

І. Ф. Карпілова, І. М. Соколова, С. М. Газіянець

ВИДІЛЕННЯ АКТИВНОЇ РИБУЛОЗО-1, 5-БІСФОСФАТКАРБОКСИЛАЗИ З ЛИСТЯ БАВОВНИКУ ВИДІВ *GOSSYPIUM HIRSUTUM* L. ТА *G. BARBADENSE* L.

Запропоновано швидкий метод виділення та очищення рибулозо-1,5-бісфосфаткарбоксілази з листя бавовнику. Певний комплекс додатків цілком зв'язує поліфеноли і дозволяє отримати високу загальну й питому активність ферменту, який був виділений з листя стиглих рослин із значним вмістом фенольних сполук. Метод є придатним для порівняльного аналізу серії зразків, що дозволяє його використовувати для генетичних та еволюційних досліджень.

Вступ. Рибулозо-1,5-бісфосфаткарбоксілаза/оксигеназа (Рубіско, КФ 1.1.39) є одним з ключових ферментів фотосинтезу та фотодихання. Зараз Рубіско є цікавою для генноінженерних робіт і генетичних досліджень, які орієнтовані на підвищення фотосинтетичної активності різних видів рослин [1].

Виділенню і очищенню Рубіско з листя бавовнику перешкоджає високий вміст поліфенольних сполук, зокрема госипола, що призводить до денатурації білка при гомогенізації тканини. Для захисту Рубіско від дії поліфенолів при роботі з проростками бавовнику використовували боратний буфер, який міцно зв'язує поліфеноли і сприяє збереженню активності ферменту у процесі його виділення [2]. В наших досліджах виявлено, що цей метод придатний для досліджень рослин лише на ранніх стадіях онтогенезу або для безгосипільних сортів, які промислово вирощуються у США. При отриманні частково очищених препаратів Рубіско з листя рослин, що досягли репродуктивної фази, видів *G. hirsutum* L. та *G. barbadense* L. використання методу [3] не дало позитивних результатів. В екстрактах з листя сортів виду *G. hirsutum* L. відзначено низький вміст білка, а ввиду *G. barbadense* L. — цим методом білка не виявлено зовсім. Можливо, це обумовлено різною видовою специфічністю накопчення госиполу та динаміки його вмісту в тканинах у ході онтогенезу. Відомо, що вміст поліфенолів у листі бавовнику виду *G. barbadense* L. значно вищий, ніж в інших видів.

Метою цієї роботи була модифікація методу [3] виділення та часткового очищення Рубіско з листя дорослих рослин різних видів і сортів бавовнику та визначення активності ферменту.

Матеріали і методи. Матеріалами досліду слугували контрастові сорти 108-Ф, ВНИИССХ-1, Короткостебловий виду *G. hirsutum* L. та сорту ТСХІ-21 і Карши-2 виду *G. barbadense* L. Рослини вирощували у кліматичній камері на протязі 1,5—2 місяців до настання масової бутонізації. Для аналізу використовували сім'ядольне листя, а також листя 3—5-го ярусу на головній стебліні у період цвітіння рослин.

Рубіско з листя різних культур звичайно виділяють у середовищі, яке містить трис-НСІ буфер, рН 7,8 [4]. Проте у дослідях з бавовником при використанні цього буфера білок в екстрактах був відсутній (табл. 1). Тому у подальших дослідженнях застосовували боратний буфер, рН 7,6 [3] з додаванням 10 мМ $MgCl_2$, 10 мМ $NaHCO_3$, 1 мМ ЕДТА, 20 мМ дитіотреїтолу (ДТТ) (середовище 1).

Активність Рубіско визначали радіометричним методом за включенням ^{14}C до кислотостійкого продукту [4]. Реакцію карбоксилювання провадили на протязі 1 хв при 30 °С і зупиняли додаванням 6 н. НСІ до реакційної суміші. Радіоактивність зразків підраховували на сцинтиляційному лічильнику фірми «Beckman» (США). Кількісний вміст білка у зразках реєстрували за Бредфордом [5]. Успішне виділення активної Рубіско у боратному буфері відзначалося лише за су-

Таблиця 1

Дія додатків до середовища виділення [3] на вміст білка та питому активність Рубіско у вида *G. hirsutum* L.

Параметр	Середовище I		Середовище II			
	0,1 М трис-НСІ буфер	Без додат- ків	0,2 боратний буфер			
			+ДТТ, мМ		+Polyclar, мг/г	
			20	40	50	100
Вміст білка, мг/г сирової маси	0	10,5	10,0	9,65	9,60	7,70
Питома активність Рубіско, мкмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка	0	0,38	0,42	0,41	0,38	0,51

ворого дотримання величини рН 7,6. Використання цього буфера з рН 7,8 та 8,0 призводило до різкого зниження вмісту білка в екстракті.

Тривале збереження боратного буфера при температурі 2—4 °С викликає рясне випадання бури до осаду, що зсуває значення рН розчину.

Таким чином, виділення Рубіско у натрій-боратному буфері повинно здійснюватися за ретельного дотримання температурного режиму та величини рН у процесі гомогенізації та центрифугування.

Результати і обговорення. З метою досягнення максимальної активності ферменту, отриманого з різних видів бавовнику, було перевірено додаткові компоненти, які вносилися до середовища і стабілізували фермент за високого вмісту фенольних сполук у листі. Збільшення концентрації ДТТ не спричиняло до помітних змін активності ферменту. Додавання низькомолекулярного полівінілпіролідону (PVP) Polyclar AT при гомогенізації тканин з розрахунку 100 мг на 1 г сирової маси листя сприяло отриманню форми ферменту з найвищою активністю, хоча й супроводжувалося кількісною втратою білка, пропорційною такій препараті, що додавався (див. табл. 1). У виду *G. barbadense* L. збільшення концентрації Polyclar до 200 мг/г листової тканини при її гомогенізації призводило не тільки до кількісної втрати білка, але й до зниження його активності, що, можливо, пояснюється здатністю Polyclar зв'язувати не тільки поліфеноли, але й частково білок. При роботі з дослідними зразками у репродуктивній фазі використання 0,2 М боратного буфера, який містив додатки середовища I і 10 % Polyclar AT, викликало низький вихід білка і навіть неможливість його тестування в деяких зразках (див. табл. 1). Підвищення концентрації боратного буфера з 0,2 до 0,3 М не спричиняло до будь-яких змін активності. Проте додавання до середовища виділення 0,5 % розчинного PVP (м. м. 25 000—30 000) значно збільшило вихід білка у ферментних препаратах обох видів бавовнику. Виключення становив сорт ВНИИССХ, у якого вміст білка не залежав від наявності у середовищі виділення PVP та інших додатків, що, можливо, обумовлено меншим вмістом поліфенолів у листі цього сорту. Використання розчинного PVP дозволило зменшити дозу Polyclar до 5 % і знизити втрати білка при гомогенізації тканини (табл. 2).

На підставі отриманих результатів відпрацьовано наступний метод виділення та очищення Рубіско з листя стиглих рослин бавовнику видів *G. hirsutum* L. і *G. barbadense* L.

1 г листової тканини розтирали у ступці на холоді з максимальною швидкістю у 0,2 М боратному буфері, який містив 10 мМ MgCl₂, 10 мМ NaHCO₃, 1 мМ ЕДТА, 5 % Polyclar, 0,5 % PVP і 20 мМ ДТТ.

Гомогенат віджимали крізь два шари нейлону з додаванням 5 % Polyclar і центрифугували 20 хв при 16 000 об/хв. Білок з супернатан-

Таблиця 2

Вплив додавання PVP до середовища виділення на вміст білка у ферментних препаратах різних видів і сортів

Варіант досліджу	Вміст білка, мг/г сирої маси				
	<i>G. hirsutum L.</i>			<i>G. barbadense L.</i>	
	108-Ф	ВНИССХ	Коротко-стебловий	Карши-2	ТСХИ-21
Контроль (без PVP)	1,45	7,70	0	1,30	0,25
Дослід (з додаванням PVP)	11,80	7,20	10,70	10,30	13,90

ту осаджували сульфатом амонію за 60 %-го насичення та удруге центрифугували у зазначеному режимі. Отриманий осад розчиняли у 0,05 М трис-НСІ буфері (рН 7,8), який містив 10 мМ MgCl₂, 10 мМ NaHCO₃, 0,1 мМ ЕДТА, 10 мМ ДТТ. Розчин білка перепускали крізь колонку з сефадексом G-75, зрівноваженим тим самим буфером, але з 2 мМ ДТТ. Всі операції провадили при 4 °С.

Використання методу [3] для виділення Рубіско з листя бавовнику не дало позитивного результату. У ході гомогенізації листяної тканини білок піддається активному впливові з боку поліфенольних сполук, концентрація яких у лусті бавовнику, що досяг репродуктивної фази, є дуже високою. Госипол і споріднені йому сполуки при окисленні утворюють ковалентні зв'язки з білком та денатурують його. Якісний і кількісний склад поліфенолів має видову й сортову специфіку, що може перекручувати результати порівняльних аналізів у випадку неповного блокування поліфенолів. Це підтвердилося різною чутливістю вивчених генотипів сортів до складу буферної суміші, яку використовували при виділенні ферменту. Через це виникла потреба відпрацювати комплекс сполук, що можуть зв'язувати і максимально захищати білок від денатурації.

Певне поєднання додатків до середовища виділення (0,5 % PVP, 5 % Polyclar, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ NaHCO₃) та використання 0,2 М боратного буфера дозволяло підтримувати білок у високоактивному стані під час виділення й очищення. Подальше підвищення вмісту PVP у середовищі виділення до 1 % викликало сильне збільшення щільності середовища і вимагало використання високошвидкісної вакуумної центрифуги VAC-60 для осаджування білка, що збільшувало тривалість аналізу. Тим часом, тривалість очищення білка впливає на його активність і одним з наших завдань було відпрацювання швидкого методу отримання активної Рубіско.

На перших етапах виділення боратний буфер захищає білок, утворюючи оборотний комплекс поліфенол—борат, який руйнується при температурі вище 4 °С. Нерозчинний Polyclar та розчинний PVP також зв'язують поліфенольні сполуки. Осад з Polyclar видаляли, а від комплексу поліфеноли—PVP звільнялися при очищенні білкового екстракту методом хроматографії з сефадексом G-75.

Модифіковані середовища виділення придатні для гомогенізації матеріалу у ступці або низькошвидкісному подрібнювачі на відміну від використання спеціального гомогенізатору Polytron, який було обрано авторами [3] після перевірки декількох видів швидкісних гомогенізаторів.

Запропонований метод забезпечує виділення активної Рубіско з листя стиглих рослин бавовнику видів *G. hirsutum L.* та *G. barbadense L.* і можливість порівняльного аналізу її активності в різних генотипів. Вид *G. barbadense L.* характеризується високим вмістом поліфенолів, який можна порівняти з дикорослими видами. Це дозволяє використовувати даний метод в еволюційних дослідженнях бавовнику. Отримання стабільних результатів за вмістом білка та питомою активності Рубіско свідчить про надійність методу, а скорочений час дослі-

ду дає можливість одночасного аналізу 5—6 зразків, що робить метод придатним для будь-яких генетичних досліджень та виявлення генотипічних відмін.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Ellis B. J.* The most abundant protein in the world // *Trends Biochem. Sci.*—1979.—4.—P. 241.
2. *Quayle T. J., Katterman F. R., Jensen R. J.* Isolation of active ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase from glanded cotton//*Physiol. Plant.*—1980.—50.—P. 233—236.
3. Действие температуры на рибулзобисфосфаткарбоксилазу листьев клевера в раннем онтогенезе /И. Карпилова, Н. З. Рагимова, А. К. Романова, А. Б. Пачепская// *Физиология растений.*—1988.—35, № 1.—С. 41.
4. *Bradford M. M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-due binding//*Anal. Biochem.*—1979.—72, N 2.—P. 248—257.
5. *King E. E.* Extraction of cotton leaf enzymes with borate//*Phytochemistry.*—1971.—10, N 10.—P. 2337—2341.

Ин-т грунтознавства і фотосинтезу РАН, Москва
Ин-т експерим. біології рослин АН Узбекистану, Ташкент

Одержано 11.09.91