



УДК 582. 32. 575. 17

ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ СПЕКТРІВ КИСЛИХ РОЗЧИННИХ БІЛКІВ ТА АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ МОХІВ ПІД ДІЄЮ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

О. Л. Баїк

*Інститут екології Карпат НАН України, вул. Стефаніка, 11, Львів 79000. Україна
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua*

Аналізували зміни електрофоретичного спектру кислих розчинних білків та множинних молекулярних форм супероксиддисмутази та пероксидази моху *Funaria hygrometrica* Hedw. за дії різних концентрацій (1,0–100,0 мкМ) сульфату міді та цинку. Показано, що лише сублетальні концентрації іонів Cu^{2+} та Zn^{2+} спричиняють суттєві кількісні та якісні зміни фракцій кислих розчинних білків та множинних молекулярних форм ферментів. Встановлено істотніший вплив іонів Cu^{2+} на рухливість та експресивність електрофоретичних фракцій, що пояснюється їх вищою токсичністю, порівняно з іонами Zn^{2+} .

Ключові слова: мохи, важкі метали, електрофоретичний спектр кислих розчинних білків та множинних молекулярних форм ферментів, пероксидаза, супероксиддисмутаза.

ВСТУП

У відповідь на надходження важких металів (ВМ) у клітини проходить активація різних систем захисту, направлених на підтримання гомеостазу рослинного організму. До них, зокрема, належать активація ферментів каталази, пероксидази та супероксиддисмутази, а також синтез метал-зв'язуючих сполук і стресових білків [8]. Більшість з цих механізмів є неспецифічними, характерними для дії різних стрес-факторів. Лише висока спорідненість фітохелатинів до іонів Cd^{2+} , яка визначає їх важливу роль у детоксикації ВМ, а також синтез метал-зв'язуючих сполук є специфічними реакціями на дію ВМ [18]. Утворення фітохелатинів – одна зі складових частин програми відповіді клітини на надходження ВМ у цитоплазму клітини. Первинна структура фітохелатинів визначена для багатьох квіткових рослин. Це невеликі, багаті цистеїном пептиди низької молекулярної маси (8–13 кД), здатні зв'язувати іони ВМ з SH-групами [7, 14]. Досліджено універсальність і можливі функції фітохелатинів у вищих рослин. Вважається, що фітохелатини задіяні в акумуляції, детоксикації та метаболізмі іонів ВМ таких як Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} та ін. в клітинах рослин [14–16, 20]. Однак, дотепер залишається недоведеною участь фітохелатинів у детоксикації ВМ у мохів. Важливу роль у захисті рослинного організму від

токсичного впливу ВМ відіграють ферменти антиоксидантного захисту, такі як пероксидаза та супероксиддисмутаза (СОД). Попередніми дослідженнями було встановлено, що низькі концентрації (1,0–10,0 мкМ) сульфатів міді та цинку несуттєво змінювали активність цих ферментів, тоді як 100,0 мкМ концентрація спричиняла істотне її зростання [3]. За літературними даними різні стресори спричиняють не лише зміни активності антиоксидантних ферментів, а й впливають на ізоферментні спектри [8]. Інформативним у цьому аспекті є також аналіз ізоформ ферментів за дії ВМ. У зв'язку з цим, вивчали зміни електрофоретичних спектрів кислих розчинних білків та ферментів–антиоксидантів у моху *Funaria hygrometrica* Hedw. за дії іонів Cu^{2+} та Zn^{2+} .

МЕТОДИКА ТА МАТЕРІАЛИ

У двомісячних гаметофорів моху *Funaria hygrometrica* Hedw. аналізували електрофоретичний спектр кислих розчинних білків та ферментів антиоксидантного захисту за дії різних концентрацій сульфату міді та цинку. Для аналізу гаметофори обробляли 1,0–100,0 мкМ розчинами CuSO_4 та ZnSO_4 впродовж 36 год і короткочасно промивали дистильованою водою, після чого електрофоретично аналізували спектри кислих розчинних білків та множинних молекулярних форм пероксидази та СОД.

Для електрофоретичного аналізу рослини розтирали в охолоджену до 4°C трис-гліциновому буфері (рН 8,3), додаючи захисні агенти (100 мг трилону Б, 400 мг аскорбінової кислоти на 8 мл буфера та 0,06 мл меркаптоетанолу; співвідношення рослинного матеріалу до буфера 1:1). Одержаний гомогенат центрифугували при 3 тис. об/хв. До супернатанту додавали 70%-ний розчин сахарози з розрахунку 0,2 мл розчину сахарози на 1 мл екстракту [19]. На поверхню гелю в електрофоретичних стовпчиках наносили витяжки об'ємом до 0,25 мл, які містили 50–250 мкг білка. Вміст білка визначали за методом О. А. Лоурі [17]. Для виявлення пероксидаз застосовували інкубаційне середовище з бензидином [5], а СОД ідентифікували за методикою Р. Т. Шора і Е. В. Баура [4].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Численні дослідження свідчать, що збільшення вмісту активних форм кисню (оксидний стрес) відбувається в несприятливих для рослин умовах, зокрема, забруднення важкими металами. Рослинам властива система захисту від оксидного стресу, яка включає в себе ферменти, що беруть участь у детоксикації активних форм кисню (АФК). Процес утворення АФК (синглетного кисню, супероксид-радикалу, гідроксил-радикалу і H_2O_2), який називають "окислювальним вибухом" є однією із ранніх відповідей на стресовий вплив. Найважливішими високомолекулярними антиоксидантами рослин, які безпосередньо знешкоджують АФК є СОД та пероксидаза. Ферменти – антиоксиданти забезпечують комплексний захист біополімерів від АФК, вони розміщені в різних клітинних компартментах і мають різну субстратну специфічність і спорідненість до АФК [9].

Аналіз електрофоретичних спектрів кислих розчинних білків у гаметофорах моху *F. hygrometrica* за дії різних концентрацій сульфату міді у поживному середовищі показав посилення інтенсивності фракцій з ММ 45–66 кД. Крім цього, з'явилася фракція з ММ 35 кД, яка відсутня у контролі, а також посилилась експресивність фракції з ММ 29 кД (рис. 1).

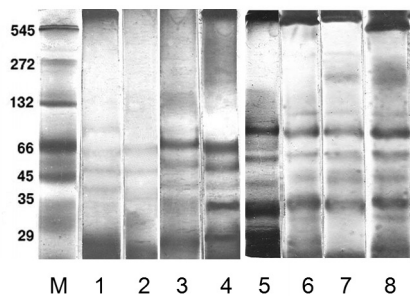


Рис. 1. Електрофоретичний спектр кислих розчинних білків моху *Funaria hygrometrica* за дії різних концентрацій сульфату міді (1–4) та цинку (5–8): М – маркер; 1, 5 – контроль; 2–4 (1,0–100,0 мкМ) Cu^{2+} ; 6–8 (1,0–100,0 мкМ) Zn^{2+}

Fig. 1. Electrophoretical spectrum of acid soluble proteins in the moss *Funaria hygrometrica* under action of copper sulfate (1–4) and zinc sulfate (5–8) of different concentrations: M – marker; 1, 5 – control; 2–4 (1,0–100,0 μM) Cu^{2+} ; 6–8 (1,0–100,0 μM) Zn^{2+}

Дещо інша картина спостерігалася за дії сульфату цинку. Так, підвищення концентрації металу у поживному середовищі спричиняло лише зміни в експресивності та рухливості електрофоретичних фракцій кислих розчинних білків з ММ 70 та 272 кД (рис. 1). Такий характер змін електрофоретичних спектрів кислих розчинних білків за дії іонів Cu^{2+} та Zn^{2+} можна пояснити різною токсичністю цих ВМ щодо мохової рослини.

Є літературні дані, що за наявності у середовищі мікрокількостей Cu^{2+} , Zn^{2+} та Co^{8+} фітохелатини не відіграють помітної ролі в гомеостазі рослинного організму [16]. Як показали проведені дослідження, низькі концентрації сульфатів міді та цинку несуттєво впливали на рухливість та експресивність електрофоретичних фракцій. Зміни у низькомолекулярному діапазоні електрофоретичних спектрів кислих розчинних білків за дії 100,0 мкМ концентрацій Cu^{2+} та Zn^{2+} можуть свідчити про ймовірну приналежність цих фракцій до фітохелатинів.

Відома участь деяких ферментів окислювального метаболізму в адаптації до стресів [2]. Важливою є роль саме пероксидазної системи у біохімічній адаптації рослин. Одним із методів, що дає змогу виявити змінені форми навіть за відсутності видимих морфологічних змін, є вивчення молекулярно-генетичного поліморфізму ферментів. Кількісні та якісні зміни їхньої активності й ізоферментного спектра пов'язують з адаптаційними властивостями рослинних організмів. На відміну від багатьох інших ферментів, пероксидаза характеризується поліфункціональністю і високою гетерогенністю своєї ізоферментної системи. Встановлено, що пероксидаза є індукцибельним ферментом, індуктором якого можуть бути різноманітні фізичні, біологічні та хімічні фактори, в тому числі іони ВМ. Пероксидаза реагує на впливи різноманітних чинників або зміною набору своїх ізоензимів, або підвищенням активності вже існуючих компонентів [1]. Метод виявлення пероксидаз на електрофореграмах ґрунтується на їх специфічній хімічній активності. Зміна інтенсивності забарвлення окремих електрофоретичних смуг спектру пов'язана зі зміною пероксидазної активності компонентів, які їх утворюють.

Аналіз змін спектрів множинних молекулярних форм пероксидази у *F. hygrometrica* за 36-годинної дії іонів Cu^{2+} і Zn^{2+} показав суттєві відмінності щодо їх впливу. Так, вже за дії 10,0 мкМ сульфату міді посилилася фракція з 45 кД, а сублетальна концентрація – зумовила появу нових фракцій з ММ 35 кД, та високомолекулярних з ММ 272–320 кД (рис. 2).

Дія іонів цинку на спектр множинних молекулярних форм пероксидази у *F. hygrometrica* дещо слабша. Лише 10,0–100,0 мкМ концентрації сульфату цинку спричинили посилення експресивності низькомолекулярної фракції з ММ 66 кД, а також появу фракцій у діапазоні ММ 29–35 кД (рис. 2).

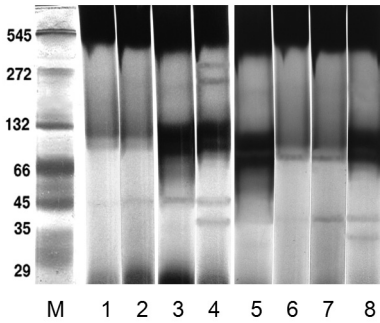


Рис. 2. Електрофоретичний спектр пероксидази моху *Funaria hygrometrica* за дії різних концентрацій сульфату міді (2-4) та цинку (6-8): М – маркер; 1, 5 – контроль; 2-4 (1,0–100,0 мкМ) Cu^{2+} ; 6-8 (1,0–100,0 мкМ) Zn^{2+}

Fig. 2. Electrophoretic spectrum of peroxidase in the moss *Funaria hygrometrica* under action of copper sulfate (1-4) and zinc sulfate (5-8) of different concentrations: M – marker; 1, 5 – control; 2-4 (1,0–100,0 μM) Cu^{2+} ; 6-8 (1,0–100,0 μM) Zn^{2+}

ВМ спричиняють у рослин відповідні зміни у захисній антиоксидантній системі, важливим компонентом якої є СОД. Антиоксиданти виконують сигнальні функції передачі інформації про стан рослини та забезпечують його потенційну здатність до захисту від стресових впливів. Відомо, що СОД інактивує супероксидні радикал-аніони. Є літературні дані [6, 8–11], що активність СОД у рослин підвищувалась із збільшенням вмісту міді у поживному середовищі. У зв'язку з цим досліджували вплив різних концентрацій сульфату міді та цинку на ізоферментний склад СОД у моху *Funaria hygrometrica*. Виявлено, що різні концентрації міді в середовищі зумовлюють значні зміни в балансі між ізоферментами СОД. Так, 1,0 мкМ концентрація Cu^{2+} спричиняє появу фракції з ММ 132 кД. Зростання концентрації іонів металу у 10 разів спричиняє появу фракції СОД з ММ 45 кД, а у 100 разів – ще й 272 та 545 кД (рис. 3).

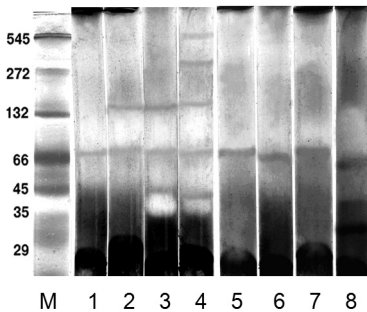


Рис. 3. Електрофоретичний спектр супероксиддисмутазу моху *Funaria hygrometrica* за дії різних концентрацій сульфату міді (2-4) та цинку (6-8): М – маркер; 1, 5 – контроль; 2-4 (1,0–100,0 мкМ) Cu^{2+} ; 6-8 (1,0–100,0 мкМ) Zn^{2+}

Fig. 3. Electrophoretic spectrum of superoxide dismutase in the moss *Funaria hygrometrica* under action of copper sulfate (1-4) and zinc sulfate (5-8) of different concentrations: M – marker; 1, 5 – control; 2-4 (1,0–100,0 μM) Cu^{2+} ; 6-8 (1,0–100,0 μM) Zn^{2+}

Незначні зміни електрофоретичного спектру СОД виявлені у *F. hygrometrica* за дії 1,0–10,0 мкМ сульфату цинку, що пояснюється меншою його токсичністю, порівняно із сульфатом міді. Лише 100,0 мкМ концентрація Zn^{2+} призвела до посилення фракції з ММ 66 кД, а також появи фракцій з ММ 30 та 35 кД (рис. 3).

ВИСНОВОК

Отже, аналіз електрофоретичних спектрів кислих розчинних білків за дії сублетальних концентрацій іонів Cu^{2+} та Zn^{2+} показав здебільшого зміни експресивності фракцій в низькомолекулярному діапазоні. Модифікація ізоферментного складу СОД та пероксидази свідчить про високу активність та чутливість АОС у *F. hygrometrica* до високих концентрацій цих важких металів. Причому, сульфат міді спричиняв істотніші зміни електрофоретичних спектрів кислих розчинних

білків і множинних молекулярних форм ферментів. Як показали наші дослідження, такі зміни значною мірою залежать від сили впливу та стійкості мохової рослини до стресових факторів.

На підставі проведених досліджень можна стверджувати, що підвищення активності СОД та пероксидази [3], а також модифікація ізoferментного спектру є ефективним антиоксидантним механізмом, що гальмує ПОЛ і попереджає патологічні зміни у клітинах моху *F. hygrometrica* в умовах токсичного впливу ВМ.

1. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений. Москва: Наука, 1988: 128 с.
2. Артемьева С.С., Солодилова О.С. Активность и изоферментный состав пероксидазы у C_3 – и C_4 – растений при солевом стрессе В кн.: **Биология – наука XXI века**. IX Международная Пущинская школа – конф. молодых ученых. 18–22 апреля 2005 г. Пущино. Москва, 2005: 125–127.
3. Байк О. Л. Зміни активності ферментів – антиоксидантів мохів за дії міді та цинку. **Біологічні студії (Studia Biologica)**, 2009; 3(3): 83–88.
4. Корочкин Л.И., Серов О.А., Пудовкин А.И. и др. **Генетика изоферментов**. Москва: Наука, 1977: 278 с.
5. **Методы биохимического исследования растений** /Под ред. А. И. Ермакова. 3-е изд., переработанное и дополненное. Ленинград: Агропромиздат, 1987: 325 с.
6. Озолина Г.Р. Клавиня Л., Лапиня П. Супероксиддисмутазная активность у растений в зависимости от уровня обеспеченности их медью. **Физиолого-биохимические исследования растений**. Рига: Знатьне, 1978: 64–75.
7. Пастухова Л.Н. Детоксикация тяжелых металлов у растений. Донецк, 2008: 218-225. – Режим доступа: http://www.nbu.gov.ua/portal/Chem_Biol/peop/2008/218-226.pdf
8. Пиріжок Р.Ю., Волков Р.А., Панчук І.І. Активність пероксидази проростків кукурудзи в умовах теплового стресу. **Физиология и биохимия культурных растений**, 2009; 41(1): 44–49.
9. Рачковская М.М., Ким Л.О. Изменение активности некоторых оксидаз как показатель адаптации растений к условиям промышленного загрязнения. В кн. **Газоустойчивость растений** /Под ред. Николаевского В.С. Новосибирск: Наука, 1980: 117–126.
10. Серегин И.В., Иванов В.Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения. **Физиология растений**, 2001; 48(4): 606–630.
11. Трач В.В., Стороженко В.А. Супероксиддисмутаза как компонент антиоксидантной системы растений при абиотических стрессовых воздействиях. **Физиология и биохимия культурных растений**, 2007; 39(4): 291–302.
12. Foyer C. H., Noctor G. Redox homeostasis and antioxidant signaling. A metabolic interface between stress perception and physiological responses. **Plant Cell**, 2005; 17(5): 1866–1876.
13. Garcia A., Baquedano F.J., Navarro P., Castillo F.J. Oxidative stress induced by copper in sunflower plants. **Free Rad. Res**, 1999; 31: 51–57.
14. Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M.H. Phytochelatins, a class of heavy-metal binding peptides from plants are functionally analogous to metallothioneins. **Proc. Natl. Acad. Sci**, 1987; 84: 439–443.
15. Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M.H. Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. **Science**, 1985; 230: 674–676.
16. Howden R., Goldsbrought P.B., Andersen C.S., Cobbett C.S. Cadmium – sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.**, 1995; 107: 1059–1066.
17. Lowry O. A., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.I. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**, 1951; 193(1): 265–275.
18. Reese R.N., Wagner G.J. Properties of tobacco Cd-binding peptide: unique non metallothionein in Cd-ligands. **Biochem. J**, 1987; 241: 641–647.

19. Taylor I.E.P., Schofield W.B., Elliot A.M. Analysis of moss dehydrogenases by polyacrylamide disc electrophoresis. **Can. J. Bot.**, 1970; 48: 367–369.
20. Tukendorf A., Lyszcz A., Baszynski T. Copper binding proteins in spinach tolerant of excess copper. **J. Plant Physiol.**, 1984; 115: 351–360.

THE ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF SPECTRA OF ACID SOLUBLE PROTEINS AND ANTIOXIDANT ENZYMES OF MOSES UNDER THE INFLUENCE OF HEAVY METALS

O. L. Baik

*Institute of Ecology of the Carpathians, NAS of Ukraine, 11, Stefanik St., Lviv 79000, Ukraine
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua*

The changes of electrophoretic spectra of acid soluble proteins and multiple molecular forms of superoxide dismutase and peroxidase have been analysed in the moss *Funaria hygrometrica* Hedw. grown in media with different concentrations of copper sulfate and zinc sulfate from 1,0 to 100,0 μM . It was shown that only sublethal concentrations of Cu^{2+} and Zn^{2+} caused considerable quantitative and qualitative changes of the fractions of the acid soluble proteins and multiple molecular forms of the enzymes. It was established that the influence of Cu^{2+} ions on the electrophoretic mobility and expressivity was higher than that of Zn^{2+} ions. It can be explained through higher toxicity of the former than that of latter.

Key words: mosses, heavy metals, the electrophoretic analysis of spectra of acid soluble proteins and multiple molecular forms of enzymes, superoxide dismutase, peroxidase.

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СПЕКТРОВ КИСЛЫХ РАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ И АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ МХОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

O. Л. Баїк

*Институт экологии Карпат НАН Украины, ул. Стефаника, 11, Львов 79000, Украина
e-mail: morphogenesis@mail.lviv.ua*

Анализировали изменения электрофоретического спектра кислых растворимых белков и множественных молекулярных форм супероксиддисмутазы и пероксидазы мха *Funaria hygrometrica* Hedw. под действием различных концентраций (1,0–100,0 мкМ) сульфата меди и цинка. Показано, что только сублетальные концентрации ионов Cu^{2+} и Zn^{2+} вызывают существенные количественные и качественные изменения фракций кислых растворимых белков и множественных молекулярных форм ферментов. Установлено более существенное влияние ионов Cu^{2+} на подвижность и экспрессивность электрофоретических фракций, что объясняется их высшей токсичностью по сравнению с ионами Zn^{2+} .

Ключевые слова: мхи, тяжелые металлы, электрофоретический спектр кислых растворимых белков и множественных молекулярных форм ферментов, пероксидаза, супероксиддисмутаз.

Одержано: 29.03.2010