

УДК 577.151.42

DOI 10.30679/2587-9847-2020-29-165-169

ВЛИЯНИЕ СУЛЬФАТОВ МЕДИ И ЦИНКА НА РИБОНУКЛЕАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ КУЛЬТУРНОЙ СОИ

Мартыненко Н.В.¹, младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии
Лаврентьева С.И.^{1,2} канд. биологических наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории биотехнологии, доцент кафедры химии

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сои» (Благовещенск)

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Благовещенский государственный педагогический университет» (Благовещенск)

E-mail: myn@vniisoi.ru

Реферат. Исследовано влияние сульфатов меди(II) и цинка на рибонуклеазную активность культурной сои при проращивании (в течение одних, трех, пяти и семи суток) и установлено увеличение удельной активности рибонуклеазы (за исключением первых суток) и числа множественных форм фермента в проростках культурной сои. Полиморфизм рибонуклеаз проростков культурной сои под действием сульфатов меди(II) и цинка свидетельствует об адаптации сои на биохимическом уровне.

Ключевые слова: соя, тяжелые металлы, рибонуклеаза, удельная активность, множественные формы.

Summary. The influence of copper(II) and zinc sulfates on the ribonuclease activity of cultured soy during germination (for one, three, five and seven days) was studied and an increase in the specific activity of ribonuclease (except for the first day) and the number of multiple forms of the enzyme in the seedlings of cultivated soybean was found. Polymorphism of ribonucleases of soybean seedlings under the influence of copper(II) and zinc sulfates indicates adaptation of soy at the biochemical level.

Keywords: soybean, heavy metals, ribonuclease, specific activity, multiple forms.

Введение. Тяжелые металлы (ТМ) являются одними из самых распространенных загрязнителей окружающей среды [1]. В настоящее время ТМ общепризнанно рассматриваются в качестве приоритетных загрязнителей почв, при этом наиболее активными агентами загрязнения являются их подвижные формы, способные переходить в почвенные растворы и поглощаться растениями [2]. При этом химический состав растений отражает элементный состав почв. Поэтому избыточное накопление тяжелых металлов растениями обусловлено, прежде всего, их высокими концентрациями в почвах [3]. ТМ (ртуть, свинец, кадмий, цинк, медь и другие) относятся к числу распространённых и весьма токсичных загрязняющих веществ, при этом в небольших количествах ТМ являются незаменимыми для растений элементами. Например, большинство функций меди связано с ее участием в ферментативных окислительно-восстановительных реакциях, а цинк играет важную роль в азотном, углеродном и фосфорном обменах, способствует синтезу нуклеиновых кислот и белка, и повышению устойчивости растений к стрессовым воздействиям [4]. Избыточные концентрации ТМ отрицательно влияют на синтез и функции многих биохимических активных соединений: ферментов, витаминов, пигментов и др. [3].

Изучение механизмов адаптации различных организмов к условиям окружающей среды относится к приоритетным направлениям современных биологических

исследований. Общие закономерности стратегии биохимической адаптации растений нашли отражение в ряде работ [5, 6]. Приспособление организма к постоянно меняющимся условиям окружающей среды обуславливают именно ферменты, которые являются основным механизмом адаптации. Установлено, что изменения активности ферментов влияют на интенсивность и направленность биохимических процессов, что, в конечном счете, может привести, например, к изменению величины урожая и химического состава растений. Рибонуклеаза (РНКаза), относится к ферментам с широкой субстратной специфичностью и обладает способностью нейтрализовать действие большого спектра вирусных, бактериальных и других инфекций [7].

Цель нашего исследования – изучить влияние сульфатов меди и цинка на удельную активность и множественные формы рибонуклеаз семян культурной сои в течение одних, трех, пяти и семи суток.

Объекты и методы исследований. Объектом для исследований служили семена культурной сои сорта Лидия. Семена проращивали в термостате при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$ и освещенности 450 Lux, семена поверхностно стерилизовали в этаноле, промывали дистиллированной водой, затем проращивали в чашках Петри в течение одних, трех, пяти и семи суток. Интоксикация солями сульфата меди и сульфата цинка проводилась внесением добавки соответствующих солей в дистиллированную воду до концентрации, установленной в почве, которая составляет 0,04 мМ для меди и 0,3 мМ для цинка. Контролем служили пророщенные семена, без добавления соответствующих солей.

Экстракт белков сои получали путем гомогенизации семян (500 мг) в 0,15 М NaCl при 4°C в течении 15 минут. Полученный экстракт центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. Белок определяли по методу Лоури.

Активность рибонуклеазы определяли с высокополимерной РНК (Sigma, USA) из дрожжей в качестве субстрата. К 0,1 мл экстракта белков сои добавляли 0,4 мл 1%-ной дрожжевой РНК в 0,2 М ацетатном буфере (pH 5,6). Смесь инкубировали при 37°C в течение 45 мин. Затем не гидролизованную РНК осаждали, добавляли к пробам по 1 мл спиртово-магниевый осадитель, после чего пробирки ставили на 1 час на лед для формирования осадка, который удаляли центрифугированием при 8000 об/мин в течение 10 мин. Из супернатанта отбирали пробы по 0,5 мл, к каждой прибавляли по 3 мл дистиллированной воды и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 260 нм на спектрофотометре (ПромЭколаб, Россия) против контроля (дистиллированная вода). Параллельно обрабатывали контрольную пробу, в которую вносили спиртово-магниевый осадитель до раствора экстракта белка (Rassel, 1963). Удельную активность ферментов выражали в единицах на мг белка.

Множественные формы фермента выявляли методом электрофореза в 7,5%-ном ПААГ при 4°C по методу (Davis, 1964). На колонку наносили краситель бромфеноловый синий (Reanal, Венгрия), 0,1 мл экстракта белков сои и проводили электрофорез на приборе ПЭФ-1 (Россия) в трис-глициновом буфере (pH 8,3) при температуре $2-6^\circ\text{C}$, напряжении 200-500 вольт. В течение 15 минут через колонку пропускали ток 2,5 мА, затем 5 мА в течение 1,0-1,5 часов.

Места локализации РНКаза на электрофореграмме выявляли после инкубации гелей в 0,5%-ном растворе РНК в ацетатном буфере с pH 5,7 в течение 30 мин и последующей окраской 0,2%-ным раствором метиленовым синим (Вектон, Россия) в течение 30 мин. Избыток красителя удаляли 5%-ным раствором уксусной кислоты. Локализацию форм исследуемых ферментов устанавливали по относительной электрофоретической подвижности (Rf). Каждая форма ферментов сои согласно Rf была ранее обозначена для РНКаза – P1-P12 (Иваченко, 2011).

В качестве показателя интенсивности окисления использовали содержание малонового диальдегида (МДА). В основе метода лежит реакция между МДА и

тиобарбитуровой кислотой (ТБК), которая при высокой температуре и кислом значении рН протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса. 1 г образца гомогенизировали в фарфоровой ступке с 3 мл 50%-ого раствора этанола, полученный гомогенат центрифугировали 10 мин при 7000g. В пробирку с 0,5 мл супернатанта последовательно добавляли 0,5 мл 1%-ного раствора тритона X-100, 0,2 мл 0,6 М раствора HCl и 0,8 мл 0,06 М рабочего раствора ТБК (ЛенРеактив, Россия). Смесь нагревали в кипящей водяной бане в течение 10 мин. Охлаждение проводили при температуре 15°C в течение 30 мин. Для стабилизации окраски после охлаждения добавляли 0,2 мл 5мМ раствора трилона Б и 5-10 мл 96%-ного раствора этанола. Контролем служил образец, к которому добавляли все эти же растворы, кроме ТБК. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре (ПромЭколаб, Россия) при длине волны 532 нм (Рогожин, Рогожина, 2013).

Полученные экспериментальные данные были обработаны с помощью программного обеспечения STATISTICA 10, графическое представление данных – Excel (2010). Результаты выражали как среднее ($n = 6$) \pm стандартное отклонение, различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Обсуждение результатов. Одним из первых воздействию ТМ подвергаются липиды, как основной элемент живых организмов, быстрой реакцией на стресс является активация перекисного окисления липидов (ПОЛ), что приводит к накоплению одного из основных конечных продуктов ПОЛ – малонового диальдегида (МДА) [8].

В ходе наших исследований установлено, что в целом, при влиянии исследуемых солей на проростки культурной сои, наблюдается увеличение концентрации МДА относительно контроля (рис. 1). Стоит отметить, что на первые сутки воздействия сульфата цинка, нами выявлено снижение уровня МДА относительно контроля. Дальнейшее воздействие сульфата цинка на культурную сою приводило к увеличению концентрации МДА, при этом на третьи сутки уровень МДА был в три раза выше контроля (рис.1). Очевидно, что интенсивное накопление продукта окисления липидов – МДА, свидетельствует о весьма неблагоприятном воздействии определенных концентраций ТМ [9]. При этом следует отметить, что редокс-активные металлы (в нашем случае медь) могут прямо индуцировать ПОЛ через генерируемые в редокс-циклах активные формы кислорода, тогда как редокс-неактивные ТМ (Zn, Pb, Cd и др.) нарушают работу антиоксидантной системы и со временем приводят к усилению ПОЛ [8].

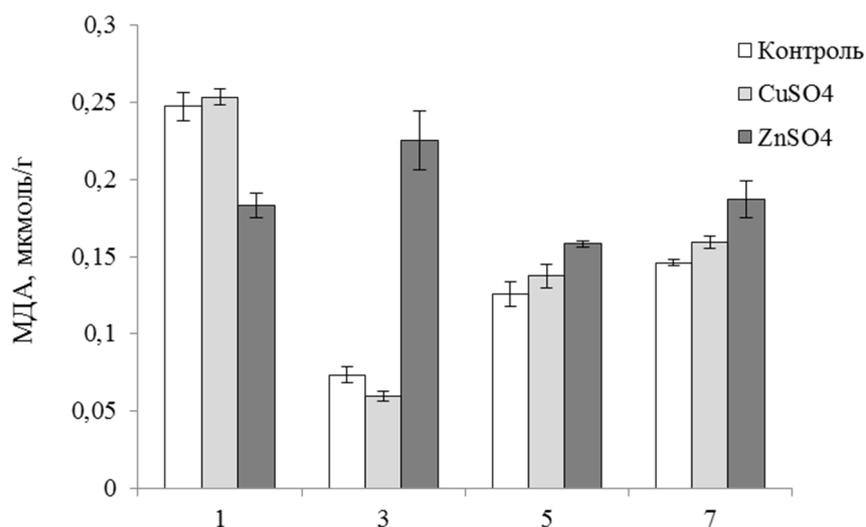


Рисунок 1 – Концентрация МДА (мкмоль/г) проростков культурной сои, выращенных в условиях интоксикации солями: CuSO₄ – сульфат меди, ZnSO₄ – сульфат цинка; 1, 3, 5, 7 – время воздействия (сутки).

Анализ удельной активности рибонуклеазы проростков сои при интоксикации исследуемых солей в течение одних, трех, пяти и семи суток позволил выявить значительные изменения (рис. 2). На первые сутки проращивания культурной сои удельная активность РНКаз при интоксикации сульфатами меди и цинка, уменьшалась относительно контроля. При влиянии сульфата цинка в течение трех суток наблюдалось увеличение удельной активности фермента в 3,3 раза по отношению к контролю. На пятые сутки воздействия исследуемых солей удельная активность РНКаз увеличилась относительно контроля, при этом стоит отметить значительное увеличение при воздействии сульфата цинка (в 2,5 раза). При более продолжительном воздействии сульфатов меди и цинка (семь суток) на проростки культурной сои наблюдалась выраженная активация удельной активности РНКаз относительно контроля в 2,5 и 1,7 раз, соответственно.

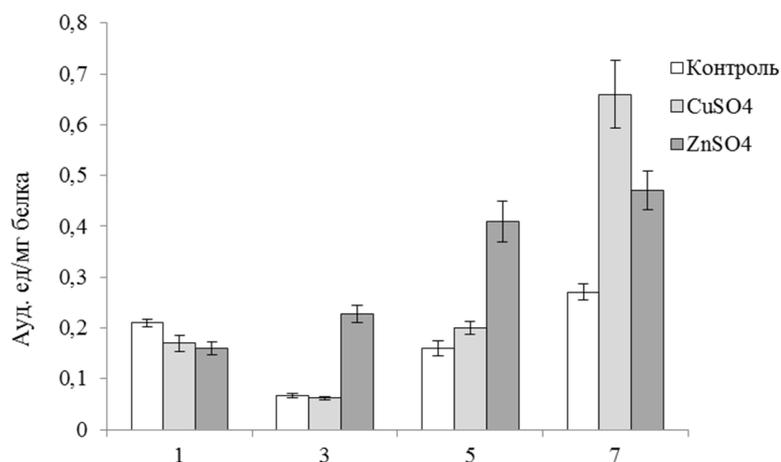


Рисунок 2 – Удельная активность рибонуклеаз (ед/мг белка) проростков культурной сои, выращенных в условиях интоксикации солями: CuSO₄ – сульфата меди, ZnSO₄ – сульфата цинка; 1, 3, 5, 7 – время воздействия (сутки).

Изучение схем энзимограмм РНКаз проростков культурной сои, выращенных в условиях интоксикации солями сульфата меди и сульфата цинка, позволил выявить 10 форм фермента (рис. 3). Были выявлены стабильные формы РНКаз: P1 и P2 – на первые сутки, P3 – третьи сутки, P1 и P3 – пятые сутки и P2 и P11 – седьмые сутки проращивания.

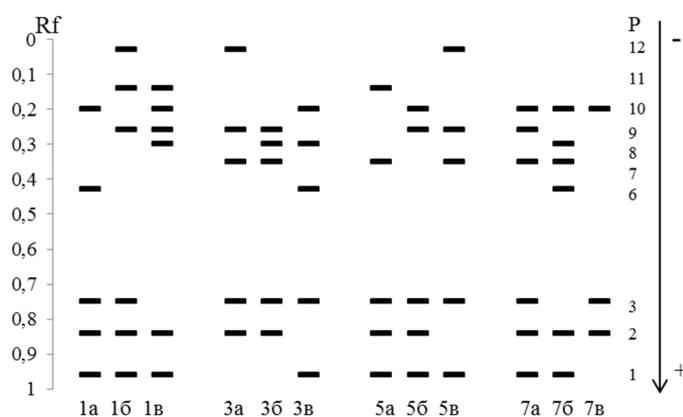


Рисунок 3 – Схема энзимограмм рибонуклеаз проростков культурной сои, выращенных в условиях интоксикации солями: а – контроль, б – сульфат меди (CuSO₄), в – сульфат цинка (ZnSO₄); 1, 3, 5, 7 – время воздействия (сутки). Стрелка – направление электрофореза (от катода к аноду).

При воздействии сульфатов меди и цинка число множественных форм РНКаз проростков культурной сои увеличилось относительно контроля. Заметим, что на первые сутки зафиксировано снижение удельной активности РНКаз и увеличение числа множественных форм, при интоксикации исследуемыми солями ТМ, относительно контроля. На первые сутки воздействия сульфатов меди и цинка выявлены новые множественные формы фермента – Р9, Р11, Р12 и Р8, Р9, Р11 соответственно. На третьи сутки воздействия сульфата цинка на проростки культурной сои, наблюдалось появление форм – Р1, Р6 и Р10, при воздействии сульфата меди – Р8. На пятые сутки проращивания культурной сои при воздействии сульфатов меди и цинка было выявлено по две новые формы фермента – Р9, Р10 и Р9, Р12 соответственно. На седьмые сутки воздействия сульфата меди в проростках культурной сои установлены две новые формы РНКазы – Р6 и Р8.

Выводы. В ходе проведенных нами исследований установлено, что присутствие в среде сульфатов меди и цинка при проращивании культурной сои вызывает окислительный стресс в растении. В ответ на стресс, вызванный действием исследуемых солей, происходит увеличение удельной активности РНКазы (за исключением первых суток) и числа множественных форм фермента в проростках культурной сои. Полиморфизм РНКаз проростков культурной сои под действием сульфатов меди и цинка свидетельствует об адаптации сои на биохимическом уровне, что, возможно, регулируется на генетическом уровне. Таким образом, анализ удельной активности и множественных форм РНКаз является чувствительным индикатором для прогнозирования воздействия тяжелых металлов на сою.

Литература

1. Кизиллов О.А., Байкин Ю.Л., Овчинников П.Ю. Применение минеральных сорбентов при загрязнении почв тяжелыми металлами // Вестник биотехнологии. 2017. № 1(11). С. 16.
2. Михальчук Н.В. Тяжелые металлы и микроэлементы в фоновых почвах и агроландшафтах юго-запада Беларуси // Агроэкологічний журнал. 2017. № 3. С. 27-31.
3. Влияние тяжелых металлов на растения [Электрон.ресурс]. – Режим доступа: <https://lektsii.org/16-23721.html> – 20.08.2020.
4. Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М. Физиологические основы устойчивости растений к тяжелым металлам: учебное пособие; Институт биологии КарНЦ РАН. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2011. 77 с. ISBN 978-5-9274-0491-9.
5. Семенова Е.А., Теоретическое и экспериментальное обоснование роли адаптации сои в повышении урожайности (монография). Благовещенск: ДальГАУ, 2019. С. 60.
6. Иваченко Л.Е., Коничев А.С. Роль биологически активных веществ сои в адаптации к условиям выращивания: монография. М.: Изд-во ИИУ МГОУ. 2016. С. 154.
7. Lavrent'yeva S.I., Chernyshuk D.K., Martinenko N.V., Ivachenko L.E., Arsene A.L., Ercisli S., Tsatsakis A.M., Golokhvast K.S., Nawaz M.A. biochemical adaptation of wild and cultivated soybean against toxicity of lead salts // Environmental toxicology and pharmacology. 2020. Vol. 79. DOI:10.1016/j.etap.2020.103429
8. Будкевич Р.О., Демченков Е.Л., Будкевич Е.В. Закономерности влияния тяжелых металлов на перекисное окисление в липидной модельной системе // Фундаментальные исследования. 2013. № 11-7. С. 1352-1356.
9. Михайлова И.Д., Лукаткин А.С. Перекисное окисление липидов в растениях огурца и редиса при действии тяжелых металлов // Известие Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2016. Т. 16. №2. С. 206-210.