

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего образования

«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ

Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

Работа выполнена на базе Учебно-научного центра

физико-химической биологии СГУ и ИБФРМ РАН

Оксидазная активность растительных пероксидаз

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

направления 06.03.01 «Биология»

Биологического факультета

Щербаковой Елизаветы Вадимовны.

Научный руководитель:

Доцент кафедры биохимии и

биофизики, к.б.н.



30.05.22
(подпись, дата) А.А.Галицкая

Научный консультант:

к.б.н., с.н.с. лаборатории экологической

биотехнологии ИБФРМ РАН



30.05.22
(подпись, дата) Е.В.Дубровская

Зав. кафедрой биохимии

и биофизики, д.б.н., профессор



30.05.22
(подпись, дата) С.А.Коннова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Растения являются уникальными открытыми системами, которые выживают даже в самых неблагоприятных условиях окружающей среды. Живые клетки растений содержат активные по отношению к токсикантам ферменты – пероксидазы. В силу своей универсальности и распространённости растительные пероксидазы обладают потенциалом в биотехнологической сфере, а именно в ремедиации почв и водоёмов, пострадавших от загрязнения промышленными и бытовыми отходами. Роль растительных пероксидаз в ремедиации велика, так как, будучи компонентами антиоксидантной системы организма, они разрушают основные загрязнители почв и водоёмов – полициклические ароматические углеводороды (ПАУ).

Особый интерес представляет оксидазная активность растительных пероксидаз, которая запускает реакции пероксидазного пути, а также расширяет спектр разрушаемых ферментом токсикантов. Однако к наиболее изученным пероксидазам относятся грибные, кристаллические структуры которых позволили предположить строение активного центра пероксидаз и механизм гетеролитического расщепления перекиси водорода в нём. Растительные пероксидазы изучены в меньшей степени и в силу недостатка данных о механизме и реакциях оксидазного пути, а также растениях с оксидазной активностью, тема актуальна и по сей день.

Цель и задачи исследования. Цель работы заключалась в выделении и очистке катионной изоформы пероксидаз сорго веничного и ее дальнейшей характеристике. Для реализации поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- 1) получить очищенный ферментный препарат из проростков сорго веничного;
- 2) сравнить пероксидазную и оксидазную активности полученного ферментного препарата по отношению к трем субстратам при различных значениях pH;

3) оценить кинетические показатели ферментного препарата, а также определить его удельную активность.

Структура бакалаврской работы. Работа состоит из списка сокращений, введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Литературный обзор написан с использованием 122 источников, в нем рассмотрены следующие вопросы: общая характеристика пероксидаз растений, строение пероксидаз растений, функции пероксидаз растений, условия окисления субстратов пероксидазами растений; субстраты, окисляемые пероксидазами растений; окисление субстратов пероксидазами растений в присутствии H_2O_2 ; окисление субстратов пероксидазами растений в присутствии O_2 ; растения, для которых известны реакции окисления субстратов пероксидазами в присутствии O_2 .

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлись 3-суточные этиолированные проростки сорго веничного (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), выращенные в условиях лабораторного эксперимента. Семена сорго сорта Капитал были предоставлены ФГБНУ «Российский научно-исследовательский и проектно-технологический институт сорго и кукурузы».

Далее в разделе описаны основные методы, использованные в работе: стерилизация семян, экстракция, высаливание, диализ, анионообменная хроматография, гель-фильтрация, концентрирование, электрофорез, спектрофотометрическое определение активности, определение концентрации белка методом Брэдфорда, определение оптимального значения pH при перекисном и оксидазном окислении субстратов с помощью буферных растворов по Макилвейну, определение сродства фермента к субстрату при перекисном и оксидазном окислении с помощью растворов с концентрацией 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) аммония от 0,01 до 0,5 мкмоль/мл.

Результаты и обсуждение. Стерилизация семян смесью 38% перекиси водорода и 96% этилового спирта в течение 15 минут не обеспечила получение

стерильных проростков. По этой причине был выбран другой метод стерилизации, а именно метод с использованием гипохлорита натрия в течение 30 минут с последующим проращиванием при тех же условиях.

По истечении 3 суток из проростков получили экстракт, который затем высаливали и диализировали. Активность диализата оставалась на достаточно высоком уровне, что позволило провести дальнейшие этапы исследования. После грубой очистки ферментного препарата применяли методы тонкой очистки, а именно анионообменную хроматографию на колонке с сорбентом DEAE-Toyopearl. Однако этот метод не позволил выделить отдельные фракции фермента. По этой причине был использован другой метод тонкой очистки, а именно гель-фильтрация на колонке с сорбентом Sephacryl S-200. Для выявления пиков активности фермента во всех фракциях мерили пероксидазную активность по отношению к DMP. Наибольшими ее показателями обладали 12-18 фракции, которые соответствовали объему в 24-36 мл и первому пику пероксидазной активности, а также 24-30 фракции, которые соответствовали объему в 48-60 мл и второму пику пероксидазной активности.

Фракции 14, 16, 19, 24, 28 и 30, которые соответствовали объему в 28, 32, 38, 48, 56 и 60 мл, использовали для идентификации изоформ пероксидаз с помощью нативного гель-электрофореза. Выбранные фракции располагались на разных промежутках графика, что позволило проследить за выходом различных изоформ пероксидаз с течением времени ИОХ. На основании полученной электрофореграммы определяли относительную подвижность белка (**Rf**), которую рассчитывали как соотношение длины пути, пройденного белком, к общей длине пути (от линии старта до линии фронта). Чем меньше значение Rf, то есть чем выше белок на электрофореграмме, тем он менее подвижен. По образованию окрашенного продукта окисления (*o*-дианизидина) были выявлены зоны пероксидазной активности с Rf, равной 0,03 (катионная изоформа пероксидаз); 0,18, 0,21 и 0,42 (минорные изоформы катионных пероксидаз); 0,54 и 0,66 (анионные изоформы пероксидаз).

Анализ данных, полученных с помощью нативного гель-электрофореза, позволяет сделать вывод о том, что:

- первому пику пероксидазной активности (фракции 14 и 16) соответствует выход катионной изоформы пероксидаз, не связавшейся с анионообменным носителем колонки;
- промежуточной между двумя пиками точке (фракция 19) соответствует выход минорных изоформ катионных пероксидаз;
- второму пику пероксидазной активности (фракции 24, 28 и 30) соответствует выход минорных, а также анионных изоформ пероксидаз, связавшихся с анионообменным носителем колонки.

Из взрослых растений сорго веничного выделены и охарактеризованы анионная изоформа и катионная пероксидаза со значением R_f , равным 0,18. Катионная пероксидаза со значением R_f , равным 0,03, выделена впервые и представляет большой интерес для дальнейшего исследования. По этой причине фракции с ней были объединены между собой и сконцентрированы. Методом гель-фильтрации определяли молекулярную массу катионной изоформы, которая составляет 99 000 Да. Данный показатель превышает средние значения молекулярных масс других растительных пероксидаз, которые располагаются в диапазоне от 17 000 до 84 000 Да, однако также описаны случаи получения ферментов с молекулярной массой 95 000 и 98 000 Да, что связано с высокой степенью их гликозилирования. С использованием буферных растворов по Маккилвейну определена способность выделенного фермента окислять в присутствии и отсутствии перекиси водорода три субстрата в диапазоне pH 2,6-7,0. Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о том, что:

- по отношению к аскорбиновой кислоте (ASC) максимальная пероксидазная активность проявляется при pH 4,6 и 7,0, а оксидазная – при pH 4,0 и 6,6;
- по отношению к 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) аммония (ABTS) максимальная пероксидазная активность проявлялась при pH 2,6 и 3,0, а оксидазная при pH 5,6 и 6,0;

– по отношению к 2,6-диметоксифенолу (DMP) максимальная пероксидазная активность проявлялась при pH 4,0-5,0, а оксидазная – при pH 4,0-5,0 и 7,0.

Наибольшими показателями пероксидазной и оксидазной активностей катионная изоформа обладала относительно ASC: 1,351 и 1,193 ΔА/час соответственно, а наименьшими – относительно DMP: 0,454 и 0,027 ΔА/час соответственно. При этом наиболее стабильны активности фермента относительно ABTS, поскольку они сохраняются на достаточно высоком уровне на протяжении практически всего диапазона pH. По этой причине для характеристики кинетики реакций с выделенной изоформой использовали именно этот субстрат.

Концентрация субстрата – один из наиболее важных факторов, определяющих скорость ферментативных реакций. А. Браун и В. Анри выдвинули предположение, что фермент вначале образует комплекс со своим субстратом, а затем этот комплекс распадается с освобождением свободного фермента и продуктов реакции [120], эта основная концепция всех современных представлений о механизме действия ферментов. Теория, основанная на этом представлении, была впервые предложена Л. Михаэлисом и М. Ментен в 1913 году [121]. Основные предпосылки этой теории следующие:

– реакция между ферментом и субстратом находится в состоянии равновесия;

– концентрация свободного субстрата остается практически постоянной в течение начального периода реакции, это условие выполняется, если полная концентрация субстрата значительно больше полной концентрации фермента, как это обычно имеет место при кинетических исследованиях [122].

Эта реакция описывается уравнением Михаэлиса-Ментен:

$$V = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_s + [S]}, \text{ где}$$

V – скорость реакции при данной концентрации субстрата;

V_{\max} – максимальная скорость реакции при полном насыщении фермента субстратом;

K_s – константа диссоциации фермент-субстратного комплекса;

$[S]$ – концентрация свободного субстрата.

Предельное значение гиперболы – V_{max} – характеризует максимальную работоспособность фермента и отображает предел, к которому стремится скорость реакции при бесконечном повышении концентрации субстрата. Величина S , при которой в эксперименте наблюдается скорость, равная половине от максимальной, определена как константа Михаэлиса (K_m). Физический смысл K_m заключается в том, что она представляет собой константу равновесия между реакцией, которая ведет к образованию фермент-субстратного комплекса, и двумя реакциями, приводящими к его распаду. С помощью K_m можно охарактеризовать сродство фермента к определенному субстрату:

– чем меньше K_m , тем больше сродство, поскольку равновесие первого этапа ферментативной реакции сдвинуто вправо – в сторону образования фермент-субстратного комплекса. В таком случае созданы наилучшие условия для протекания второго этапа ферментативного процесса. При таких условиях для достижения эффективного превращения субстрата требуется его малая концентрация, а значит и V_{max} теоретически может быть достигнута при малых количествах субстрата;

– чем больше K_m , тем меньше сродство, поскольку равновесие первого этапа ферментативной реакции сдвинуто влево – в сторону образования свободного фермента и субстрата. В таком случае созданы наименее благоприятные условия для протекания второго этапа ферментативного процесса. При таких условиях для достижения эффективного превращения субстрата требуется его большая концентрация, а значит и V_{max} теоретически может быть достигнута при больших количествах субстрата.

Сродство выделенной катионной пероксидазы к ABTS определяли в диапазоне концентраций субстрата от 0,01 до 0,3 мкмоль/мл. Вначале характеризовали кинетику реакций по оксидазному пути, однако в выбранном диапазоне концентраций скорость окисления ABTS не достигла максимальных показателей и не вышла на плато, поэтому определить значения V_{max} и K_m не

представлялось возможным. По этой причине при дальнейшей характеристике кинетики реакций по пероксидазному пути диапазон концентраций ABTS увеличили до 0,5 мкмоль/мл. В таком случае скорость выходит на плато при концентрации субстрата, равной 0,4 мкмоль/мл, что позволяет определить значения V_{max} и K_m .

Было установлено, что V_{max} равна 0,0115 $\Delta A/\text{мин}$, а K_m – 0,23 мкмоль/мл.

Завершающим этапом характеристики фермента стало определение в полученных образцах концентрации белка по методу Брэдфорда и активности изоформы на мг белка для пероксидазной и оксидазной активностей.

Таким образом, анализ полученных данных позволяет сделать вывод о том, что в расчете на мг белка пероксидазная активность выделенной катионной изоформы превышает оксидазную активность в среднем в 1,45 раз. При этом обе активности после многочисленных этапов выделения и очистки остаются на достаточно высоком уровне, что указывает на эффективность применяемой в исследовании методики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По итогу изучения отечественной и зарубежной литературы было обнаружено наличие у пероксидаз растений способности окислять субстраты по оксидазному пути. Противоречивость информации из этих источников, недостаток данных о структуре и механизмах действия фермента, а также ограниченное число видов растений с одновременным проявлением пероксидазной и оксидазной активностей указывают на малую изученность этой темы.

В ходе исследования пероксидаз проростков сорго веничного (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) был подобран метод поверхностной стерилизации семян, получена ферментная вытяжка, отработаны методы грубой и тонкой очистки ферментного препарата, определены пероксидазная и оксидазная активности на разных этапах очистки, идентифицированы различные изоформы фермента, а

также выделена и охарактеризована гомогенная катионная пероксидаза сорго веничного, не описанная ранее в литературе.

Было обнаружено, что методы грубой очистки фермента хоть и понижают его активность, тем не менее, сохраняют ее на достаточно высоком уровне, что позволяет применять их в дальнейшей практике. Последующие этапы тонкой очистки делают возможным получение гомогенной катионной пероксидазы, зона активности которой обнаруживается при относительной подвижности белка, равной 0,03. По результатам гель-фильтрации найдена ее молекулярная масса, которая составляет 99 000 Да. Анализ полученных с помощью буферных растворов по Макилвейну данных позволяет сделать вывод о том, что фермент обладает наибольшими показателями пероксидазной и оксидазной активностей по отношению к аскорбиновой кислоте, а наименьшими – по отношению к 2,6-диметоксифенолу. При этом наиболее стабильны активности этого фермента по отношению к 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) аммония, поэтому именно этот субстрат был использован для характеристики кинетики реакций, катализируемых катионной пероксидазой. В расчете на мг белка пероксидазная активность выделенного фермента превышает оксидазную активность в среднем в 1,45 раз.

Таким образом, из проростков сорго веничного впервые выделена и охарактеризована катионная пероксидаза с относительной подвижностью белка, равной 0,03, для нее показана способность к окислению ряда субстратов по оксидазному пути. Дальнейшее изучение этого феномена позволит глубже понять механизмы устойчивости сорго в стрессовых условиях и дополнить знания о его фиторемедиационном потенциале.

ВЫВОДЫ

1) Получен электрофоретически гомогенный препарат катионной пероксидазы проростков сорго веничного с зоной активности при относительной подвижности белка, равной 0,03, и молекулярной массой 99 000 Да;

2) Сравнительный анализ полученных в ходе исследования данных позволил сделать вывод о том, что фермент обладает наибольшими показателями пероксидазной и оксидазной активностей по отношению к аскорбиновой кислоте при рН 4,6, 7,0 и 4,0, 6,6 соответственно, а наименьшими – по отношению к 2,6-диметоксифенолу при рН 4,6, 5,0 и 4,0-4,6, 7,0 соответственно;

3) Оценка кинетических показателей ферментного препарата позволила установить, что в реакциях катионной пероксидазы с АВТS по пероксидазному пути V_{max} составляла 0,0115 $\Delta A/\text{мин}$, а K_m – 0,23 мкмоль/мл. Для реакций фермента по оксидазному пути не было получено однозначных результатов, потому они требуют дальнейшего уточнения. При этом была определена удельная активность фермента, пероксидазная активность которого превышает оксидазную активность в среднем в 1,45 раз.

ЕВМ