

Міністерство освіти і науки України
Ніжинський державний університет імені Миколи Гоголя
Факультет природничо-географічних і точних наук
Кафедра хімії та фармації
Освітньо-професійна програма: *Хімія, медична і фармацевтична хімія*
Спеціальність: *102 Хімія*

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на здобуття освітнього ступеня магістр

Вплив іонів важких металів та інгібіторів сульфаніламідної природи на поліферментну активність РуБісКО з листя гороху

Студента Ахмедова Еміля Ейвазовича

Наукові керівники: д.х.н., професор **Суховєєв В.В.**

к.б.н., доцент кафедри агрономії ВП НУБІП України «Ніжинський агротехнічний інститут» **Семеніхін А.В.**

Рецензенти: доцент кафедри хімії, технологій та фармації Національного університету «Чернігівський колегіум» імені Т.Г.Шевченка, канд. фарм. наук

Янченко В.О.;

доцент кафедри хімії та фармації Ніжинського державного університету імені Миколи Гоголя, канд. хім. наук, **Циганков С.А.**

Допущено до захисту

Завідувач кафедри хімії та фармації

«17» грудня 2021 р. _____/В.В. Суховєєв/

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АДФ – аденозиндифосфорна кислота
АТФ – аденозинтрифосфорна кислота
БСА – бичачий сиворотковий альбумін
1,3-БФГК – 1,3-*bis*-фосфогліцерінова кислота
ДГАФ – дигідроксіацетонфосфат
ДДС-На або ДСН – додецилсульфат натрію
ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота
ЕТЛ – електронно-транспортний ланцюг
КА – карбоангідразна активність
НАДФ · Н₂ – відновлений нікотинамідаденін інуклеотидфосфат
n-НФЕ нітрофеніловий естер оцтової кислоти
ПААГ – поліакриламідний гель
РБФ – рибулозо-1,5-бісфосфат
РуБісКО – рибулозобісфосфаткарбоксилаза/оксигеназа
С_н – неорганічний карбон
СF₁ – спрягаючий фактор
Трис – трис(гідроксиметил)амінометан
ТХУ – трихлороцтова кислота
Ф_н – неорганічний фосфат
ФАД · Н₂ – флавінаденіндинуклеотид відновлений
ФМСФ – фенілметилсульфонілфторид
ФГК – фосфогліцерінова кислота
3-ФГА – 3-фосфогліцеріновий альдегід

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Роль РуБісКО в біохімічних реакціях темної фази фотосинтезу. Будова рибулозо-1,5-бісфосфаткарбоксилази/оксигенази (огляд літератури)	8
РОЗДІЛ 2. Метод двовимірного електрофорезу білку у ПААГ	19
2.1. Візуалізація та аналіз білкових фракцій ферментів на електрофореграмах	22
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	25
РОЗДІЛ 3. Матеріали та методи досліджень	25
3.1. Матеріали	25
3.2. Умови проведення експерименту	25
3.3. Виділення хлоропластів з листя гороху	26
3.4. Виділення рибулозо-1,5-бісфосфаткарбоксилази/оксигенази	26
3.5. Визначення концентрації хлорофілу за Арноном та концентрації білку за методом Лоурі	27
3.6. Двовимірний електрофорез білку у ПААГ	27
3.7. Визначення карбоангідразної (КА) та естеразної активностей РуБісКО у ПААГ після нативного електрофорезу	29
3.8. Вимірювання карбоангідразної та естеразної активності очищеного РуБісКО	29
РОЗДІЛ 4. Вплив іонів важких металів та інгібіторів сульфаніламідної природи на поліферментну активність РуБісКО з листя гороху	31
4.1. Виділення хлоропластів з листя гороху	31
4.2. Виділення та очищення рибулозо-1,5-бісфосфаткарбоксилази/ оксигенази за допомогою метода нативного електрофорезу у ПААГ	31

4.3. Дослідження впливу інгібіторів сульфаніламідної природи на карбоангідразну та естеразну активності РуБісКО	34
4.4. Дослідження впливу іонів Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} на карбоангідразну та естеразну активності РуБісКО	36
ВИСНОВКИ.....	38
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	39

ВСТУП

Актуальність теми. Відомо, що реакції темної фази фотосинтезу відбуваються у стромі хлоропласту і не пов'язані з участю світла [1, 2]. У продуктах реакцій темної фази є вуглеводи – первинні органічні речовини. Термін “темна фаза” відповідає історичному підходу, оскільки світло й у цій фазі приймає участь для активації ряду ферментів. Темна фаза є біохімічною, або ферментативною, оскільки контроль за темновими реакціями здійснюються ферментами. Виділяють три етапи темної фази: карбоксилювання, відновлення і регенерацію. Енергетичний баланс, що забезпечується циклом Кальвіна, надходить у формі редукованих еквівалентів АТФ і НАДФ·Н₂, які були утворені у світловій фазі. Головна реакція циклу Кальвіна – фіксація комплексу СО₂-фермент до субстрату. Початок процесу карбоксилювання розпочинається з СО₂, який входить у цикл і фіксується на рибулозо-1,5-бісфосфаті (РБК). Завдяки певним перетворенням, що відбуваються при цьому, утворюється як проміжний продукт – цукор, який здатний розкладатися на дві молекули 3-фосфогліцеринової кислоти (ФГК). Карбоксилюючим ферментом є рибулозобісфосфаткарбоксилаза/оксигеназа (РуБісКО). Щоб розшифрувати функціональні засади та механізми регуляції роботи каталітичних центрів РуБісКО, необхідно, з одного боку, детально вивчити та розуміти будову та взаємодію білкових субодиниць, що входять до складу ферментного комплексу, з іншого – досліджувати вплив на ферментну активність РуБісКО різноманітних екзогенних та ендогенних чинників.

Мета роботи: дослідження впливу іонів важких металів та інгібіторів сульфаніламідної природи на поліферментну активність РуБісКО з листя гороху.

Завдання роботи:

1. Здійснити огляд наукової літератури стосовно біологічної ролі, структури та механізму каталітичної дії рибулозобісфосфаткарбоксилази/оксигенази.

2. Проаналізувати механізми регуляції поліферментної активності РуБісКО.

3. Відпрацювати методику виділення хлоропластів, розчинних нативних стромальних білків та ферментного комплексу РуБісКО з листя гороху.

4. Відпрацювати та удосконалити метод двовимірного електрофорезу у ПААГ для виділення та ідентифікації РуБісКО хлоропластів.

5. Провести дослідження з вивчення впливу іонів Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} на карбоангідразну та естеразну активності РуБісКО.

6. Дослідити вплив етоксизоламиду та ацетозоламиду на поліферментну активність РуБісКО.

7. Розглянути вплив ендогенних та екзогенних чинників на каталітичні центри фермента.

Об'єкт дослідження: карбоангідразна, естеразна активності РуБісКО з листя гороху, інгібітори та активатори поліферментної активності РУБІСКО.

Предмет дослідження: РуБісКО хлоропластів вищих рослин і механізми регуляції ферментної активності РуБісКО.

Наукова новизна одержаних результатів. Досліджено вплив інгібіторів сульфаніламідної природи (ацетозоламиду та етоксизоламиду) та іонів Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} на карбоангідразну та естеразну активності РуБісКО хлоропластів вищих рослин. Зпрогнозовано роль екзогенних чинників у регуляції поліферментних властивостей рибулозобісфосфаткарбоксилази/оксигенази, під час «темнових» реакцій фотосинтезу.

Методи досліджень. Для виконання поставлених завдань застосовували наступні методи: диференційного центрифугування, двовимірного електрофорезу у ПААГ, спектрофотометрії.

Структура та обсяг магістерської роботи. Кваліфікаційна робота викладена на 45 сторінках друкованого тексту і складається зі вступу, огляду

літератури (розділ I, II), експериментальної частини (розділ III), результатів та їх обговорення (розділ IV), висновків, списку використаних літературних джерел, що містить 62 посилання на роботи вітчизняних та зарубіжних учених.

РОЗДІЛ 1. РОЛЬ РУБІСКО В БІОХІМІЧНИХ РЕАКЦІЯХ ТЕМНОВОЇ ФАЗИ ФОТОСИНТЕЗУ. БУДОВА РИБУЛОЗО-1,5- БІСФОСФАТКАРБОКСИЛАЗИ/ОКСИГЕНАЗИ (огляд літератури)

РуБісКО локалізується в стромі хлоропластів у великій кількості: його кількість складає 50% усієї розчиненої маси білків листка. Ферментний комплекс має 8 великих субодиниць, які здійснюють каталітичні функції, і 8 малих субодиниць, що виконують регуляторні функції. Зазначені субодиниці організовані у єдину структуру. Для активації РуБісКО необхідна присутність іонів Mg^{2+} . Карбоксилуюча активність ферменту залежить від концентрації CO_2 у стромі хлоропласта [1, 2].

На прикладі фотосинтезуючої бактерії *Rhodospirillum rubrum* методом кристалографічного аналізу показано, що молекула є димером двох ідентичних L-ланцюгів кожен із відносною молекулярною масою 22 000 дальтон, які показують приблизно 30 ідентичних амінокислотних послідовностей з даними ланцюгами РуБісКО з вищих рослин. Майже всі бічні ланцюги зараз розміщені в цій моделі, яка була доопрацьована з роздільною здатністю 2.3 Å. Субодниця поділяється на 2 домени: один менший N-кінцевий домен зв'язаний з C-кінцевим доменом, який має восьмиланцюгову структуру. Дві субодиниці тісно взаємодіють з димерною молекулою РуБісКО. Ядро цієї області зв'язування складається з взаємодій з двома C-кінцевими доменами навколо локальної подвійної осі. Окрім того, дві області з N-кінцевого домену субодиниці взаємодіють з областями з C-кінцевого домену другої субодиниці. Таким чином, кожна активна ділянка димеру будується із залишків обох субодиниць [61].

Рентгеноструктурні дані певного рівня імпульсу були підтверджені для кристалів неактивної форми ферменту і були зібрані на фотографії з використанням лінії променя Вигглера на джерелі синхротронного випромінювання у Великобританії. Дані показники були використані для уточнення початкової моделі РуБісКО методами моделювання найменших

квадратів та комп'ютерної графіки. Кристалографічний коефіцієнт зменшився на 38.4° при 2.9 \AA . Рідкі кристали просочували 3-фосфогліцератом і збирали набір даних з роздільною здатністю 2.9 \AA на чотирьохкруговому дифрактометрі. Положення зв'язаного 3-фосфогліцерату були виявлені із карти Фур'є і структура комплексу була уточнена до значення 19.8° . Фермент має вісь, яка проходить через центр і нахилена під кутом 2° . Огинаючу частину визначали з ізоморфної карти, на яку було нанесено розчинник з використанням позицій важких атомів, яка підтвердила 4-кратну симетрію [60, 61].

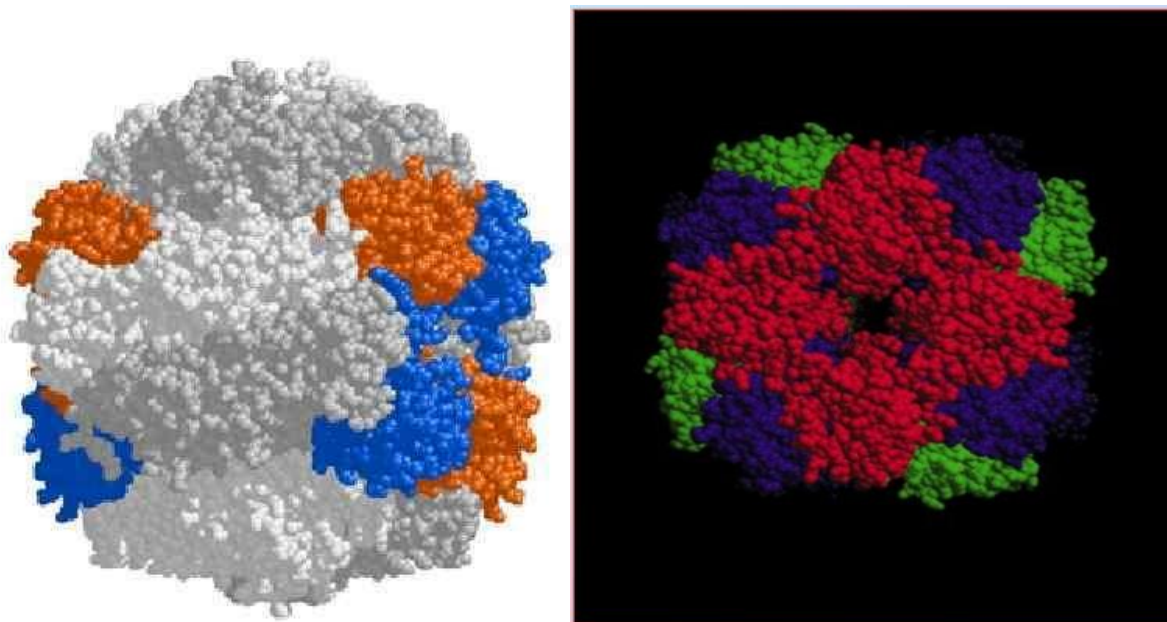


Рис.1. Субодиничний склад РуБісКО. Фермент побудований з восьми «великих» L-білкових субодиниць (Mг кожної 54 кДа) та восьми «малих» S-білкових субодиниць (Mг кожної 14 кДа) [1].

У природі зустрічається чотири форми РуБісКО. Перша форма описана для еукаріот та бактерій, друга форма зустрічається у багатьох прокариот, третя форма зустрічається тільки у деяких архей, четверта форма – це РуБісКО подібний білок.

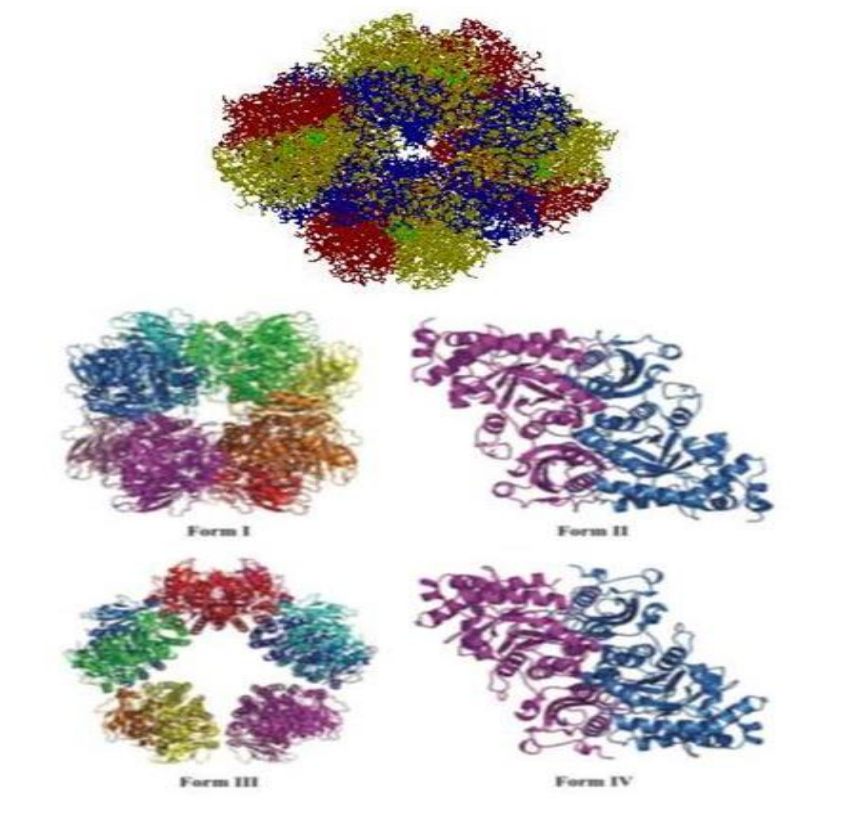
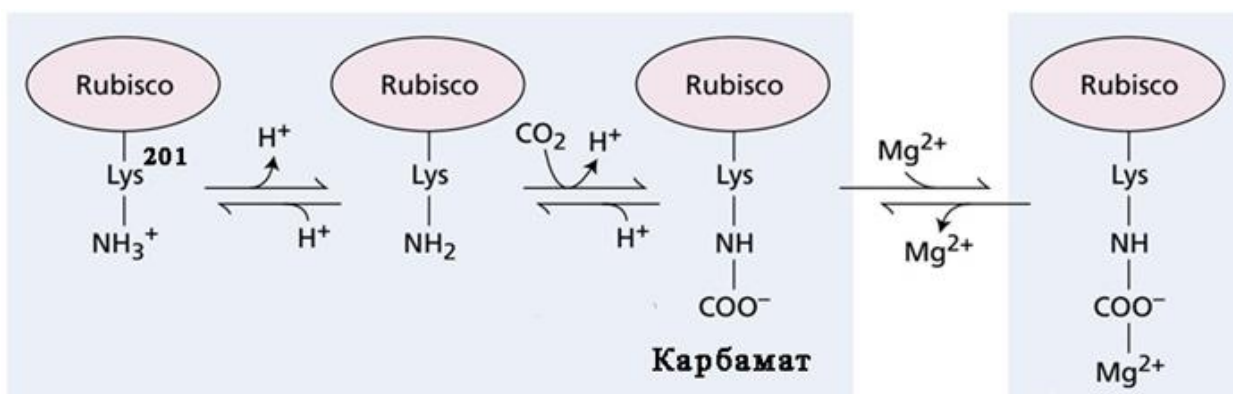


Рис. 2. Чотири форми рибулозобіфосфаткарбоксилази/оксигенази

Активний центр ферменту формують амінокислотні залишки С- та N-кінців двох сусідніх L-субодиниць. Активація карбоксидуючої активності ферменту відбувається за схемою:



неактивний стан

активний стан

Рис. 3. Активація РуБісКО.

Процес карбоксилювання розпочинається з входження CO_2 у цикл і фіксації на РБФ.

Далі здійснюються перетворення, що приводять до нестійкого проміжного продукту (вуглеводу), який розкладається на дві молекули 3-фосфогліцеринової кислоти (ФГК). Наступним етапом є перетворення 3-фосфогліцеринової кислоти на 1,3-*bis*-фосфогліцеринову кислоту (1,3-БФГК) в процесі фосфорилування. Воно відбувається за участі ферменту фосфогліцераткінази та АТФ, що утворена наприкінці ЕТЛ у світловій фазі фотосинтезу. Наступним етапом є відновлення 1,3-*bis*-фосфогліцеринової кислоти до 3-фосфогліцеринового альдегіду (3-ФГА). Це здійснюється за участі НАДФ·Н₂, що утворився у світловій фазі фотосинтезу. Зазначена реакція каталізується ферментом гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогеназою. Триоза 3-ФГА є першим цукором, що утворений у процесі фотосинтезу. Молекули 3-ФГА, які утворені у циклі Кальвіна, далі використовуються у різні способи, а саме: понад 16% їх іде на синтез вуглеводів (сахарози та крохмалю) та біля 84% – на регенерацію рибулозобісфосфату, який є первинним акцептором СО₂. При перетворенні 3-ФГА на вуглеводи, він спочатку в процесі ізомеризації стає дигідроксіацетонфосфатом (ДГАФ). Процес ізомеризації каталізується ферментом триозофосфатізомеразою. Утворені 3-ФГА та ДГАФ при взаємодії, що каталізується ферментом фруктозобісфосфатальдолазою, дають цукор – фруктозо-1,6-бісфосфат. Далі фруктозо-1,6-бісфосфат дефосфорилується за участі фруктозобісфосфатази, що призводить до утворення фруктозо-6-фосфату. Наступним етапом є виведення з циклу Кальвіна фруктозо-6-фосфату, який за участі фермента глюкозофосфатізомерази перетворюється на глюкозо-6-фосфат.

Отже, утворення монофосфатів глюкози і фруктози дає змогу утворення двох основних вуглеводів: сахарози та крохмалю [1, 2, 60].

Необхідність постійної регенерації акцептора СО₂ (рибулозобісфосфату) зумовлює безперервну фіксацію СО₂. Тому фаза регенерації завершує цикл Кальвіна. Регенерація є складним багатоетапним процесом, у якому приймають участь цукрофосфати. При їх перетворенні іде утворення рибулозо-5-фосфату. На фосфорилування рибулозо-5-фосфату

необхідний АТФ, який синтезовано у світловій фазі фотосинтезу, а також утворюється рибулозо-1,5-бісфосфат. Таким чином регенерується вихідна речовина циклу Кальвіна.

Слід зазначити, що РубісКО, окрім карбоксилуючої функції, виконує й оксигеназну (рис. 4). До економічно важливих С₃-рослин відносять картоплю, жито, овес, ячмінь, рис, пшеницю, цукровий буряк, тютюн, а також бобові культури.

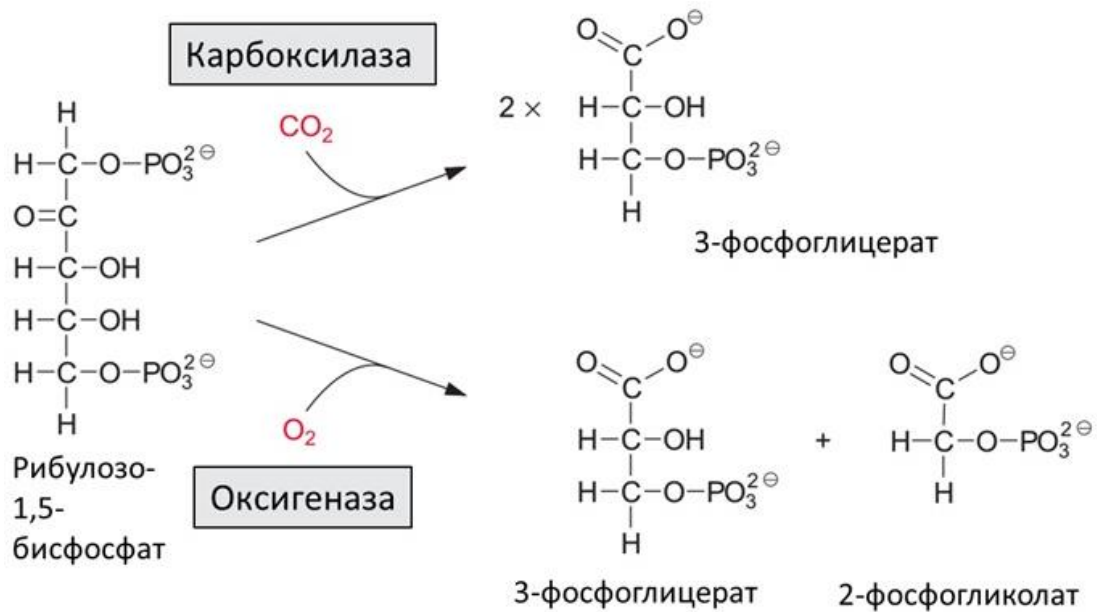


Рис. 4. Карбоксилазна та оксигеназна активності РубісКО «Хелд. Біохімія рослин, 2011».

Фотодихання є катаболічним процесом, яке проходить тільки у світлій фазі фотосинтезу, у якій іде поглинання O_2 і виділення CO_2 . Зазначимо, що дослідженнями О. Варбурга [1, 6, 7, 60] було відкрито процес фотодихання. Їм було встановлено, що O_2 повітря, як продукт фотосинтезу, здійснює пригнічення процесу фотосинтезу. Причому при підвищенні концентрації O_2 в повітрі відбувається зменшення асиміляції CO_2 і виділення оксигену. Це явище має назву «ефект Варбурга». Він характерний для усіх С₃-рослин. Тоді як для С₄-рослин за звичайної концентрації оксигену у повітрі зазначений ефект не виявляється. Зазначимо, що за газообміном (поглинанням O_2 та виділенням CO_2) процес фотодихання відповідає звичайному темновому диханню. Але процес фотодихання проходить лише

на світлі, а також різняться за хімічною природою. Для фотосинтезу потрібна нормальна робота фотосинтетичного апарату при спільній взаємодії хлоропластів, пероксисом та мітохондрій. Суттєва відмінність процесу фотодихання полягає у тому, що у ньому не відбувається утворення АТФ.

Біохімічна ж основа процесу фотодихання полягає у подвійному функціонуванні головного ферменту у циклі Кальвіна – рибулозобісфосфаткарбоксилази, яка при незначному вмісті вуглекислого газу і значному – кисню функціонує як оксигеназа. Причому за звичайних умов цей фермент здійснює на кожні два-три карбоксилювання – лише одне оксигенування. У хлоропластах за високої концентрації кисню у повітрі рибулозобісфосфаткарбоксилаза/оксигеназа взаємодіє з O_2 , в результаті чого здійснюються окисні розщеплення рибулозобісфосфату та утворення фосфогліколевої та фосфогліцеринової кислот. При цьому відбувається відщеплення фосфатної групи з перетворенням фосфогліколевої кислоти у гліколеву. Гліколат, що утворився у хлоропластах, далі проникає у пероксисоми, що забезпечує проходження так званого гліоксилатного шляху [8, 10].

Зазначимо, що для пероксисом характерна власна мембрана, що оточує гранульований матрикс, але відсутні ламели. Пероксисоми здійснюють окиснення гліколату до гліоксилату за допомогою фермента гліколатоксидази, який використовує одну молекулу кисню на утворення однієї молекули H_2O_2 з однієї молекули окисненого гліколату. Утворений у пероксисомах H_2O_2 за дії ферменту каталази розщеплюється на H_2O і O_2 . Подальші реакції фотодихання забезпечують утворення амінокислоти гліцину амінуванням гліоксилату. Утворений гліцин далі транспортується у мітохондрії, де з його двох молекул синтезується одна молекула амінокислоти серину, з вивільненням CO_2 та амоніаку. Ця реакція є основною у фотодиханні.

Зауважимо, що CO_2 , як кінцевий продукт фотодихання, або виділяється назовні, або приймає участь далі у процесі фотосинтезу, тоді як NH_3

проникає у хлоропласти, де й використовується для синтезу амінокислот. Серин, що утворився, надходить у пероксисоми і після низки перетворень дає гліцеринову кислоту, яка задіяна у хлоропластах для фосфорилування до утворення 3-фосфогліцеринової кислоти. Саме цією реакцією завершується процес фотодихання. Утворена 3-ФГК далі у хлоропластах приймає участь у циклі Кальвіна.

Відомо, що рослинний організм має безліч регуляторних систем, які дають можливість рослині забезпечити власну життєдіяльність [1, 14].

Для рослинних організмів існує лише два основних види регуляції, а саме: ендогенний та екзогенний. Причому, процес фотосинтезу є первинним постачальником широкого спектру пластичних речовин і сполук, що багаті на енергією (наприклад. АТФ), або мають відновний потенціал (НАДФ·Н₂, ФАД·Н₂). Це, насамперед, і є основною фізіологічною функцією рослинного організму. Регулювання інтенсивності та продуктивності процесу фотосинтезу здійснюється саме певними взаємозалежними чинниками, як ендогенними, так і екзогенними. Причому, ендогенна регуляція процесу фотосинтезу здійснюється на усіх стадіях процесу, а саме: при поглинанні енергії, транспортуванні електронів, а також на рівні карбонових циклів.

Ендогенними ж регуляторними системами є: генетична, гормональна, метаболічна, а також онтогенетична.

Зазначимо, генетичні системи рослинних клітин, які функціонують, локалізовані у ядрах, хлоропластах та мітохондріях. Так, горми та інгібітори дистанційно діють на процес фотосинтезу та опосередковано впливають на процеси росту, розвитку, активність роботи донорно-акцепторної системи, отже відповідають за транспорт метаболітів. Інгібітори та гормони продукуються як у хлоропластах, так і надходить у хлоропласти ззовні (цитокініни – з коренів, етилен – з плодів з апікальних меристем, а більшість індолілоцтової кислоти – зі стебла). У хлоропластах же відбувається синтез індолілоцтової кислоти (ІОК), фенольних інгібіторів, абсцизової кислоти та гіберелінів.

Суть механізму дії фітогормонів рослин полягає у активації специфічних генів, які відповідають за синтез необхідних ферментів.

Ендогенна регуляція рослини має координовану систему донорно-акцепторних зв'язків, які відіграють визначальне значення.

Найбільш значною регуляторною функцією цілого рослинного організму є постійне корегування донорно-акцепторних взаємодій. Щодо транспортної системи рослинного організму: виділяють ближній і далекий види транспорту. Ближній забезпечує пересування по клітинам і тканинам як води, так і йонів та метаболітів. Далекий же транспорт забезпечує пересування різноманітних сполук між органами рослини. Завдячуючи цим транспортним системам відбувається взаємозв'язок між клітинами, тканин та органами, що забезпечує цілісність всього рослинного організму.

Так, транспорт мінеральних і органічних сполук, а також води здійснюється по ксилемі від коренів до органів пагона, забезпечуючи висхідну течію. Тоді як флоема забезпечує нисхідну течію, хоча можлива і висхідна. Вона забезпечує рух асимілятів від листків до зон їх використання (верхівок пагонів, що ростуть, чи до місць, де вони відкладаються запасні речовини, наприклад, плоди, насіння, запасуюча паренхіма коренів, стебла, тощо).

Найголовнішими провідними складовими флоєми є ситоподібні клітини (мають нижчі судинні рослини і голонасінні) та членики ситоподібних трубок (покритонасінні рослини). Вона має також і власну паренхіму у вигляді великих клітин з менш щільною цитоплазмою з багатьма вакуолями. Паренхімна рослин здатна запасати органічні сполуки, регулюючи таким чином їх концентрацію у ситоподібних трубках. Доведено, що донорно-акцепторні зв'язки відповідають за далекий транспорт асимілятів. Розрізняють два види донорів асимілятів: первинні і вторинні [1, 2].

Первинними донорами асимілятів є зелені листки, нелистові хлорофілоносні тканини, а також органи рослин. До них належать плоди, видозмінені стебла, а також елементи суцвіть, тощо).

Вторинними донорами виступають запасуючі органи. До них належать насіння рослин, бульби, коренеплоди, цибулини, тощо). Слід зазначити, що частини рослини не можуть самостійно забезпечити усі потреби живого організму в асимілятах, тому можуть виступати акцепторами (споживачами).

Хлоропласти фотосинтезуючих клітин, як головні донори, здійснюють синтез органічних речовин. Так, на 1 см² листової поверхні припадає біля 40 млн. хлоропластів, а за десять хвилин роботи лише одного хлоропласту синтезується сухих речовин стільки, скільки важить він сам.

Далі з хлоропластів у цитоплазму надходять такі триозофосфати, як 3-фосфогліцеринальдегід та дигідрооксіацетонфосфат. На початковому етапі білок-переносник здійснює транспорт у цитоплазму триозофосфатів, а у хлоропласт – ортофосфату (Фн). У випадку обмеженого вмісту у цитоплазмі неорганічного фосфору, переносник не здатний здійснювати транспорт, що приводить до накопичення триозофосфатів у хлоропластах, які перетворюються в гексозофосфати, а останні – у крохмаль [1].

Якщо триозофосфати, що поступили у цитоплазму, не можуть використатися швидко, то спостерігається накопичення крохмалю, який, у свою чергу, виступає регулятором експорту триозофосфатів. При надлишковому ж накопиченні крохмалю у хлоропластах, створюється тиск на тилакоїди, що приводить до активації ферментів α -амілази та мальтази, які перетворюють крохмаль на глюкозу, яка інгібує фотосинтез. Крохмаль, що накопичився за день, використовуються хлоропластами вночі.

Далі у цитоплазмі з триозофосфатів синтезується сахароза. Першим етапом є утворення фруктозо-1,6-дифосфату, який у процесі гідролізу дає фруктозо-6-фосфат та вільний ортофосфат, який знову повертається в хлоропласт завдяки переноснику тріоз. Наступним етапом є перетворення фруктозо-6-фосфату на інші гексози, які далі приймають участь у синтезі

сахарози. Сахароза не здатна накопичуватися в цитоплазмі клітин листа, тому виводиться з клітин, або накопичується у вакуолях, виступаючи резервним фондом. Сахароза далі здатна пересуватися двома шляхами:

1) єдиною транспортною ендоплазматичною мережею, яка переходить з однієї клітини в іншу по плазмодесмах (симпластичний відтік);

2) зовнішньою поверхнею плазмалеми та по пористій клітинній стінці (апопластичний відтік). Можливий одночасний чи послідовний відтік по обох каналах [1, 2, 62].

Вплив світла на активність фермента. За дії світла протони здатні швидко переходити зі строми у тилакоїди. Це приводить до збільшення рН майже до 8.0. При надходженні у строму Mg^{2+} з тилакоїдів, відбувається вихід протонів зі строми. Лужне рН середовище завдячуючи іонам Mg^{2+} позитивно впливає на активність ферментів у циклі Кальвіна, збільшує швидкість фіксації CO_2 , а також виділення кисню. Зазначені умови прискорюють швидкість електронного потоку в ЕТЛ, сприяють формуванню трансмембранного градієнту іонів H^+ і активують процес фотофосфорилування. Світло також позитивно впливає і на багато ферментів C_4 -шляху, що приводить до зростання їх активності у 10–15 разів. Через ферредоксин-тіоредоксин-редуктазну систему за дії світла відбувається активація багатьох ферментів. Ферредоксин за участі редуктази відновлюється на світлі і перетворює тіоредоксин у відновлену SH-форму, активуючи низку ферментів C_3 - та C_4 -шляху та спрягаючий фактор фосфорилування (CF_1).

Отже, активність багатьох ферментів суттєво залежить від енергетичного стану системи, що забезпечується співвідношенням АТФ до АДФ [1, 2, 62].

Таким чином, необхідність адаптації енергетичного апарату рослинної клітини до умов освітлення, що постійно змінюються, наявності в середовищі вихідних субстратів зумовила еволюційне становлення регуляторних механізмів, відповідальних за модуляцію каталітичної активності РуБісКО. Щоб дізнатися функціональні засади цих механізмів,

необхідно детально вивчити та розуміти будову, взаємодію білкових субодиниць, що входять до складу ферментного комплексу та досліджувати вплив на ферментну активність РуБісКО різноманітних екзогенних та ендогенних чинників.

Для досягнення поставленої мети кваліфікаційної роботи необхідно вирішити низку практичних задач, а саме:

- проаналізувати механізми регуляції поліферментної активності РуБісКО.

- відпрацювати методику віділення хлороплстів, розчинних нативних стромальних білків та ферментного комплексу РуБісКО з листя гороху.

- удосконалити метод двовимірного електрофорезу у ПААГ для виділення та ідентифікації РуБісКО хлоропластів.

- провести дослідження з вивчення впливу іонів Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} на карбоангідразну та естеразну активності РуБісКО.

- дослідити вплив етоксизоламідів та ацетозоламідів на поліферментну активність РуБісКО.

- розглянути вплив ендогенних та екзогенних чинників на каталітичні центри фермента.

РОЗДІЛ 2. МЕТОД ДВОВИМІРНОГО ЕЛЕКТРОФЕРЕЗУ БІЛКУ У ПААГ

Молекули білка у буферному розчині несуть на своїй поверхні сумарний електричний заряд. Значення рН розчину, наявність у буферній системі розчинених сполук, здатних взаємодіяти з білковою молекулою формують величину, позитивність або негативність поверхневого заряду білкової молекули.

Під впливом електричного струму, молекули білка (завдяки поверхневому заряду) будуть мігрувати до анода або до катода відповідно. Швидкість руху молекул буде визначатися співвідношенням заряду молекули до її молекулярної маси [30].

Підчас електрофоретичного розділення білкових молекул останні взаємодіють з середовищем, в якому протікає процес. Така взаємодія залежить від властивостей поліакріламідного гелю, агарози та інших носіїв (розмір внутрішніх пор, механічні властивості). По закінченню електрофорезу на електрофореграмі різні за масою та зарядом білкові молекули будуть формувати відповідні зони, які після забарвлення специфічними барвниками візуалізуються та аналізуються [31].

Для формування поверхневого заряду молекули білка, який залежить насамперед від значення рН середовища, використовуються різні буферні системи. Крім того, для проведення якісного розділення експериментально підбирають значення напруги (як правило не більшу 20 В/см).

В сучасній практиці білкового електрофорезу здебільше використовують гелі у формі пластин. Відомі різні системи підготовки та заливки гелів у яких відбувається полімеризація та утворення власне пластини гелю з заданими параметрами (розмір, товщина), у якій відбувається електрофоретичне розділення. Більшість дослідів проводиться на пластинах поліакріламідного гелю з концентрацією акріламідну (від якої залежить розмір пор, що утворюються у гелі після його полімеризації) 5% -

20%, оскільки переважна кількість білків мають масу не більше 500 кДа [32, 33].

Для розділення та очищення білкових молекул використовують декілька систем електрофорезу.

Електрофорез у безперевній системі. У цій системі електродні буфери та буфери у яких полімеризується акріламідний гель мають однаковий склад. Нажаль, у безперевній електрофоретичній системі швидкість руху білкових молекул залежить одразу від багатьох чинників: величини поверхневого заряду, просторової орієнтації білкових молекул, молекулярної маси [36].

Електрофорез у переривчастій системі. Ця система складається з двох різних за властивостями шарів поліакріламідного гелю: верхній шар – концентруючий гель, нижній шар – розділяючий гель. Верхній шар має концентрацію акріламіда до 5% і відповідно дуже великі пори, рН 6.8–7.0, низьку іону силу буферної системи. Призначення концентруючого гелю – зібрати розчин білків, що будуть розділятися, у тонку смужку на межі з розділяючим гелем. Розділяючий гель, навпаки, має як правило невеликі пори (концентрація акріламіду 10%–20%) високу іонну силу буфера та лужне (або кислотне) значення рН. За таких умов у розділяючому гелі відбувається чітке та ефективно розділення білкових молекул [39]. Робочий буфер у своєму складі повинен мати іони, що рухаються у тому ж напрямку, що і білки. Крім того, міграція цих іонів не повинна залежити від значення рН середовища. У верхньому електродному буфері (що безпосередньо взаємодіє з білковим препаратом) обов'язкова наявність швидких іонів, що рухаються разом з білками та змінюють рухливість в залежності від рН середовища. У якості швидких іонів як правило використовують амінокислоту гліцин. У концентруючому гелі рух гліцина мінімальний, у розділяючому гелі швидкість міграції гліцина максимальна. На практиці використовують, як правило, варіанти електрофорезу з різноманітними модифікаціями.

Електрофорез за наявності детергентів. Після додавання в електрофоретичну систему детергентів стає можливим значно змінити рухливість біополімерів та суттєво підвищити ефективність розділення. Найбільш відпрацьованими з детергентів у практиці та теорії електрофорезу є сечовина, Тритон X 100 та додецилсульфат натрію [39].

Тритон X 100, сечовина, як неіоні детергенти, використовують для розчинення гідрофобних білків. Крім того, ці детергенти сприяють припиненню процесу злипання біомолекул та утворення осаду. Оскільки ці детергенти нерухливі в електричному полі, їх додають тільки в робочий буфер. [40]. У великих концентраціях сечовина може викликати денатурацію молекул білка.

Тритон X 100 м'яко взаємодіє з молекулами білків, не змінюючи їх нативної структури. Цей детергент має здатність адсорбуватися на гідрофобних ділянках білкової молекули та змінювати ефективну молекулярну масу останніх. Такий ефект часто використовують для фракціонування гідрофобних білків під час електрофорезу.

Іоний детергент додецилсульфат натрію, зв'язуючись з молекулою білка, сприяє нівелюванню багатьох інших чинників і зумовлює розділення макромолекул виключно за молекулярною масою [41]. У випадку коли концентрація ДДС- Na в середовищі вища ніж 0,8 мМ, кількість детергенту, що зв'язується з будь-якою молекулою білка є сталою. Додецилсульфат надає усім білковим молекулам суміші однакового за величиною від'ємного негативного заряду, власний заряд макромолекул повністю невілюється і вони розділяються під час електрофорезу виключно за молекулярною масою.

Таким чином, порівнюючи швидкість руху відомих (стандартних) молекул білка, з білковими молекулами розчину, що досліджується, можна за логарифмічною залежністю легко визначити молекулярну масу останніх [35, 36]. У випадку аналізу глікопротеїнів, білків з нетрадиційним розміщенням зарядів у поліпептидному ланцюзі можливості методу визначення молекулярної маси можуть бути обмеженими [41].

Електрофорез у гелях ПАА з градієнтом пористості. У процесі створення градієнта пористості ПААГ у результаті поступового зростання концентрації акріламідів, спостерігається зменшення пор полімеризованого гелю. Завдяки ефекту «молекулярного сита», фракціонування біомолекул відбувається тільки за розміром. Білкові смуги на електрофореграмах візуалізуються у максимально звужених смужках, що вигідно вирізняє цю систему електрофорезу від інших за рахунок селективності та ефективності розділення [37, 43].

Двовимірний електрофорез. Для підвищення ефективності електрофоретичного методу розділення білків суміш макромолекул, що досліджується можна послідовно аналізувати у різних електрофоретичних системах. Наприклад, після аналізу у безперервній системі за умов створення крупнопористого ПААГ відбувається фракціонування білків за величиною поверхневого заряду (перший напрямок). ПААГ після цього варіанту електрофорезу переноситься у систему електрофорезу з градієнтом пористості і білки вже в цій системі розділяються переважно за молекулярною масою (другий напрямок). Зрозуміло, можливе багато комбінацій різних систем білкового електрофорезу які проводяться спочатку у першому напрямку, а потім – у другому [44, 45].

Двовимірний підхід у розділенні білків передбачає послідовне застосування електрофоретичного розділення та хроматографічного, електрофоретичного та імуноелектрофоретичного і т. ін.

2.1. Візуалізація та аналіз білкових фракцій ферментів на електрофореграмах.

Моніторинг процесу електрофорезу.

Контроль за перебігом процесу електрофорезу неможливий без використання низькомолекулярних речовин-барвників, що мають власний електричний заряд, рухаються в одному напрямку з білковими молекулами та випереджають під час руху будь яку білкову молекулу суміші що

розділяється. Крім того, барвник не повинен взаємодіяти (ковалентно зв'язуватися) з макромолекулою). Найпоширенішим на сьогодні барвником-лідером є бромфеноловий синій (БФС) [29, 37].

Контроль за параметрами електричного струму здійснюють за допомогою сучасних блоків джерел живлення. Сила струму (або напруга) під час проведення електрофорезу повинні бути постійними.

На електрофореграмі, після візуалізації білкових молекул, утворюється електрофоретичний спектр.

Кількість білкових смуг, що може бути зафіксована на електрофореграмі, не завжди відповідає кількості ізоформ (ізоферментів) білків зразка що досліджується [4, 6].

Важливою характеристикою електрофореграми прийнято вважати нумерацію смуг білків згідно їх відносної електрофоретичної рухливості – R_f [40]. Відносна електрофоретична рухливість це відношення відстані яку пройшов від місця нанесення (старту) певний білок до відстані, яку пройшов барвник-лідер за час проведення електрофорезу.

Інтенсивність забарвлення конкретної білкової смуги на електрофореграмі як правило свідчить про високу кількість (концентрацію) білка у відповідній смугі та про високу ферментну активність.

Для коректного визначення концентрації та ферментної активності білка у смугі на електрофореграмі слід розрахувати діапазон у якому спостерігається лінійна залежність між силою забарвлення та концентрацією білка.

В процесі аналізу електрофореграм необхідно порівнювати загальне забарвлення білкових смуг із специфічним забарвленням на ферментну активність. Часто у процесі електрофоретичного аналізу білків-ферментів необхідне ретельне попереднє очищення білкового препарату або електрофоретична елюція білка з електрофореграми та подальший фізико-хімічний аналіз.

Найбільш достовірні результати отримують, застосовуючи двовимірний електрофорез та електрофорез за наявності детергентів [44].

Для кількісного визначення білку у візуалізованій (забарвленій) білковій смузі прийнято користуватися калібрувальним графіком інтенсивність забарвлення/концентрація, що будується за допомогою білків-маркерів (стандартів).

Отримані електрофореграми документуються: фотографування, сканування та збереження у цифровому вигляді. Існує чимало комп'ютерних програм, що швидко та точно (за наявності ретельно побудованого калібрувального графіку) розраховують кількість білку у смузі на електрофореграмі.

Оскільки пластини ПААГ тривалий час зберігаються у водному розчині та після легко можуть бути висушені, для аналізу гелів широко застосовуються методи денситометрії. Графічне зображення електрофореграм, що отримується за допомогою мікроденситметрів, дозволяє розраховувати висоту та площу піків, які пропорційні інтенсивності забарвлення та кількості білку у смузі [45].

Для чіткої кореляції інтенсивність забарвлення/кількість білку необхідно експериментальним підібрати певний вид барвника, що міцно ковалентно зв'язується з білковими молекулами різної будови та властивостями. Найбільш експериментально випробуваним барвником для таких дослідів є барвник кумасі ярко-синій [49].

Отже, метод двовимірного електрофорезу білку у ПААГ є доступним та інформаційним і може бути використаний нами для виділення хлоропластів з листя гороху, рибулозо-1,5-бісфосфаткарбоксилази/оксигенази та визначення карбоангідразної та естеразної активностей РуБісКО у ПААГ після нативного електрофорезу і дозволить вивчити вплив іонів важких металів та інгібіторів сульфаніламідної природи на поліферментну активність РуБісКО з листя гороху.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. *Матеріали.*

У роботі використовували листя двотижневих паростків гороху, Трис «Sigma», США, сорбітол «Sigma», США, ЕДТА «Merck», Німеччина, NaCl х.ч, KCl х.ч, MgCl₂ х.ч, цистеїн «Sigma», США, БСА «Fluka», Швейцарія, аскорбінова кислота х.ч, бікарбонат натрію х.ч, акриламід «Sigma», США, N,N'-метиленбісакриламід «Sigma», США, ТЕМЕД «Merck», Німеччина, меркаптоетанол «Merck», Німеччина, фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ) «Sigma», США, амінокапронова кислота «Sigma», США, додецилмальтозид «Sigma», США, феритин, «Sigma», США, реактив Фоліна «Sigma», США, додецилсульфат натрію «Sigma», США, кумасі R-250 «Merck», Німеччина; бромфеноловий синій «Merck», Німеччина; бромтимоловий синій «Fluka», Швейцарія, хлоридна кислота х.ч, хлорна кислота х.ч, ацетозоламід «Sigma», США, етоксизоламід «Sigma», США, натрієва сіль нафтилацетату «Fluka», Швейцарія, трис-вероналовий буфер, фосфатний буфер; міцний синій RR сіль «Merck», Німеччина, *n*-нітрофеніловий естер оцтової кислоти «Merck», Німеччина.

Використовували прилади Mini – ProteanI V Electroforetic Cell (Bio – Rad, США), центрифуга K 24, спектрофотометр ULAB, рН метр.

Методи: диференційне центрифугування, нативний електрофорез у ПААГ, двовимірний електрофорез у ПААГ, спектрофотометрія, потенціометрія.

3.2. *Умови проведення експерименту.*

Експерименти проводилися в лабораторних умовах, процедури виділення хлоропластів, отримання фракції розчинних білків строми хлоропластів, електрофоретичного розділення нативних білків, визначення їх специфічної ферментативної активності проводилися за температури 2–4 °С.

3.3. Виділення хлоропластів з листя гороху.

3.3.1. Гомогенізація. Листя гороху промити дН₂О, обсушують на фільтровальному папері; 70-40 г листя залишають на ніч у холодильнику (4 °С); 200 мл середовища виділення (40 мМ Трис НСІ, 0.4 М сорбітол, 5 мМ ЕДТА, 10 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 0.05% цистеїн, 0.1% БСА, 5мМ аскорбат натрію, 1 мМ ФМСФ, рН 7.8) заморожують (-20 °С, ~ 120 хв.), та додають до листя; суміш гомогенізують (15-20 сек., блендер) та фільтрують крізь потрійний шар марлі.

3.3.2. Виділення фракції хлоропластів методом диференціального центрифугування у градієнті щільності сахарози. Фільтрат центрифугують 200g, 5 хв.; супернатант ц/ф 2500g, 10 хв.; осад (хлоропласти) ресуспендують у 24 мл середовища: 0.5 М сахароза, 40 мМ Трис НСІ (рН 7.8), 10 мМ NaCl, 1мМ MgCl₂, KCl 10 мМ, 0.750 М амінокапронова к-та; та наносять (по 6 мл суспензії) на ступінчастий градієнт сахарози: 1.5 М – 5 мл, 1.0 М – 10 мл, 0.8 – 7 мл; центрифугування 1000g, 20 хв (4 °С). Фракцію очищених хлоропластів (найнижча фракція) ресуспендують у 50 мл середовища ресуспендування (40 мМ Трис НСІ, 0.4 М сорбітол, 5 мМ ЕДТА, 10 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, рН 7.8), ц/ф 2500g, 10 хв.

3.4. Виділення розчинних білків стромы хлоропластів та РубісКО методом диференціального центрифугування.

Осад (очищені хлоропласти) ресуспендують у 50 мл середовища шокування (40 мМ Трис НСІ, 2 мМ ЕДТА, 15 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 0.750 М амінокапронова к-та, 1 мМ ФМСФ, рН 7.8), інкубація 20 хв. ц/ф – 15000g, 10 хв. Супернатант використовують для аналізу розчинних білків стромы хлоропластів та виділення РубісКО.

3.5. Визначення концентрації хлорофілу за методом Арнона та концентрації білку за методом Лоурі.

Визначення концентрації білку за методом Лоурі [42]. 100 мкл проби + 2 мл 5% ТХУ інкубують 60–120 хв. (ніч) за температури 4 °С; ц/ф 3000 об/хв, 10 хв. До осаду додають 4 мл холодного ацетону та інкубують 15 хв. за температури 4 °С; ц/ф 3000 об/хв, 10 хв. До одержаного осаду додають 2 мл 0.2 н NaOH (інкуб. 10 хв. водяна баня); ц/ф 3000 об/хв, 10 хв. Для виміру білку за методом Лоурі використовують 0.2 мл супернатанту та 0.2 мл дН₂O, 0.4 мл проби (спектрофотометр ULAB, λ750 нм, l=10 мм, контроль – дН₂O). Концентрацію білку (мкг/мл) визначають за допомогою калібрувального графіку.

Визначення концентрації хлорофілу за методом Арнона [43]. До 1 мл суспензії хлоропластів (тилакоїдів) додають 1 мл дН₂O і доводять об'єм до 10 мл 100% ацетоном та перемішують; ц/ф 3000 об/хв, 10 хв.; виміряють поглинання супернатанту на спектрофотометрі ULAB , λ 652 нм, l=10 мм, контроль – 80% ацетон; значення поглинання розчину (A_{652}) використовують для розрахунку кількості хлорофілу у суспензії за формулою Арнона. В 1 мл суспензії хлоропластів знаходиться ($0.29 A_{652}$) мг хлорофілу.

3.6. Двовимірний електрофорез білку у ПААГ

3.6.1. Електрофорез нативного білку у ПААГ.

Електрофорез проведено на приладі Mini – Protean I V Electroforetic Cell (Bio – Rad, США) (див. рис. 5).



Рис. 5. Прилад Mini – Protean I V Electroforetic Cell

Блоки ПААГ 70x 80x 1.5 мм; розділяючий (робочий) гель – градієнт 4%–11%; акриламід у 0.375 М Трис НСІ (рН8.8) буфері; концентруючий (формуєчий) гель – 3.75% акриламід у 0.0625 М Трис НСІ (рН 6.8) буфері; верхній (катодний) електродний буфер – трис-гліциновий (25 мМ Трис НСІ, 192 мМ гліцин), рН 8.3; нижній (анодний) електродний буфер – трис-гліциновий (25 мМ Трис НСІ, 192 мМ гліцин), рН 8.3.

Для забезпечення зміщення заряду у катодний електродний буфер додають 0.005% розчину ДСН. Білкова проба (10 – 40 мкл) перед нанесенням у лунку гелю мала такий склад: кількість білку – 40 мкг, трис-гліцерин – 10%, рН 6.8 – 0.0625М, бромфеноловий синій – 0.0032%, меркаптоетанол – 4.8%.

Електрофорез проводять за температури 4 °С, 50V – 60 хв, 125 V – 120 хв. Гелі для візуалізації білкових зон обробляють барвником кумасі G-250 (0.04%) за наявності 3% хлорної кислоти.

3.6.2. ДСН електрофорез у другому напрямку. Смужку гелю після нативного електрофорезу інкубують 5 хв. за кімнатної температури та 20 сек. – на водяній бані; 10 хв. – за кімнатної температури у 5 мл ДСН – буфера наступного складу: Трис НСІ 0.0625 М, ДСН 1%, гліцерин 10%, бромфеноловий синій 0.0015%, меркаптоетанол 1%. Смужку гелю після інкубації у ДСН – буфері обережно переносять у підготовану лунку концентруючого гелю для проведення ДСН – електрофорезу (ДСН-електрофорез у другому напрямку, система Леммлі).

3.6.3. Електрофорез білку у ПААГ за участі додецилсульфату натрію (ДСН). Використовують модифіковану систему Леммлі (Laemmli, 1970). Прилад Mini – ProteanI V Electroforetic Cell (Bio – Rad, США). Блоки ПААГ 70x80x1.5 мм; розділяючий (робочий) гель – градієнт 10% - 20% акриламід у 0.375 М Трис НСІ (рН8.8) буферу, 0.1% ДСН; концентруючий (формуєчий) гель – 4% акриламід у 0.0625 М Трис НСІ (рН 6.8) буферу, 0.1%

ДСН; верхній (катодний) електродний буфер – трис-гліциновий (25 мМ Трис НСІ, 192 мМ гліцин), рН 8.3, 0.1% ДСН; нижній (анодний) електроднийбуфер – трис-гліциновий (25 мМ Трис НСІ, 192 мМ гліцин), рН 8.3, 0.1% ДСН. Електрофорез проводять за кімнатної температури; 50 V – 45 хв, 80 V – 120 хв.

Гелі для візуалізації білкових зон обробляють барвником кумасі R-250 (0.2%) за наявності оцтової кислоти – 10%, етанолу – 45%

3.7. Визначення карбоангідразної (КА) та естеразної активностей РубісКО у ПААГ після нативного електрофорезу.

Виявлення КА активності. Визначення карбоангідразної активності у ПААГ проведено за методом Edwards, Patton (1966), а саме: гелі інкубують (30 хв. за кімнатної температури) у 44 мМ трис-вероналовому буфері (рН 8.1) у присутності 0.1% бромтимолового синього; гелі занурюють у воду, насичену CO₂ (0 °С). У зонах КА активності спостерігають зміну забарвлення індикатора з синього на жовтий.

Виявлення естеразної активності. Естеразну активність у ПААГ виявляють, інкубуючи гелі у буферній системі: 0,2 М фосфатний буфер; міцний синій RR сіль; натрієва сіль нафтилацетату. Білкові смуги, що мають естеразну активність, забарвлюються у чорний колір.

3.8. Вимірювання карбоангідразної та естеразної активності очищеного РубісКО.

КА активність вимірюють за допомогою скляного електрода за температури 2 °С в 14 мМ вероналовому буфері (рН 8.4), за наявності зразка, починаючи реакцію додаванням води, що насичена CO₂ при 0 °С, та вимірюючи зміни рН від 8.3 до 7.8. Активність КА подають в мк Молях Н⁺ на мг білка за хвилину з урахуванням буферної ємності середовища та зразків, що визначалась титруванням 0.1 М НСІ; естеразну активність визначають, як описано раніше [56]. Естеразну активність ізольованого РубісКО визначають

за температури 25 °С у розчині за швидкістю гідролізу *n*-нітрофенілового естеру оцтової кислоти (*n*-НФЕ) [55, 56]. Реакційне середовище (2 мл) містить 5 мМ трис-НСl (рН 7,8), 0,5 мМ *n*-НФЕ оцтової кислоти і 80-150 мкг РуБісКО.

Усі дослідження нами проведено не менше, ніж у трьох біологічних повторностях. Кількість аналітичних повторностей у межах однієї біологічної – три. Естеразну активність РуБісКО подавали в мкмольх *n*-нітрофенолу, що утворювався за хвилину після внесення субстрату, у розрахунку на 1 мг білка.

РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ ТА ІНГІБІТОРІВ СУЛЬФАНІЛАМІДНОЇ ПРИРОДИ НА ПОЛІФЕРМЕНТНУ АКТИВНІСТЬ РУБІСКО З ЛИСТЯ ГОРОХУ

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

4.1. Виділення хлоропластів з листя гороху.

Виділення хлоропластів з листя гороху проведено за допомогою методу диференціального центрифугування [6, 9, 44, 45].

Гомогенізацію необхідно проводити за наявності у середовищі виділення інгібіторів протеаз (ФМСФ, амінокапронової кислоти). Для отримання фракції очищених хлоропластів методом центрифугування у градієнті щільності сахарози збирали найнижчу фракцію (рис. 6)



Рис. 6. Очищення хлоропластів у ступічастому градієнті сахарози

4.2. Виділення РубісКО за допомогою метода нативного електрофорезу у ПААГ.

Для отримання активного нативного білку РубісКО у процесі диференціального центрифугування необхідно використовувати середовище,

яке містить інгібітори протеаз амінокапронову кіслоту та ФМСФ. Середовище мало склад: 40 мМ Трис НСІ, 2 мМ ЕДТА, 15 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 0.750 М амінокапронова к-та, 1 мМ ФМСФ, рН 7.8.

Отримані результати свідчать, що за таких умов в процесі експерименту можна отримати нативні активні молекули РуБісКО (рис. 7) .

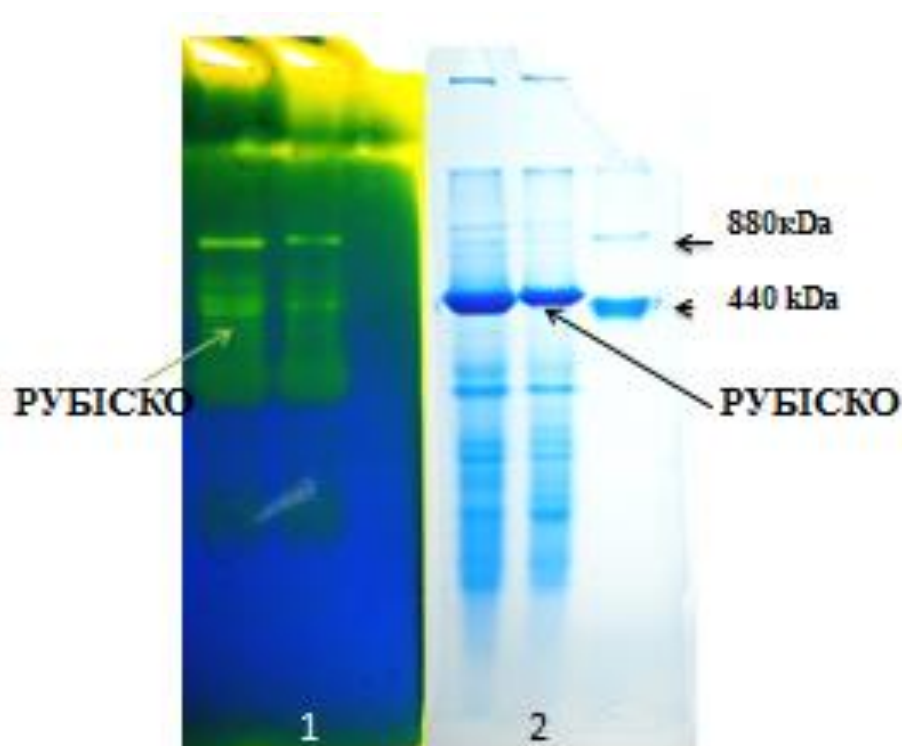


Рис 7. Електрофореграма розчинних нативних білків стромы хлоропластів гороху в ПААГ: 1 – гель, проінкубований у середовищі для визначення карбоангідразної активності. 2 – гель, оброблений барвником кумасі G – 250.

Для ідентифікації РуБісКО використовували метод електрофорезу у другому напрямку (електрофорез за наявності ДСН, система Леммлі) (див. рис. 8).

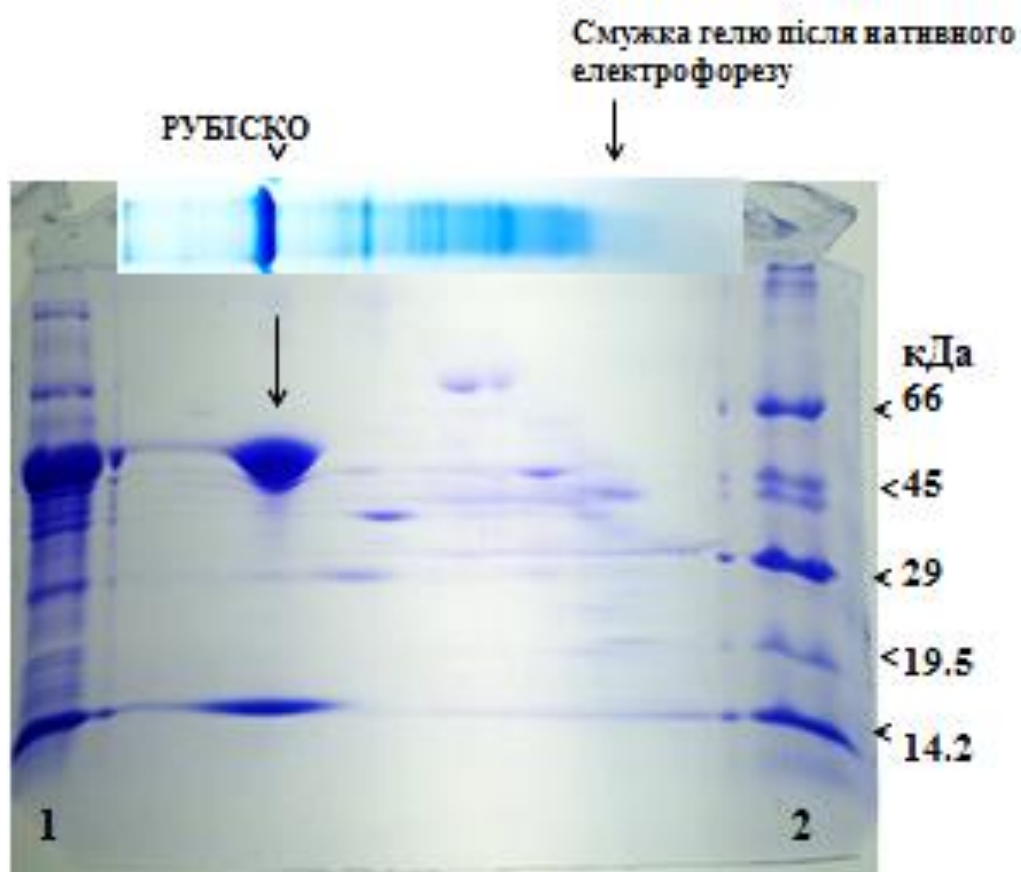


Рис. 8. Електрофорез у другому напрямку (система Леммлі) розчинних нативних білків стромы хлоропластів гороху (1 – пептидний склад стромальних білків хлоропластів; 2 – білки-маркери (66 – Albumin from bovine serum, 45 – Albumin from chicken egg white, 29 – Carbonic Anhidrase, 19.5 – Ferretin, 14.2 – α -Lactalbumin).

Після розділення нативних білків та білкових комплексів (перший напрямком) смужка гелю вирізалася, інкубувалася за наявності ДСН та меркаптоетанолу та поміщалася у систему денатуруючого ДСН-електрофорезу (система Лемлі). ДСН-електрофорез у другому напрямку поліпептидного комплексу показав наявність усіх субодиниць РуБісКО 2 пептидних складових (див. рис. 1): субодиниці L (56 кДа) та субодиниці S (14 кДа) [46].

Розчин очищеного нативного РуБісКО отримували після проведення електрофоретичної елюції білка зі смужки ПАА геля, яку вирізали з пластин ПААГ після проведення нативного електрофорезу (рис. 9).

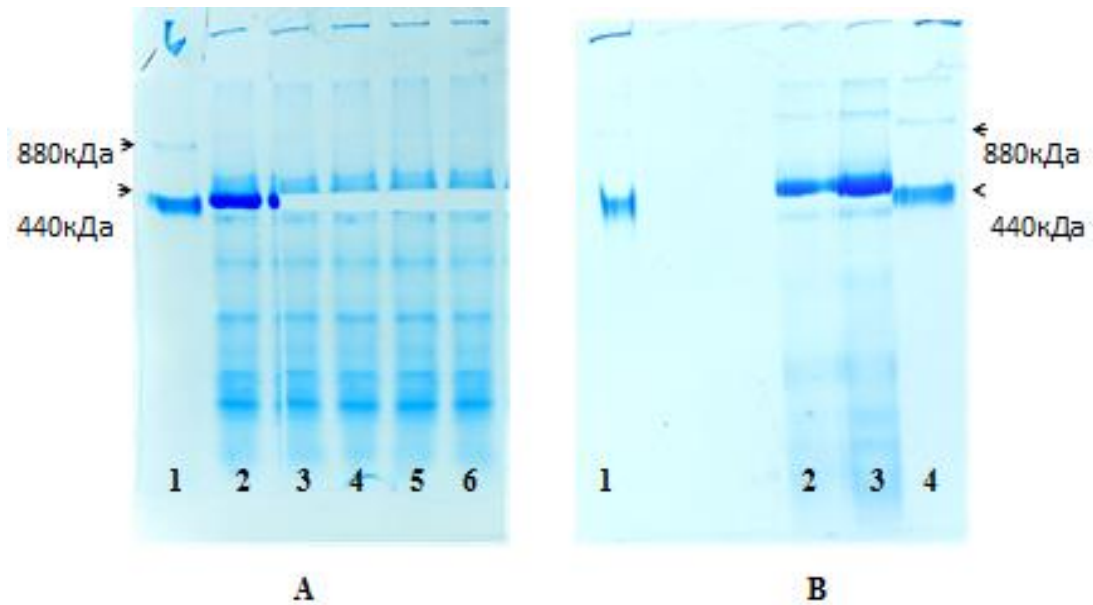


Рис. 9. Загальна схема отримання електрофоретично чистого нативного РубісКО з хлоропластів гороху. **А** – електрофореграма розчинних нативних білків строми хлоропластів шпинату в ПААГ (1- білки маркери (феритин), 2-6 – смужка геля, що вирізали у зоні розташування РубісКО для проведення електрофоретичної елюції білка). **В** – електрофореграма розчинних нативних білків строми хлоропластів шпинату в ПААГ (1- очищений РубісКО, 2-3 – розчинні білки строми, 4 – білки-маркери (перетин).

4.3. Дослідження впливу інгібіторів сульфаніламідної природи на карбоангідразну та естеразну активності РубісКО.

Для виявлення карбоангідразної активності у ПААГ після нативного електрофорезу важливим є наявність у інкубаційному середовищі інгібіторів протеаз [5] (ФМСФ, амінокапронової кислоти). Отримані результати свідчать про наявність носіїв карбоангідразної активності у зонах розташування РубісКО (рис. 10).

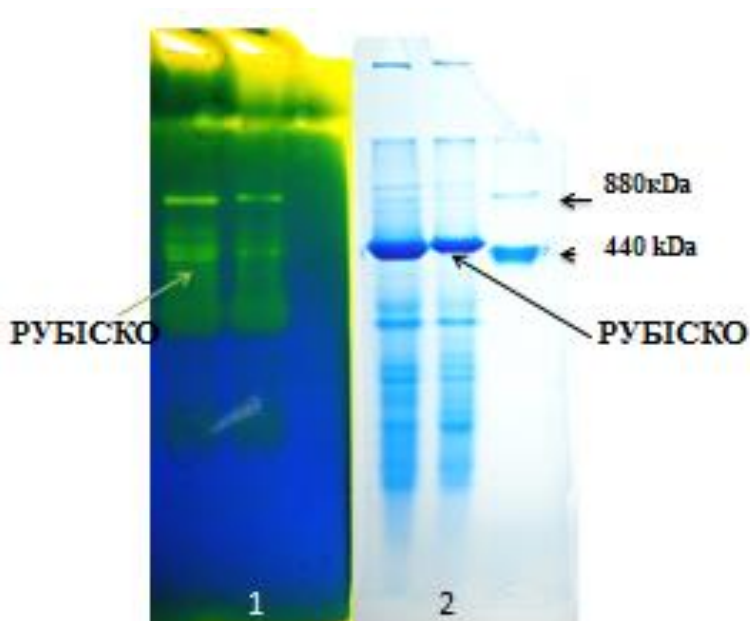


Рис. 10. Карбоангідразна активність, визначена у ПААГ (1 – гель, проінкубований у середовищі для визначення карбоангідразної активності. 2 – гель, оброблений барвником кумасі G – 250).

Результати дослідження впливу ліпофільного етоксизоламідів та водорозчинного ацетозоламідів на ферментні активності РУБІСКО комплексу показують, що сульфаніламідні інгібітори гальмують як карбоангідразну, так і естеразну активності. Але динаміка цих процесів має свої особливості (див. табл.1 та табл. 2).

Табл 1. Вплив етоксизоламідів на ферментну активність РуБісКо

Етоксизоламід, мкМ	Карбоангідразна активність, мкмоль Н ⁺ /мг білка x хв	Естеразна активність, мкмоль п-нітрофенолу/ мг білка x хв
2	130±8.5	20±0.44
5	125±8.0	15±0.37
10	100±7.5	10±0.24
15	80±3.0	7.0± 0.19
20	45±1.4	4.1± 0.15
40	20± 0.07	2.0±0.08
50	5.0 ± 0.01	0
контроль	140± 10.5	20±0.45

Таблиця 2. Вплив ацетозоламіду на ферментну активність РУБІСКО

Ацетозоламід, мкМ	Карбоангідразна активність, мкмоль Н ⁺ /мг білка x хв	Естеразна активність, мкмоль п-нітрофенолу/ мг білка x хв
2	125±8.0	15±0.44
5	80±3.0	10±0.37
10	50±2.0	4.3±0.19
15	40±1.1	3.5±0.09
20	15±0.05	1.5± 0.05
40	0	0
50	0	0
контроль	140±8.5	20±0.45

Результати підтверджують дані, отримані раніше [57, 59] і є продовженням досліджень, щодо впливу екзогенних чинників на активні центри РуБісКО. Ліпофільний етоксизоламід остаточно блокує роботу ферменту у діапазоні концентрацій 50 мкМ, тоді як водорозчинний ацетозоламід – у діапазоні концентрацій 20-30 мкМ.

4.4. Дослідження впливу іонів Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} на карбоангідразну та естеразну активності РУБІСКО.

Дослідження впливу іони металів на ферментні активності РУБІСКО свідчать, що іони Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} гальмують як карбоангідразну, так і естеразну активності ферментів. Але динаміка цих процесів має свої особливості та найбільший інгібуючий ефект притаманний іонам Zn^{2+} (табл.3), хоча іони цинку, як повідомлялось раніше [58], в порівнянні з іншими іонами, суттєво менше інгібують розчинні форми карбоангідраз строми хлоропластів гороху.

Табл. 3. Вплив іонів важких металів на ферментну активність РУБІСКО з хлоропластів гороху.

Іони металів 10мкМ	Карбоангідразна активність, мкмоль Н ⁺ /мг білка x хв	Естеразна активність, мкмоль н-нітрофенола/ мг білка x хв
Zn ²⁺	45.0±2.5	10.0±0.25
Cu ²⁺	85.0±7.0	19.0±0.8
Cd ²⁺	70.0±4.8	18.5± 0.7
Pb ²⁺	110.0±6.5	12.0±0.5
КОНТРОЛЬ	160.0± 10.5	30±0.45

Отримані результати, що узагальнено в табл. 3, підтверджують дані, отримані раніше [58, 59] і свідчать про те, що наявність іонів важких металів, навіть у мікромолярних кількостях, суттєво впливають на поліферментну активність РУБІСКО. На нашу думку, дослідження можуть бути продовжені з метою встановлення мінімальних концентрацій іонів у середовищі, що не інгібують роботу фермента.

Таким чином, запропонований у роботі метод ідентифікації та виділення РуБісКО з використанням двовимірного електрофорезу та електрофоретичної елюції дає можливість визначати певну ферментну активність комплексу у пластинах ПААГ (експрес-аналіз), а також вивчати вплив різноманітних чинників як ендогенного, так і екзогенного походження на ферментні властивості електрофоретично чистого мультибілкового комплексу. Такий методичний підхід може бути застосований для аналогічних досліджень щодо інших білкових та пігмент-білкових комплексів рослинної клітини.

ВИСНОВКИ

1. Здійснено огляд наукової літератури стосовно біологічної ролі, структури та механізму каталітичної дії рибулозобісфосфаткарбоксилази/оксигенази. Проаналізовано механізми регуляції поліферментної активності РуБісКО.

2. Відпрацьована методика виділення хлоропластів, розчинних нативних стромальних білків та ферментного комплексу РуБісКО з листя гороху.

3. Удосконалено метод двовимірного електрофорезу у ПААГ для виділення та ідентифікації РуБісКО хлоропластів.

4. Досліджено вплив іонів Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} на карбоангідразну та естеразну активності РУБІСКО. Показано, що іони важких металів, навіть у мікромольних кількостях, суттєво впливають на поліферментну активність РуБісКО. Найбільший інгібуючий ефект мають іони Zn^{2+} .

5. Досліджено вплив етоксизоламідів та ацетозоламідів на поліферментну активність РуБісКО. Доведено, що ліпофільний етоксизоламід остаточно блокує роботу ферменту у діапазоні концентрацій 50 мкм, тоді як водорозчинний ацетозоламід – 20–30 мкм.

6. Розглянуто вплив ендогенних та екзогенних чинників у регуляції поліферментних властивостей рибулозобісфосфаткарбоксилази/оксигенази, під час «темнових» реакцій фотосинтезу.

7. Результати досліджень кваліфікаційної роботи оприлюднено в матеріалах Всеукраїнських конференцій і можуть бути використані в навчальному процесі з хімічних дисциплін у закладах середньої та вищої освіти.

ЛІТЕРАТУРА

1. Мокроносов Ф.Т., А.Т. Мокроносов., Гавриленко Т.В. Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты: учебник для студ. вузов под ред. И.П. Ермакова. 2-е изд., испр. и доп. Москва: Издательский центр «Академия», 2006. 448 с.
2. Эдвардс Дж., Уокер Д. Фотосинтез C_3 и C_4 растений: механизмы и регуляция. Москва: Мир, 1986. 590 с.
3. Игнатова Л. К., Руденко Н. Н., Христин М. С., Иванов Б. Н. Гетерогенная природа карбоангидразной активности тилакоидных мембран: *Биохимия*, 2006. С. 651–659.
4. Золотарева Е.К. Протонная регуляция процессов фотосинтетической трансформации энергии: *Физиол. биох. культурных растений*, 2010. С. 37–50.
5. Семеніхін А.В. Метод двовимірного електрофорезу у дослідженні поліферментних властивостей АТФ-синтази хлоропластів шпинату / А.В.Семеніхін, С.В.Репанка, В.В.Суховєєв, М.Ф. Гурбуз: Збірник статей «Фундаментальні та прикладні дослідження в сучасній хімії» за матеріалами V Міжнародної заочної науково-практичної конференції молодих учених (Ніжин, 12 квітня 2018 р.) / заг. ред. В.В.Суховєєва. Ніжин: НДУ ім. Миколи Гоголя, 2018. С. 119–123.
6. А.В. Семеніхін. Карбоангидраза активність чинника спряження CF₁, ізольованого з хлоропластів шпинату. *Доповіді Національної академії наук України*. 2014. № 9. С. 141–145.
7. Игнатова Л.К., Москвин О.В., Иванов Б.Н. Влияние ингибиторов карбоангидразы на протонный обмен и фотосинтез протопластов гороха: *Физиол.* 2001. С. 545–550.
8. Подорванов, В.В. Семеніхін А.В, Поліщук О.В. Карбоангидраза тилакоїдів. Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку: у 2 т./ НАН України, Ін-т фізіології рослин і генетики. Київ: Логос, 2009, С. 150–159.

9. Semenihih A.V., Zolotareva O.K. Carbonic anhydrase activity of integral-functional complexes of thylakoid membranes of spinach chloroplasts: *Ukr. Biochem. J.* 2015. Vol. 87, No 3. P. 47–56.
10. Wynne D., Gisburgs S., Shaltin Y. Beefliveresterase. Kinetic properties: *Arch. Biochem. Biophys.* 1973. P. 204–211.
11. Shutova T., Kenneweg H., Buchtta J. et al. The photosystem II-associated Cah3 in *Chlamydomonas* enhances the O₂ evolution rate by proton removal: *EMBO J.* 2008. P. 782–791.
12. Мулкиджанян А. Я. Динамика переноса протона на границе раздела фаз мембрана -вода и механизм биологического преобразования энергии / Мулкиджанян А. Я., Черепанов Д. А., Хеберле И., Юнге В.: *Биохимия.* 2005. Т. 70, № 2. С. 308–314.
13. Carrozzo R., Wittig I., Santorelli F. M., Bertini E., Hofmann S., Brandt U., Schägger H. 2006. Subcomplexes of human ATP synthase mark mitochondrial biosynthesis disorders. *Ann. Neurol.* 59: 265—275.
14. Anderson J.M. Does functional photosystem II complex have anoxygen channel: *FEBS Lett.* 2001. P. 1–4.
15. Hankamer B., Barber J. and Boekema E.J. Structure and membrane organization photosystem II in green plants : *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1997. P. 641–671.
16. Coleman W.J., Govindjee, Gutowsky H.S. Involment Ca²⁺ and Cl⁻ binding to oxygen evolution complex photosystem II : *Progress in photosynthesis research / Ed. J. Biggins. – Netherlands: Martinus Nijhoff. Publ.* 1987. P. 629–632.
17. Shen J.R. Possible functional difference between dimer and monomer photosystem II complexes: In: *Photosynthesis: mechanisms and effects.* – Ed. Garab G. *Kluwer Acad. Publ.* 1998. P. 941–944.
18. Senior A.E., Nadanaciva S., Weber J. The molecular mechanism of ATP synthesis by F₁F₀- ATP synthase F: *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. P. 188–211.

19. Turina P., Samoray D., Graber P. H⁺ ATP ratio of proton transport-coupled ATP synthesis and hydrolysis catalysed by CF₀CF₁-liposomes. *The EMBO Journal*. 2003. P. 418–426.
20. Kagawa Y. Reconstitution of the energy transformer, gate and channel subunit reassembly, crystalline ATPase and ATP synthesis: *Biochim. Biophys. Acta*. 1978. P. 45–93.
21. Barbagallo R.P., Breyton C. and Finazzi G. Kinetic effects of the electrochemical proton gradient on plastoquinone reduction at the Q_i site of the cytochrome b₆f complex: *J. Biol. Chem.* 2000. P. 121–127.
22. Whitelegge J.P., Zhang H., Aguilera R., Taylor R.M. and Cramer W.A. Full subunit coverage liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LCMS⁺) of an oligomeric membrane protein: *Mol. Cell. Proteomics*. 2002. P. 816–827.
23. Karnauchov I., Herrmann R.G and Klosgen R.B. Transmembrane topology of the Rieske Fe/S protein of the cytochrome b₆/f complex from spinach chloroplasts: *FEBS Lett*. 1997. P. 206–210.
24. Clark R.D., Hind G. Isolation of a five-polypeptide cytochrome b₇-f complex from spinach chloroplasts : *J. Biol. Chem.* 1983. P. 348–354.
25. Zhang H., Whitelegge J.P. and Cramer W.A. Ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase is a subunit of the chloroplast cytochrome b₆/f complex: *J. Biol. Chem.* 2001. P. 159–165.
26. Bald D., Noji H., Yoshida M., Hirono-Hara Y. and Hisabori T. Redox regulation of the rotation of F₁-ATP synthase : *J. Biol. Chem.* 2001. P. 505–507.
27. Mellwing C., Bottcher B. A unique resting position of the ATP-synthase from chloroplasts: *J. Biol. Chem.* 2003. P. 544–564.
28. The binding change mechanism for ATP synthase – some probabilities and possibilities : *Biochim. Biophys. Acta*, 1993. P. 215-250.
29. Seelert H., Dencher N.A., Muller D.J. Fourteen protomers compose the oligomer III of the proton-rotor in spinach chloroplast ATP synthase : *J. Mol. Biol.* 2003. P. 337–344.

30. Wittig I., Karas M., Schagger H. High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol. Cell. Proteomics*. 2007. P.215–225.
31. Колесниченко А.В., Остроумова Е.А., Зыкова В.В., Войников В.К. Белки четырех видов злаков, иммунохимически родственные стрессовому белку 310 кД : *Физиол. Раст.* 2000. С. 199–202.
32. Allen J. M., Hyncik G. Localization of alkaline phosphatases in gel matrices following electrophoresis F: *J. Histochem. Cytochem.* 1963. P. 169–175.
33. Scagger H., Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 1991. P. 223–231.
34. Yan L. J., Yang S. H., Shu H., Prokai L., Forster M. J. Histochemical staining and quantification of dihydrolipoamide dehydrogenase diaphorase activity using blue native PAGE. *Electrophoresis*. 2007. Vol. 28. P. 1036–1045.
35. Ärvi S. J., Suorsa M., Paakkarinen V., Aro E.-M. Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: novel super- and mega-complexes: *Biochem.* 2011. P. 207–214.
36. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 : *Nature*. 1970. P. 680–685.
37. Srivastava K., Chaves J. M., Srivastava O. P., Kirk M. Multi-crystallin complexes exist in the water-soluble high molecular weight protein fractions of aging normal and cataractous human lenses. *Exp. Eye Res.* 2008. 356–366.
38. Scagger H., Cramer W.A., von Jagow G. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 1994. P 220–230.
39. Anderson L., Borg, H., Mikaelsson M. Molecular weight estimation of proteins by electrophoresis in polyacrylamide gels of graded porosity : *FEBS Lett.* 1972. Vol. 20. P. 199–202.
40. Edwards L.J., Patton R.L. Visualization of carbonic anhydrase activity in polyacrylamide gel: *Stain Technol.* P. 333–334.

41. Gomori G. Preparation of buffers for use in enzyme studies: *Meth. Enzymol.* 1955. P. 138–146.
42. Arnon D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenolase in *Beta vulgaris* : *Plant Physiol.* 1949. 24. P. 1–15.
43. Ignatova L. K., Rudenko N.N., Mudrik V. A. , T.P. Fedorchuk, B. N. Ivanov Carbonicanhydrase activity in *Arabidopsisthaliana* thylakoid membrane and fragmentsenriched with PSI or PSII : *Photosynth. Res.* 2011. P. 998.
44. Репанка С.В. Регуляція активності АТФ синтази хлоропластів шпинату/ С.В.Репанка, А.В.Семеніхін, В.В.Суховєєв : Хімічна та екологічна освіта: стан і перспективи розвитку: збірник наукових праць Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції / За заг. ред. О.А. Блажка. Вінниця: ТОВ «Нілан-ЛТД», 2017. С. 191–193.
45. Семеніхін А.В. Метод двовимірного електрофорезу у дослідженні поліферментних властивостей АТФ-синтази хлоропластів шпинату / А.В.Семеніхін, С.В.Репанка, В.В.Суховєєв, М.Ф. Гурбуз : Збірник статей «Фундаментальні та прикладні дослідження в сучасній хімії» за матеріалами V Міжнародної заочної науково-практичної конференції молодих учених (Ніжин, 12 квітня 2018 р.) / заг. ред. В.В.Суховєєва. Ніжин: НДУ ім. Миколи Гоголя, 2018. С. 119–123.
46. Aro E.M., Suorsa M., Rokka A., Allahverdiyeva, Y., Paakkarinen V., Saleem A., Battchikova N., Rintamaki E. Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes: *J. Exp. Bot.* 2005. P. 347–356.
47. Машковский М.Д. Взаимодействие лекарств и эффективность фармакотерапии / Под ред. И.М. Перцева. Лекарственные средства: В 2 т. Москва : Новая волна 2002. Т. 1. 540 с.
48. Golovina T.O. et al. A convenient method – bound protein: *Anat. Biochem.* 1977. Vol. 83. № 2. P. 778.
49. Marrakchi S, Maibach HI . Sodium lauryl sulfate-induced irritation in the human face: regional and age-related differences: *Skin Pharmacol. Physiol.* 2007. P. 177–80.

50. Лидин Р. А. «Справочник школьника. Химия» М.: Астерель, 2003. С. 28.
51. Волков, А.И., Жарский, И.М. Большой химический справочник : Современная школа, 2005. 191 с.
52. Химическая энциклопедия / Редкол.: Зефиров Н.С. и др. М.: Большая Российская энциклопедия, 1998, Т. 5 (Три-Ятр). 783 с.
53. Lide, D. R., CRC Handbook of Chemistry and Physics editor. 86th. Boca Raton (FL) : CRC Press. 2005. P 26–56.
54. Ягужинский Л.С., Гудзь Т.И., Верховский А.Б. Эстеразная активность олигомицинчувствительной АТФ-азы митохондрий: *Биохимия*. 1978. **43**, № 11. С. 2058–2063.
55. Ефимцева Э.А., Челпанова Т.И. Активность эстераз в тканях различных отделов желудочно-кишечного тракта северного оленя: *Сельскохозяйственная биология*. 2007. № 6. С. 77–80.
56. W u n n e D., G i n s b u r g S., S h a l t i n Y. Beef liver esterase. Kinetic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 1973. Vol. 154. P. 204–211.
57. Семеніхін А.В., Суховєєв В.В., Полякова М. В., Потєбня Г.П. Вплив екзогенних чинників на поліферментну активність РУБІСКО хлоропластів з листя гороху / заг. ред. В.В.Суховєєва. Ніжин : НДУ ім. Миколи Гоголя. 2021. С. 98–102.
58. Семеніхін А.В., Суховєєв В.В., Лукач В.С., Скалацька Т.Г. Вплив іонів важких металів на поліферментну активність РУБІСКО та АТФ синтази хлоропластів з листя гороху / заг. ред. В.В.Суховєєва. Ніжин : НДУ ім. Миколи Гоголя. 2021. С. 103–108.
59. А. В. Семеніхін, В. В. Суховєєв, М. В. Патица, В. С. Лукач. Вплив екзогенних чинників на поліферментну активність РуБісКО та АТФ-синтази хлоропластів з листя гороху. *Журнал органічної та фармацевтичної хімії*. 2021. С. 21–27.

60. Макрушин М.М., Макрушина Є.М., Петерсон Н.В., Мельников М.М. Фізіологія рослин. / за редакцію професора М.М.Макрушина. Підручник. Вінниця: Нова Книга. 2007. 417 с.
61. Miziorko, H. M. & Lorimer, G. H. A. *Rev.: Biochem.* 1983. P. 507–535.
62. URL: <https://vseosvita.ua/library/do-uroku-biologii-tema-fotosintez-istoria-jogo-vidkritta-ta-planetarne-znacenna-315580.html> (дата звернення: 12.12.2021).