

УДК 577.151.4:58.08

МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ КАТАЛАЗНОЇ АКТИВНОСТІ У РОСЛИННОМУ МАТЕРІАЛІ

І.М. ДОЛБА, Р.А. ВОЛКОВ, І.І. ПАНЧУК

*Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
58012 Чернівці, вул. Коцюбинського, 2*

Фермент каталаза знайдений у всіх групах еукаріотичних організмів. Він локалізований в пероксисомах і цитозолі, відіграє головну роль у регулюванні внутрішньоклітинного вмісту пероксиду водню. Відомо кілька методик визначення активності каталази, однак всі вони розроблені для тваринних об'єктів і не можуть бути застосовані для рослин без відповідних уточнень. Запропоновано нову модифікацію методики вимірювання активності каталази, що ґрунтується на утворенні комплексу між пероксидом водню та молібдатом амонію. Протестовано різні умови інкубації проб. Обговорено переваги й обмеження різних методик визначення каталазної активності.

Ключові слова: *Nicotiana tabacum* L., каталаза, пероксид водню.

У рослинних клітинах у процесі метаболізму утворюються активні форми кисню (АФК), рівень яких залежить від багатьох чинників, наприклад від стадії онтогенезу чи впливу стресорів [7]. Однією з АФК і водночас сигнальною молекулою, що активує процеси антиоксидантного захисту рослинної клітини є пероксид водню (H_2O_2). Концентрація H_2O_2 змінюється в ході розвитку рослини та у відповідь на дію різних стресових чинників біотичної й абіотичної природи. Внутрішньоклітинний вміст H_2O_2 регулюють антиоксидантні ферменти, такі як каталаза, пероксидази [2, 6].

Каталаза (КФ 1.11.1.6) — фермент класу оксидоредуктаз, виявлений майже у всіх еукаріотичних організмів, у рослинних клітинах локалізована в пероксисомах і цитозолі. За нормальних фізіологічних умов вона регулює вміст пероксиду водню в організмі, запобігає його токсичній дії, відіграє важливу роль у процесі старіння рослин [8, 9].

На відміну від пероксидаз, які потребують різноманітних субстратів (поліфенольні сполуки, аскорбат) для відновлення H_2O_2 до води, каталази як субстрат використовують дві молекули H_2O_2 і каталізують їх перетворення на воду й молекулу кисню. Активність каталази можна визначити, вимірявши зміну концентрації H_2O_2 або кількість утвореного кисню. Останній метод широко застосовували раніше, проте він громіздкий, неточний і потребує порівняно великої кількості експериментального матеріалу. Як альтернативні запропоновано методи визначення активності каталази, що ґрунтуються на вимірюванні концентрації H_2O_2 в реакційній суміші [1, 4]. Один із них передбачає спектрофотометричне вимірювання оптичної густини проби за 240 нм, що відповідає максимуму поглинання молекули H_2O_2 . Інший метод базується на здатності

пероксида водню утворювати з аніоном молібдату стійкий комплекс жовтого кольору, інтенсивність якого вимірюють спектрофотометрично за 410 нм.

Обидва ці методи розроблені для тваринних об'єктів, їх використання для рослин може бути ускладнене наявністю в клітинному екстракті специфічних для рослин речовин (пігментів, поліфенолів, полі- та олігосахаридів тощо), здатних поглинати світло за 240 чи 410 нм або неферментативно взаємодіяти з H_2O_2 . Крім того, властивості ферментів рослинного і тваринного походження (температурний оптимум, стабільність тощо) можуть відрізнятися, що потрібно враховувати при вимірюванні їх активності.

Метою роботи є оптимізація методу визначення активності каталази для рослинних об'єктів з використанням молібдату амонію.

Методика

Досліджували рослини тютюну *Nicotiana tabacum* L. на стадії 4—6 листків. Рослини вирощували за сталої температури 25 °С та 16-годинного освітлення.

Для приготування клітинного екстракту 100 мг замороженого рослинного матеріалу гомогенізували у фарфоровій ступці з рідким азотом, додавали 200 мкл екстракційного буферу, що містив 0,1 М *трис*-HCl (рН 6,8), 20 %-й гліцерин, 30 мМ дитіотрейтол, 0,1 %-й нерозчинний полівінілполіпіролідон (ПВП). Суміш 5 хв інкубували на льоду й центрифугували за +4 °С, 15 000 g протягом 15 хв. Надосадову рідину переносили в чисту мікропробірку і центрифугували ще раз протягом 5 хв. Отриманий білковий екстракт використовували для визначення активності ферменту.

Каталазну активність розраховували порівнянням вмісту пероксида водню у пробі на початку реакції та після її припинення. Для цього готували дві проби — нульову і дослідну. 100 мкл білкового екстракту додавали до 1,9 мл реакційного буферу, що містив 0,2 М *трис*-HCl (рН 6,8) і 70 мМ H_2O_2 . Суміш швидко перемішували, відбирали 1 мл і відразу ж додавали до 0,5 мл 4 %-го розчину молібдату амонію для припинення реакції (нульова точка). Решту реакційної суміші інкубували протягом 1 хв за температури 25 °С, після чого зупиняли реакцію додаванням 0,5 мл 4 %-го розчину молібдату амонію. Залежно від завдання експерименту в окремих випадках температура і час інкубації були іншими (див. нижче).

Інтенсивність жовтого забарвлення, зумовленого утворенням комплексів молібдату амонію з пероксидом водню, вимірювали спектрофотометрично за довжини хвилі 410 нм на Photometer 1101 M («Eppendorf Geraetebaue», Німеччина). Вміст пероксида водню у пробі знаходили за калібрувальним графіком. Концентрацію білка в екстракті визначали спектрофотометрично за методом Бредфорда [5].

Активність ферменту (E) обчислювали за формулою

$$E = (HP_0 - HP_1)/(T \cdot P),$$

де HP_0 — вміст пероксида водню в нульовій пробі у початковий момент часу, мкмоль; HP_1 — вміст пероксида водню в дослідній пробі після закінчення інкубації, мкмоль; T — тривалість інкубації, хв; P — вміст білка у пробі, мкг.

Кожен експеримент виконували щонайменше у чотирьох біологічних і трьох аналітичних повторностях. Статистичну вірогідність отриманих даних оцінювали з використанням критерію Стьюдента.

Результати та обговорення

На першому етапі експериментів ми вивчили залежність каталазної активності в екстракті від температури інкубації реакційної суміші в межах 25—70 °С. Для встановлення оптимального часу інкубації активність ферменту визначали через 1, 2, 3, 5 і 10 хв. Згідно з отриманими даними, протягом першої хвилини інкубації існує пряма залежність між активністю каталази і температурою інкубації реакційної суміші в діапазоні 25—50 °С (рис. 1). Під час інкубації реакційної суміші за 50 °С активність каталази була вдвічі вищою, ніж за 25 °С. У процесі інкубації за температури 70 °С протягом 1 хв відбулась повна інактивація ферменту.

За температури 25 °С значення ферментної активності протягом першої і другої хвилин інкубації не відрізнялись, проте за підвищених температур від 31 до 50 °С значення активності каталази на другій хвилині інкубації були значно нижчими, ніж на першій (див. рис. 1). Протягом третьої—п'ятої хвилин інкубації активність каталази порівняно з першою хвилиною зменшувалась навіть за температури 25 °С, а після 5 хв була практично відсутня (рис. 2).

Отримані результати підтвердили, що в каталази немає вираженого температурного оптимуму; фермент нестабільний за наявності H_2O_2 , особливо за підвищеної температури. В оригінальній методиці [1] визначення каталазної активності в гомогенаті печінки реакційну суміш інкубують протягом 10 хв за 37 °С. Однак за отриманими нами даними ці умови непридатні для рослинних об'єктів. Оскільки максимальна стабільність каталази спостерігалась за температури 25 °С (що є оптимальною для росту тютюну й багатьох інших рослин), у подальшому ми проводили інкубацію реакційної суміші саме за такої температури протягом 1 хв.

Відомо, що активність каталази може змінюватись у часі, тому постало запитання, наскільки стабільною є її активність упродовж експерименту, зокрема під час зберігання білкового екстракту за різних температурних умов. Ця інформація важлива для правильного планування експерименту, коли необхідно визначати активність каталази в багатьох пробах паралельно. Для отримання відповіді на це запитання білковий

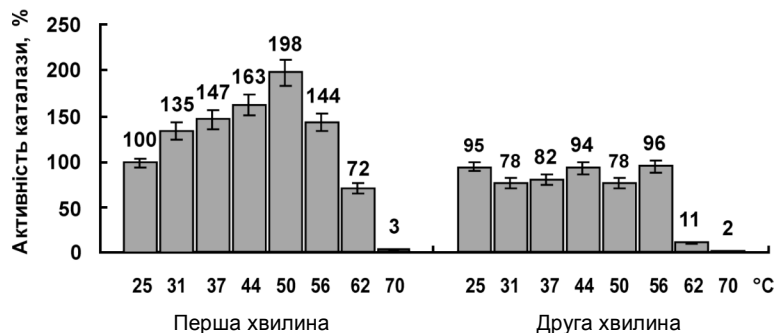


Рис. 1. Зміна відносної активності каталази *Nicotiana tabacum* L. залежно від температури інкубації проби протягом першої і другої хвилин інкубації. За 100 % взято активність каталази у пробі, інкубованій протягом 1 хв за 25 °С

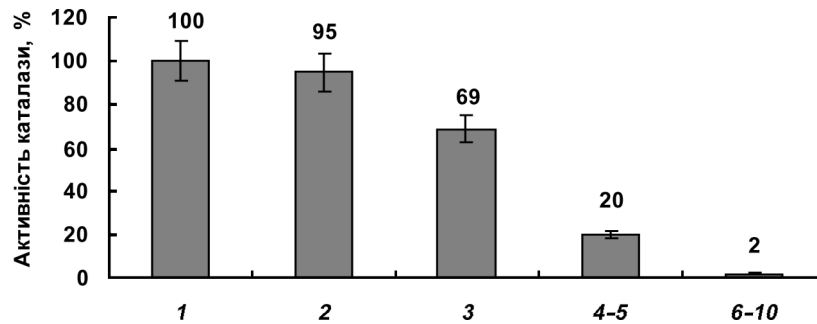


Рис. 2. Зміна відносної активності каталази *Nicotiana tabacum* L. протягом першої (1), другої (2), третьої (3), четвертої—п'ятої (4–5) та шостої—десятої (6–10) хвилин після початку інкубації проби за 25 °С. За 100 % взято активність каталази, визначену протягом першої хвилини

екстракт після приготування певний час зберігали на льоду або за кімнатної температури (20 °С), потім у ньому визначали активність каталази. Згідно з результатами експерименту (рис. 3), активність поступово знижувалась і через 2 год зберігання екстракту становила 87–88 % активності ферменту, виміряної безпосередньо після його отримання. Зниження активності ферменту протягом першої години зберігання екстракту було статистично невірогідним. Доведено також, що температура зберігання не впливала на зниження активності каталази. Отже, щоб отримати коректні результати, каталазну активність потрібно вимірювати протягом першої години після приготування білкового екстракту.

Специфікою рослин є наявність у клітині великої кількості водорозчинних фенольних сполук, здатних взаємодіяти з H_2O_2 з утворенням забарвлених продуктів, що в кінцевому підсумку може спотворювати результати вимірювання вмісту H_2O_2 у пробі. У зв'язку з цим ми ввели до складу екстракційного буферу ПВП, бо ця речовина здатна зв'язувати поліфенольні сполуки. Контрольні експерименти підтвердили, що наявність ПВП в екстракційному буфері поліпшує відтворюваність результатів.

У запропонованій нами методиці активність каталази розраховують за різницею вмісту H_2O_2 у нульовій пробі (тобто безпосередньо після внесення білкового екстракту) та у пробі, інкубованій за 25 °С протягом

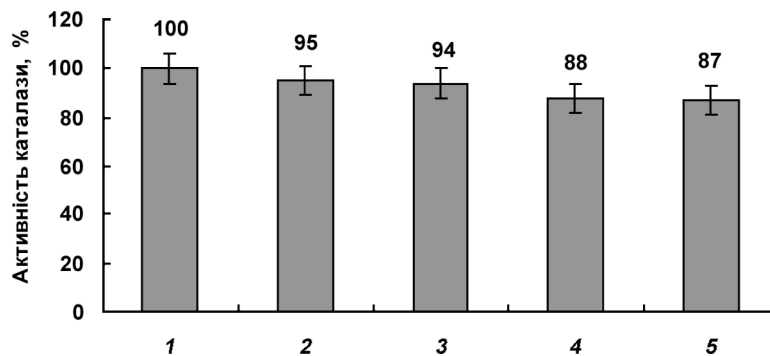


Рис. 3. Зміна відносної активності каталази *Nicotiana tabacum* L. за різних умов і тривалості зберігання білкового екстракту:

1 — свіжовиділений екстракт; 2, 4 — зберігання на льоду відповідно протягом 1 і 2 год; 3, 5 — зберігання за кімнатної температури відповідно протягом 1 і 2 год. За 100 % взято активність каталази, визначену безпосередньо після приготування білкового екстракту

1 хв (див. «Методику»). У праці Королюка [1] вміст H_2O_2 у пробі в нульовий момент часу експериментально не визначали. Натомість вимірювали поглинання за 410 нм у холостій (що містила екстракційний буфер, H_2O_2 , молібдат амонію) та контрольній (що містила білковий екстракт і молібдат амонію) пробах. Після цього показники оптичної густини додавали й отриману суму вважали поглинанням проби у початковий (нульовий) момент часу. Такий метод розрахунку окремо враховує поглинання світла, пов'язане із взаємодією H_2O_2 , молібдату амонію та компонентів екстракційного буферу (холоста проба), і поглинання, що може виникнути внаслідок взаємодії молібдату амонію з метаболітами, які містяться в білковому екстракті (контрольна проба). Слід зазначити, що запропонований метод розрахунку не зовсім коректний, бо при додаванні двох показників оптичного поглинання можливий вплив складових частин буферу на утворення забарвлення враховується двічі. Проте це не принципово, оскільки згідно з нашими експериментами при змішуванні екстракційного буферу з молібдатом амонію забарвлення не виникає. Істотніше те, що в розрахунках, запропонованих Королюком, не враховано можливість вмісту в білковому екстракті метаболітів, які взаємодіють з H_2O_2 , результатом чого може бути зміна поглинання розчину за 410 нм.

Для перевірки такої можливості ми порівняли значення активності каталази, розраховані різними методами, і встановили, що розрахунок за методикою Королюка [1] дає завищені значення активності ферменту. Це пов'язано з тим, що отримані в наших експериментах значення оптичної густини для нульової проби були нижчими, ніж сума відповідних показників контрольної і холостої проб, визначених за методикою Королюка. Цей «ефект неадитивності» означає, що при додаванні білкового екстракту відбувається швидка взаємодія (протягом 8–10 с, що необхідні для змішування проби) його компонентів з H_2O_2 .

Щоб встановити, який характер має цей процес — ферментативний чи неферментативний, ми піддали ферменти термічній інактивації прогріванням екстракту протягом 2 хв за температури 70 °С. Подальші експерименти показали, що «ефект неадитивності» залишався незмінним, що підтвердило його неферментативну природу. Цікаво, що цей ефект був сильним для тютюну і набагато слабкішим для арабідопсису, кукурудзи, гороху.

Крім визначення концентрації H_2O_2 з використанням молібдату амонію широко застосовують метод Ейбі [4], який ґрунтується на вимірюванні поглинання світла з довжиною хвилі 240 нм молекулою H_2O_2 . Його перевагою є менша трудоємність. Проте метод Ейбі має низку обмежень і недоліків, які пов'язані насамперед із тим, що поглинання світла вимірюють у процесі ферментативної реакції, яка відбувається безпосередньо в кюветі спектрофотометра. Отже, оптичну густину кожної проби можна виміряти лише один раз, а зберігати проби принципово неможливо. На противагу цьому в запропонованому нами методі проведення ферментативної реакції й вимірювання оптичної густини проби розділені в часі і просторі. Після додавання молібдату амонію проби є відносно стабільними, що уможливує роботу одночасно з великою кількістю зразків. Крім того, метод Ейбі [4] потребує складнішого й дорожчого обладнання, оскільки вимірювання проводять в УФ-частині спектра. Специфічною проблемою цього методу [4] є утворення в результаті реакції у кюветі спектрофотометра бульбашок O_2 , які викривля-

ють результати вимірювання. Це потребує уваги й чималого досвіду експериментатора.

Отже, оптимальною температурою визначення активності каталази у рослин є 25 °С. Каталаза — відносно стабільний фермент, активність якого за зберігання білкового екстракту протягом 1 год не змінюється. Оптимізований нами метод вимірювання каталазної активності враховує особливості рослинних об'єктів, має низку переваг порівняно з існуючими методами, може бути реалізований на доступному лабораторному обладнанні.

1. *Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е.* Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16—18.
2. *Косаківська І.В.* Фізіолого-біохімічні основи адаптації рослин до стресів. — К.: Вища шк., 2003. — 192 с.
3. *Таран Н.Ю., Оканенко О.А., Бацманова Л.М., Мусієнко М.М.* Вторинний оксидативний стрес як елемент загальної адаптивної відповіді рослин на дію несприятливих факторів довкілля // Физиология и биохимия культ. растений. — 2004. — **36**, № 1. — С. 3—14.
4. *Aebi H.* Catalases in vitro // Methods in Enzymol. — 1984. — **105**. — P. 121—126.
5. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — **72**. — P. 248—254.
6. *Fedoroff N.* Mechanisms in cellular stress responses // Ann. Bot. — 2006. — **98**. — P. 289—300.
7. *Luna C.M., Pastori G.M., Driscoll S. et al.* Drought control on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat // J. Exp. Bot. — 2005. — **56**, N 411. — P. 417—423.
8. *McClung C.R.* Regulation of catalases in *Arabidopsis* // Free Radical Biol. Med. — 1997. — **23**, N 3. — P. 489—496.
9. *Nasrabadi H.* Some biochemical properties of catalase from Kohlrabi // J. Biol. Sci. — 2008. — **8**, N 3. — P. 649—653.
10. *Scandalios J.* Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses // Braz. J. Med. Biol. Res. — 2005. — **38**. — P. 995—1014.
11. *Sofa A., Dichio B., Xiloyannis C., Masia A.* Antioxidant defenses in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes // Functional Plant Biol. — 2005. — **32**. — P. 45—53.
12. *Zimmermann P., Zentgraf U.* The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development // Cell. Mol. Biol. Lett. — 2005. — **10**. — P. 515—534.

Отримано 16.10.2009

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАТАЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

И.М. Долиба, Р.А. Волков, И.И. Панчук

Черновицкий национальный университет имени Юрия Фельковича

Фермент каталаза обнаружен во всех группах эукариотических организмов. Он локализован в пероксисомах и цитозоле, играет главную роль в регуляции внутриклеточного содержания пероксида водорода. Известно несколько методик определения активности каталазы, однако все они разработаны для животных объектов и не могут применяться для растений без соответствующих уточнений. Предложена новая модификация методики измерения активности каталазы, которая основывается на образовании комплекса между пероксидом водорода и молибдатом аммония. Протестированы различные условия инкубации проб. Обсуждены преимущества и ограничения разных методик определения каталазной активности.

METHOD OF CATALASE ACTIVITY DETERMINATION IN PLANTS

I.M. Doliba, R.A. Volkov, I.I. Panchuk

Yurij Fedkovich Chernivtsy National University
2 Kotsubynskogo St., Chernivtsy, 58012, Ukraine

Catalase was found in all groups of eukaryotes. This enzyme is located in peroxisomes and cytoplasm and plays a central role in the control of the intercellular level of hydrogen peroxide. Several methods of catalase activity measuring were proposed. However, these methods were developed for animal tissues and cannot be applied for plants without appropriate corrections. Here we describe a novel modification for catalase activity assay based on the formation of complex between hydrogen peroxide and ammonium molybdate. Various incubation conditions were tested. Advantages and limitations of different methods are discussed.

Key words: *Nicotiana tabacum* L., catalase, hydrogen peroxide.