. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues // Nature Protocols. — 2006. — 1. — P. 769—774.
11. Komatsu S., Ahsan N. Soybean proteomics and its application to functional analysis // J. Proteomics. — 2009. — 72. — P. 325—336.
12. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — 227, N 5259. — P. 680—685.
13. Mesquita R.O., Soares E.A., Barros E.G., Loureiro M.E. Method optimization for proteomic analysis of soybean leaf: improvements in identification of new and low-abundance proteins // Genetics and Molecular Biol. — 2012. — 35, N 1. — P. 353—361.
14. Mooney B.P., Krishnan H.B., Thelen J.J. High-throughput peptide mass fingerprinting of soybean seed proteins: automated workflow and utility of UniGene expressed sequence tag databases for protein identification // Phytochemistry. — 2004. — 65. — P. 1733—1744.
15. Rodrigues E.P., Torres A.R., Batista J.S.S. et al. A simple, economical and reproducible protein extraction protocol for proteomics studies of soybean roots // Genetics and Mol. Biol. — 2012. — 35, N 1. — P. 348—352.
16. Rose J.K.C., Bashir S., Giovannoni J.J. et al. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools // Plant J. — 2004. — 39. — P. 715—733.
17. Saravanan R.S., Rose J.K. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues // Proteomics. — 2004. — 4. — P. 2522—2532.

18. *Toorchi M., Nouri M.Z., Tsumura M., Komatsu S.* Acoustic technology for high-performance disruption and extraction of plant proteins // *J. Proteome Res.* — 2008. — 7. — P. 3035—3041.
19. *Wang W., Vignani R., Scali M., Cresti M.* A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis // *Electrophoresis.* — 2006. — 27. — P. 2782—2786.
20. *Wijk K.J.* Challenges and prospects of plant proteomics // *Plant Physiol.* — 2001. — 126. — P. 501—508.
21. online:[http:// proteomics.missouri.edu/protocols/proteinExtraction.html](http://proteomics.missouri.edu/protocols/proteinExtraction.html)

Отримано 24.10.2012

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ЭКСТРАКЦИИ И РАЗДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ
ДЛЯ ПРОТЕОМНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВЫХ ПРОФИЛЕЙ КОРНЕЙ
И КЛУБЕНЬКОВ СОИ

Ю.Ю. Кондратиук, П.Н. Маменко, А.С. Левишко, Г.Н. Дрозденко, С.Я. Коць

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Важнейшим этапом в любом протеомном исследовании является экстракция и приготовление белковых образцов. Лучшая растворимость белков обеспечивает более качественное их разделение в геле и, соответственно, идентификацию большего количества полипептидов, а поэтому — более точное выявление различий в экспрессии генов, которые их кодируют. Однако ряд методических трудностей, связанных прежде всего со сложностью организации растительной клетки, вынуждает подбирать методы получения препаратов белков в каждом конкретном случае. В связи с этим был проведен мониторинг методов получения и электрофоретического разделения белковых экстрактов из корней и клубеньков сои, выращенной при инокуляции Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* на фоне различного азотного обеспечения. Отобраны наиболее эффективные методы для дальнейшего выявления количественных и качественных изменений белковых профилей сои.

COMPARATIVE ANALYSIS OF METHODS FOR PROTEIN EXTRACTION AND
SEPARATION FOR PROTEOMIC INVESTIGATION OF SOYBEAN ROOTS AND
NODULES PROTEINS

Iu.Iu. Kondratiuk, P.M. Mamenko, A.S. Levishko, G.M. Drozdenko, S.Ya. Kots

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The most critical step in any proteomics study is protein extraction and sample preparation. Better solubilization increases the separation and resolution of gels allowing identification of a higher number of proteins and more accurate quantification of differences in gene expression. However, a number of methodological difficulties related to complexity of plant cells leads to necessity of choose the proteomic studies conditions in each case. The monitoring of methods for extraction and electrophoretic separation of proteins of roots and nodules of soybean grown under inoculation of Tn5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum* and under different nitrogen supply was conducted. The most effective methods for further identification of quantitative and qualitative changes in soybean protein profiles were selected.

Key words: *Glycine max* (L.) Merr., microbe-plant symbiosis, nitrogen fixation, proteome, methods of protein extraction, electrophoresis.