

УДК 581.19+577

Е.Г. АРТЕМУК¹, Н.Е. ИВАШКОВЕЦ¹, Л.А. КОБРИНЕЦ²

¹ – Брест, БрГУ имени А.С. Пушкина

² – Брест, БрГТУ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ ПРИ ИЗУЧЕНИИ КУРСА «БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ»

Растения и животные могут существовать только в атмосфере, содержащей кислород, который обеспечивает протекание аэробных метаболических процессов в клетках, а также образование в них свободных радикалов и перекисных соединений органической и неорганической природы. При действии неблагоприятных факторов (инфекции, тяжелые металлы, ультрафиолетовое излучение, гербициды и др.) интенсивность этих процессов может возрастать. Однако клетка располагает несколькими специализированными механизмами защиты в составе противooksидлительной системы, включающей низко- и высокомолекулярные антиоксиданты. Важнейшим высокомолекулярным антиоксидантом в живых организмах является фермент пероксидаза, который предотвращает разрушительное действие активных форм кислорода [1]. В настоящее время известно, что этот фермент выполняет две функции: пероксидазную и оксидазную [2]. Выполняя пероксидазную функцию, он катализирует окислительно-восстановительную реакцию в присутствии пероксида водорода посредством высвобождения кислорода: $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}$. Выделяющийся при этой реакции активный кислород способен окислять ряд органических и неорганических веществ.

Наиболее распространенными субстратами, на которые действует пероксидаза в тканях растений, являются полифенолы в свободном состоянии или в форме разнообразных соединений (гликозиды, дубильные вещества) и ароматические амины. Окисление фенолов и ароматических аминов пероксидаза осуществляет с помощью перекиси водорода или каких-либо органических перекисей, в том числе перекиси ненасыщенных жирных кислот и каротина с образованием, как правило, окрашенных соединений [3].

Большинство методов определения активности пероксидазы сводится к исследованию действия растворенного фермента на субстрат. В лабораторной практике продукты реакции определяют химическим, газометри-

ческим, спектрофотометрическим, потенциометрическим, колориметрическим, флуоресцентным или радиохимическим методами.

В литературе наиболее распространены три методики определения активности этого фермента:

– газометрический метод, основанный на том, что с пероксидом водорода пероксидаза образует комплексное соединение, в результате чего пероксид водорода активируется и приобретает способность действовать в качестве акцептора водорода. Активность пероксидазы определяется по скорости выделения кислорода [4];

– колориметрический метод определения активности пероксидазы по А.М. Бояркину основан на определении скорости реакции окисления бензидина до образования синего продукта окисления определённой концентрации, устанавливаемой на фотоэлектроколориметре [5];

– спектрофотометрический метод определения активности пероксидазы основан на измерении оптической плотности продуктов реакции, образовавшихся при окислении гваякола за определённый промежуток времени [4].

Так как основными аналитическими приборами в биохимических лабораториях высших учебных заведений остаются фотоэлектроколориметры и спектрофотометры, то наибольшее распространение получил колориметрический метод определения активности пероксидазы по А.М. Бояркину. Этот метод обладает лучшей воспроизводимостью и является более чувствительным. В связи с этим, метод нашел широкое применение на лабораторных занятиях в курсе «Биохимия растений» при изучении темы «Особенности действия растительных ферментов». При исследовании активности пероксидазы по методу А.М. Бояркина студентами использовались проростки сельскохозяйственных культур, подвергнутых воздействию токсических концентраций ионов свинца.

Для определения активности пероксидазы навеску проростков (до 500 мг) гомогенизировали в ацетатном буфере ($\text{pH} = 4,7$) и переносили в мерную колбу на 50 мл. После 10 минут настаивания с периодическим помешиванием, в результате чего пероксидаза переходила в раствор, вытяжку центрифугировали при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость использовали в качестве ферментного препарата. В кювету шириной 2 см помещали реакционную смесь, состоящую из одинаковых объемов ферментного раствора, раствора бензидина в ацетатном буфере и воды. Измерения проводили на фотоэлектроколориметре «КФК-2» (Россия) при красном светофильтре. После установления стрелки гальванометра на нуле в опытную кювету наливали такой же объем 3%-й перекиси водорода. Сразу же после начала приливания перекиси водорода включали секундомер. При этом под действием пероксидазы происходит реакция окисления бензидина с образованием соединения синего цвета. Когда стрелка гальва-

нометра достигала отметки $E = 0,125$ или $0,250$, секундомер останавливали. Активность пероксидазы вычисляли по скорости реакции в условных единицах и выражали на 1 г растительного материала:

$$A = \frac{E \times a \times b}{m \times c \times t}$$

где A – активность фермента на 1 г навески (в у.е.);

E – экстинкция (0,125 или 0,250);

a – объем вытяжки (50 мл);

b – степень разведения вытяжки в реакционной смеси (в кювете);

m – навеска растительного материала (г);

c – толщина жидкости в кювете (2 см);

t – время (с).

Активность пероксидазы определяли в проростках пшеницы яровой сорта «Дарья» и ячменя ярового сорта «Атаман», подвергнутых воздействию ионов свинца в концентрациях 10^{-5} – 10^{-3} М.

Результаты исследований показали, что ионы свинца в концентрациях 10^{-5} – 10^{-3} М приводили к увеличению активности пероксидазы в корешках пшеницы яровой на 3,6–89,3% (7-е сутки), 7,1–25,0% (10-е сутки) и 2,9–29,4% (14-е сутки) по сравнению с контрольными растениями (таблица 1). Увеличение активности пероксидазы наблюдалось и в побегах растений пшеницы яровой.

Таблица 1 – Активность пероксидазы в проростках пшеницы яровой при воздействии ионов свинца

Концентрация свинца	Активность пероксидазы, у.е./г сырой массы					
	Корни			Побеги		
	7-е сутки	10-е сутки	14-е сутки	7-е сутки	10-е сутки	14-е сутки
контроль	2,8±0,25	2,8±0,09	3,4±0,20	1,2±0,08	1,9±0,06	2,2±0,03
10^{-5} М	2,9±0,18	3,0±0,08	4,4±0,14	1,6±0,03	2,2±0,26	3,0±0,27
10^{-4} М	2,9±0,14	2,8±0,08	3,8±0,05	2,3±0,02	2,2±0,03	2,6±0,01
10^{-3} М	5,3±0,23	3,5±0,04	3,5±0,20	2,0±0,05	2,7±0,02	3,5±0,31

В проростках ячменя ярового высокая концентрация ионов свинца 10^{-3} М также приводила к увеличению активности пероксидазы в корнях и побегах. Так ее активность в корнях ячменя ярового возрастала на 37,4% (7-е сутки), 58,0% (10-е сутки) и 32,4% (14-е сутки) по сравнению с контрольными растениями (таблица 2).

Таблица 2 – Активность пероксидазы в проростках ячменя ярового при воздействии ионов свинца

Концентрация свинца	Активность пероксидазы, у.е./ г сырой массы					
	Корни			Побеги		
	7-е сутки	10-е сутки	14-е сутки	7-е сутки	10-е сутки	14-е сутки
контроль	1,1±0,06	1,0±0,09	0,7±0,03	1,2±0,03	2,9±0,22	2,9±0,21
10 ⁻⁵ М	1,2±0,08	1,0±0,01	0,8±0,02	1,0±0,11	2,7±0,19	2,2±0,06
10 ⁻⁴ М	1,5±0,05	1,2±0,21	0,9±0,02	1,0±0,12	2,7±0,05	2,9±0,08
10 ⁻³ М	1,5±0,04	1,6±0,12	0,9±0,03	1,3±0,11	3,4±0,18	3,3±0,19

Таким образом, с увеличением концентрации ионов свинца в среде прорастания усиливается активность пероксидазы в растениях сельскохозяйственных культур. Следовательно, высокая активность пероксидазы является одним из важнейших механизмов, защищающих растения от окислительных повреждений, вызываемых высокими концентрациями ионов свинца.

Использование научно-исследовательских работ при изучении курса «Биохимия растений» дает возможность студентам познакомиться с методами биохимических исследований, научиться интерпретировать полученные результаты, закрепить знания, полученные в лекционном курсе, активизировать самостоятельную работу, развить творческий подход в исследовательской деятельности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рогожин, В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов / В.В. Рогожин. – СПб. : ГИОРД, 2004. – 240 с.
2. Воскресенская, О.Л. Большой практикум по биоэкологии : учеб. пособие / О.Л. Воскресенская ; Мар. гос. ун-т. – Йошкар-Ола, 2006. – Ч. 1. – 107 с.
3. Henriksen, A. Structure of soybean seed coat peroxidase: A plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions / A. Henriksen [et al.] // Protein Science. – 2001. – Vol. 10. – P. 108–115.
4. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков [и др.]. – Л. : Агрпромиздат, 1987. – С.41–43.
5. Гавриленко, Л.Е. Большой практикум по физиологии растений / Л.Е. Гавриленко, Л.М. Хандобина. – Минск : Высшая школа, 1975. – С. 207–209.