

ВПЛИВ НІТРАТУ НІКЕЛЮ НА ПОЛІПЕПТИДНИЙ СКЛАД БІЛКІВ У ПРОРОСТАЮЧОМУ НАСІННІ КУКУРУДЗИ

В. Лашко, О. Вінниченко

*Науково-дослідний інститут біології Дніпропетровського національного
університету імені Олеся Гончара
пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ 49010, Україна
e-mail: vitalashik@rambler.ru*

Досліджено особливості змін у поліпептидному складі білків *Zea mays* L. за дії нітрату нікелю різної концентрації на стадії проростання насіння. Встановлено суттєві зміни електрофоретичного спектра білків за дії важкого металу.

Ключові слова: *Zea mays* L., нітрат нікелю, електрофоретичний спектр, білки.

Вивчення механізмів дії важких металів на рослини, які базуються на морфофізіологічних властивостях рослин і фізико-хімічних властивостях металів, є одним із актуальних завдань у зв'язку з можливістю використання рослин для фіторе mediaції ґрунтів, забруднених важкими металами, а також для запобігання потраплянню важких металів в організм людини і тварин [3]. Відомо, що стійкість рослин до дії важких металів забезпечується молекулярними та фізіологічними механізмами, які можуть бути специфічними як для конкретного виду рослин, так і для цілої таксономічної групи того чи іншого рівня [5]. Дія важких металів, зокрема нікелю, на проростання насіння на сьогодні вивчена недостатньо [4, 6, 9].

Ефект важких металів на проростання залежить від їх здатності проникати крізь покриви насіння та від їх впливу на фізіологічні процеси, що пов'язані з проростанням. У зв'язку з недостатньою вивченістю впливу нікелю на білковий обмін проростаючого насіння метою нашої роботи було вивчення вмісту та складу білків насіння *Zea mays* L. на стадії проростання за впливу нітрату нікелю різної концентрації.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження було проростаюче насіння кукурудзи (*Zea mays* L.) середньораннього гібриду Оржиця 237 МВ за 24-, 96-годинної експозиції на розчинах нітрату нікелю у концентраціях 0,05; 0,5; 1 та 5 мМ та через 120 год після припинення дії хімічного стресора. Сумарні білки насіння кукурудзи екстрагували 0,0125 М натрій-боратним буфером (рН 10) з додаванням 1% додецилсульфату натрію та 2% β-меркаптоетанолу і розділяли методом денатуруючого електрофорезу у градієнтному (10–20%) поліакриламідному гелі [8], використовуючи як маркери яєчний альбумін (M_r 45 кД), рибонуклеазу (M_r 14 кД), бичачий сироватковий альбумін (M_r 67 кД). Денситометрію проводили за допомогою програми Електрофор-менеджер, 2004 р. Вміст білка у зерні визначали за методом Бредфорд [7]. Статистичну обробку даних, отриманих у трьох аналітичних повторностях, проведено за допомогою програми Microsoft Statistica 6.0, різницю між вибірками вважали достовірною при $p < 0,05$.

Результати і їхнє обговорення

Результати досліджень показали, що за 24-годинної експозиції насіння кукурудзи Оржиця 237 МВ на нітраті нікелю різної концентрації визначено наявність восьми середньо- та низькомолекулярних компонентів з M_r від 11 до 60 кД (див. таблицю). Під впливом

$\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ у концентрації 0,05 мМ зникає білок із молекулярною масою 54 кД. Вміст компонентів 60 і 14 кД зменшується щодо контролю, а вміст компонентів 37 і 22 кД – збільшується. За концентрації 0,5 мМ нітрату нікелю кількість поліпептидів не змінювалася щодо контролю, але зафіксовано суттєве накопичення білків з M_r 60, 29, 22 та 14 кД. Також спостерігалось значне зниження вмісту компонента з M_r 37 кД. За дії нітрату нікелю у концентрації 1 мМ кількість компонентів зменшилася до шести. Повністю зникали білки з M_r 60 і 54 кД. Відбувалося підвищення вмісту низькомолекулярних білків з M_r 29, 22, 19 та 14 кД. У той же час спостерігалось значне зменшення вмісту поліпептидів з M_r 37 кД. За дії $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ у концентрації 5 мМ виявлено сім поліпептидів. Поряд із відсутністю білка з M_r 60 кД спостерігалось зменшення вмісту компонентів з M_r 37, 19 та 11 кД. Слід зазначити суттєве збільшення вмісту поліпептидів з M_r 29, 22 та 14 кД. Таким чином, короткотривалий стрес (24-годинна експозиція) викликав збільшення вмісту поліпептидів з M_r 29, 22 та 14 кД (за винятком концентрації 0,05 мМ). З підвищенням концентрації нітрату нікелю в проростаючому насінні кукурудзи відбувалося поступове зменшення вмісту поліпептиду з M_r 11 кД. Активний синтез низькомолекулярних компонентів за дії нітрату нікелю можна розглядати як специфічну реакцію на стрес [2].

З продовженням стресового навантаження (96 год експозиції на нітраті нікелю) електрофоретичний аналіз виявив відмінності у білкових спектрах проростаючого насіння кукурудзи (див. таблицю). Так, виявлено п'ять компонентів з M_r 11–37 кД. У всіх варіантах повністю зникали білки з M_r 54 та 60 кД. За дії 0,05 мМ $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ збільшувався вміст білків 14 та 11 кД. Вплив 0,5 мМ нітрату нікелю характеризувався появою низькомолекулярного поліпептиду 29 кД, значним підвищенням вмісту компонентів 27 та 11 кД. Вміст інших поліпептидів даного зразка знижувався щодо контролю. Найбільш виразною була реакція проростків кукурудзи на вплив $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ у концентрації 1 мМ, для яких встановлено сім поліпептидних компонентів із молекулярною масою від 11 до 37 кД. Зареєстровано появу білків з M_r 29 та 19 кД і значне підвищення вмісту низькомолекулярних компонентів 27 та 11 кД. Встановлено інгібування накопичення поліпептидів з M_r 37, 22 і 14 кД. Вплив $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ у концентрації 5 мМ полягав у накопиченні низькомолекулярних білків 27 та 11 кД поряд зі зменшенням частки білків з M_r 37, 22 та 14 кД. Отримані дані можуть свідчити, що крім зменшення загальної інтенсивності білкового синтезу, відбувається активація новоутворення стресових білків. Диференційна зміна активності генетичного апарату є основним механізмом, який забезпечує реалізацію захисних і адаптаційних реакцій. Адаптаційний синдром включає в себе значне зниження інтенсивності загального білкового синтезу. Це явище може бути не стільки результатом пошкоджень клітини, скільки типовим проявом захисної реакції, а часткове гальмування синтезу білка зменшує інтенсивність деструктивних процесів [1].

В умовах припинення дії хімічного чинника реакція досліджуваних рослин мала стабілізаційний характер, крім варіанта з концентрацією 5 мМ (див. таблицю). У контролі виявлено вісім поліпептидів від 11 до 54 кД. У варіанті з концентрацією нітрату нікелю 0,05 мМ визначено сім поліпептидів. Зареєстровано синтез білків з M_r 54 та 24 кД (цей компонент був відсутній в електрофоретичному спектрі за 96-годинної дії нітрату нікелю). Вміст поліпептидів з M_r 27 та 19 кД мав тенденцію до зростання, а вміст компонентів 54, 37 та 22 кД зменшувався щодо контролю. Вміст поліпептидів з M_r 14 та 11 кД залишався на рівні контролю. Відомо, що у випадках помірного стресу відновлення інтенсивності білкового синтезу спостерігається через деякий час [1]. Можна припустити, що така реакція рослин є відповіддю на помірний стрес, викликаний впливом 0,05 мМ нітрату нікелю.

Кількість електрофоретичних спектрів у варіанті з концентрацією 0,5 мМ $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ зменшилася до шести (див. таблицю). Вміст поліпептиду з M_r 54 кД знижувався як у цьому варіанті, так і в усіх подальших дослідних варіантах. Його синтез після припинення дії іонів нікелю у концентраціях 0,5; 1; 5 мМ не відновлювався. Крім того, встановлено інгібування накопичення поліпептидів з M_r 27 та 24 кД. У той же час вміст компонентів з M_r 22, 14, 11 кД суттєво збільшувався порівняно з контролем. За дії $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ у концентрації 1 мМ електрофоретичні спектри аналогічні попередньому зразку. Зареєстровано підвищення вмісту поліпептидів з M_r 24, 22, 14, 11 кД. У той же час вміст у компонентів з M_r 27 та 24 кДа суттєво зменшувався.

Зміни вмісту білкових компонентів проростаючого насіння кукурудзи
Оржиця 237 МВ за дії нітрату нікелю

Rf	M_r , кД	Вміст білка, %				
		Концентрація $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, мМ				
		Контроль	0,05	0,5	1	5
24 год експозиції						
0,06	60	1,46±0,01	1,17±0,01	2,22±0,01	–	–
0,10	54	1,77±0,01	–	1,92±0,01	–	1,95±0,01
0,25	37	32,58±0,27	36,86±0,31	17,53±0,21	8,9±0,04	5,92±0,04
0,34	29	12,52±0,12	12,79±0,11	18,20±0,12	16,15±0,13	18,02±0,15
0,46	22	8,44±0,08	9,90±0,07	12,93±0,13	18,49±0,41	12,45±0,08
0,51	19	28,32±0,21	28,72±0,33	26,18±0,21	39,78±0,32	26,36±0,23
0,66	14	12,15±0,06	7,83±0,04	18,29±0,11	14,23±0,13	33,15±0,38
0,74	11	2,76±0,03	2,73±0,01	2,73±0,02	2,44±0,01	2,15±0,02
96 год експозиції						
Rf	M_r , кД					
0,25	37	51,36±0,61	25,26±0,31	39,74±0,33	26,13±0,24	50,03±0,48
0,34	29	–	–	3,36±0,04	3,33±0,05	–
0,39	27	4,76±0,04	4,62±0,05	9,30±0,08	11,20±0,09	8,29±0,07
0,46	22	3,81±0,03	2,18±0,01	–	2,99±0,03	3,19±0,02
0,51	19	–	–	–	20,76±0,21	–
0,66	14	34,54±0,23	50,86±0,46	24,06±0,21	17,23±0,18	30,40±0,21
0,74	11	5,53±0,04	17,08±0,11	23,54±0,17	18,36±0,15	8,09±0,07
120 год після припинення дії нітрату нікелю						
Rf	M_r , кД					
0,10	54	1,79±0,02	1,27±0,01	–	–	–
0,25	37	51,72±0,46	37,08±0,31	55,21±0,51	32,13±0,28	15,83±0,12
0,39	27	10,08±0,05	22,07±0,11	1,79±0,01	1,43±0,01	–
0,42	24	2,07±0,01	–	1,10±0,01	2,27±0,01	–
0,46	22	3,24±0,01	1,48±0,01	4,53±0,02	6,36±0,03	–
0,51	19	3,85±0,02	10,95±0,08	–	–	–
0,66	14	19,17±0,17	19,08±0,14	23,11±0,18	27,91±0,21	–
0,74	11	8,08±0,04	8,07±0,03	14,26±0,09	29,90±0,25	84,17±1,82

Найбільш негативний вплив важкого металу на поліпептидний склад білків зафіксовано за дії $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ у концентрації 5 мМ. Через 120 год після припинення дії нітрату нікелю кількість білкових компонентів знизилася до двох проти восьми у контролі з M_r 37 та 11 кД.

Відомо, що реакція рослин на екстремальні умови супроводжується синтезом низькомолекулярних стресових білків (10–39 кД) [2]. У наших дослідженнях у проростаючому

насінні впродовж усього періоду спостереження були наявними низькомолекулярні поліпептиди з M_r 37, 22, 14, та 11 кД, вміст яких суттєво варіював залежно від концентрації нітрату нікелю і терміну проростання. Синтез низькомолекулярних стресових білків асоціюється з розвитком стійкості до дії стресу [2]. Проте можна припустити, що функції цих білків пов'язані не лише з участю у стресових реакціях, оскільки у досліджуваних нами рослинах низькомолекулярні білки були присутні в електрофоретичному спектрі як за дії стресу, так і в контролі.

Показано, що дві білкові зони, а саме, 19 та 22 кД, які належать до запасних білків насіння проламінового типу, за 24-годинної експозиції не тільки не гідролізувались, а навпаки, виявили тенденцію до ресинтезу за дії важкого металу, особливо за його концентрації 1 мМ. Ці компоненти зареєстровано у рослин і на 96-ту год експозиції. Після припинення стресової дії наявність обох поліпептидів відзначали у варіанті з концентрацією нітрату нікелю 0,05 мМ.

Таким чином, встановлено, що за дії нітрату нікелю відбувалися суттєві зміни в якісному та кількісному складі білків кукурудзи на етапі проростання насіння. Найбільш негативний вплив спричинив нітрат нікелю у концентрації 5 мМ. Зміна вмісту низькомолекулярних компонентів з M_r 37, 22, 14 та 11 кД у поліпептидному складі білків упродовж дослідження свідчить про реакцію білкової системи на дію важкого металу, яка має адаптивний характер.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Колупаєв Ю. Є. Стресові реакції рослин: молекулярно-клітинний рівень. Харків: Харків. держ. аграр. ун-т, 2001. 173 с.
2. Косаківська І. В., Голов'яко І. В. Вплив температурних стресів на вміст та електрофоретичний спектр білків різних органів *Phaseolus vulgaris* L. і *Zea mays* L. на ранніх етапах вегетативного розвитку // Вісн. Харків. нац. аграр. ун-ту. Сер. біол. 2007. № 2 (11). С. 58–63.
3. Серегин І. В., Кожєвникова А. Д. Физиологическая роль никеля и его токсическое действие на высшие растения // Физиология растений. 2006. Т. 53. № 2. С. 285–308.
4. Серегин І. В., Кожєвникова А. Д. Распределение кадмия, свинца, никеля и стронция в набухших зерновках кукурузы // Физиология растений. 2005. Т. 52. № 4. С. 635–640.
5. Феник С. И., Трофимьяк Т. Б., Блюм Я. Б. Механизмы формирования устойчивости растений к тяжелым металлам // Успехи современной биологии. 1995. Т. 115. № 3. С. 261–275.
6. Al-Yemeni M. N. Effect of Cadmium, Mercury and Lead on Seed Germination and Early Seedling Growth of *Vigna ambabensis* L. // Indian J. Plant Physiol. 2001. Vol. 6. P. 147–151.
7. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // Anal. Biochem. 1976. P. 248–254.
8. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Natura. 1970. Vol. 227. N 52–59. P. 680.
9. Obroucheva N. V., Bystrova E. I., Ivanov V. B. et al. Root Growth Responses to Lead in Young Maize Seedlings // Plant Soil. 1998. Vol. 200. P. 55–61.

Стаття: надійшла до редакції 30.03.12

доопрацьована 26.06.12

прийнята до друку 27.06.12

**THE INFLUENCE OF NICKEL NITRATE ON POLYPEPTIDE
PROTEIN COMPOSITION OF MAIZE GERMINATING SEEDS**

V. Lashko, A. Vinnichenko

*Biology Research Institute of Oles Honchar Dnipropetrovsk National University
72, Gagarin Ave., Dnipropetrovsk 49010, Ukraine
e-mail: vitalashik@rambler.ru*

The features of changes in the polypeptide mixture of the proteins of *Zea mays* L. seeds under the influence of different nickel nitrate concentrations during the germination. It was established that the effect of heavy metal caused significant changes in the electrophoretic spectrum of the total proteins.

Keywords: *Zea mays* L., nickel nitrate, electrophoretic spectrum, proteins.

**ВЛИЯНИЕ НИТРАТА НИКЕЛЯ НА ПОЛИПЕПТИДНЫЙ СОСТАВ
БЕЛКОВ ПРОРАСТАЮЩЕГО ЗЕРНА КУКУРУЗЫ**

В. Лашко, А. Винниченко

*Научно-исследовательский институт биологии Днепрпетровского
национального университета имени Олеса Гончара
пр. Гагарина, 72, Днепрпетровск 49010, Украина
e-mail: vitalashik@rambler.ru*

Исследованы особенности изменений полипептидного состава белков зерна *Zea mays* L. под действием нитрата никеля различной концентрации на стадии прорастания семян. Установлено, что действие тяжелого металла вызывает существенные изменения в электрофоретическом спектре суммарных белков.

Ключевые слова: *Zea mays* L., нитрат никеля, электрофоретический спектр, белки.