

УДК: 581.143

Модифицированная методика определения пролина в растительных объектах

Г.Н.Шихалеева¹, А.К.Будняк^{1,2}, И.И.Шихалеев¹, О.Л.Иващенко^{1,2}

¹Физико-химический институт защиты окружающей среды и человека МОН Украины и НАН Украины (Одесса, Украина)

²Одесский национальный университет имени И.И.Мечникова (Одесса, Украина)
ekko@ukr.net; budnyak2005@ukr.net

Предложена оптимизированная для условий массовых измерений модифицированная методика определения свободного пролина нингидриновым методом в растительных объектах. Новая модификация известного метода характеризуется большей простотой, экспрессивностью и безвредностью для исследователя. Показано применение данной методики для оценки динамики изменений содержания аминокислоты пролина в листьях лоха узколистного (*Elaeagnus angustifolia* L.) и солероса европейского (*Salicornia europaea* L.), которые произрастают на участках побережья гиперсоленого Куяльницкого лимана в условиях засоления почв NaCl.

Ключевые слова: модифицированный метод Бейтса, пролин, нингидриновая реакция, *Elaeagnus angustifolia* L., *Salicornia europaea* L., стресс-реакции, адаптация.

Модифікована методика визначення проліну в рослинних об'єктах

Г.Н.Шихалєєва, О.К.Будняк, І.І.Шихалєєв, О.Л.Іващенко

Запропонована оптимізована для умов масових вимірювань модифікована методика визначення вільного проліну нінгїдриним методом в рослинних об'єктах. Нова модифікація відомого методу характеризується більшою простотою, експресивністю і нешкідливістю для дослідника. Показано застосування цієї методики для оцінки динаміки змін вмісту амінокислоти проліну в листках маслини вузьколистої (*Elaeagnus angustifolia* L.) та солеросу європейського (*Salicornia europaea* L.), які ростуть на ділянках узбережжя гіперсоленого Куяльницького лиману в умовах засолення ґрунтів NaCl.

Ключові слова: модифікований метод Бейтса, пролін, нінгїдринова реакція, *Elaeagnus angustifolia* L., *Salicornia europaea* L., стрес-реакції, адаптація.

A modified method for determination of proline in plants

G.N.Shihalyeyeva, A.K.Budnyak, I.I.Shihalyeyev, O.L.Ivaschenko

It is known that the reaction of plants to stress can be judged by proline concentration in their bodies. There has been proposed optimized for mass measurements, modified method for determination of free proline by ninhydrin method in plants. The new modification of the known method is characterized by greater simplicity, expressiveness and harmlessness for researchers. It has been shown application of this technique for the assessment of changes in the amino acid proline content in the leaves of *Elaeagnus angustifolia* L. and *Salicornia europaea* L., which grow in coastal areas of hypersaline Kuyalnik estuary, with high soil salinity by NaCl.

Key words: modified Bates method, proline, ninhydrin reaction, *Elaeagnus angustifolia* L., *Salicornia europaea* L., stress response, adaptation.

Введение

Одним из основных биохимических показателей, по которому судят о процессах, происходящих у растений с точки зрения их реакции на стресс, в том числе и с экологической точки зрения, — это содержание аминокислоты пролина в растительной массе.

Пролин (про, pro, P) — гетероциклическая аминокислота, содержание которой увеличивается многократно при стрессовых воздействиях. Накопление пролина помогает растениям адаптироваться к неблагоприятным условиям, защищая от инактивации белки, ДНК, ряд ферментов и других важнейшие клеточные компоненты. Одним из химических свойств пролина является его способность «тушить» синглетный кислород ($^1\text{O}_2$) и гидроксил радикал (OH^*). Заметное увеличение содержания свободного пролина в различных органах растений при стрессах вызывает интерес многих

исследователей в связи с возможностью использования этого показателя в качестве биохимического маркера в защитных реакциях растений (Невмержицкая, Тимофеева, 2012). Вместе с тем, до сих пор отсутствуют систематические исследования проявления антиоксидантных свойств пролина и его роли в поддержании редокс-гомеостаза клеток при накоплении АФК у растений-галофитов, адаптированных к стрессам и аккумулирующих пролин в высоких концентрациях. Динамика колебаний содержания пролина в растениях в условиях хлоридного засоления среды может служить отражением устойчивости растительных клеток. Поэтому задачи разработки и усовершенствования методик для простого, удобного и надежного определения пролина в растительных объектах являются актуальными.

Согласно данным литературы, существуют различные методы количественного определения пролина – хроматографические (ГЖХ, ВЭЖХ), электрофоретические, фотокolorиметрические, спектрофотометрические, микробиологические (Симонян и др., 2007), многие из которых являются достаточно трудоемкими, длительными, связаны с использованием токсических веществ либо дорогостоящей аппаратуры. Наиболее часто из простых методов количественного определения пролина используются классический метод Бейтса и его различные модификации (например, Bates et al., 1973; Калинкина и др., 1990; Саматова и др., 2009; Коренман, 1975; Бурмистрова и др., 2011; Carillo, Gibon, 2011). Несмотря на широкую известность реакции нингидрина с аминокислотами и, казалось бы, ее детальную изученность, нюансы методики вызывают некоторые технические сложности как в получении данных, так и в их интерпретации. Таким образом, целью данной работы являлось усовершенствование известного метода определения пролина к условиям массовых исследований растительных объектов.

Методика и объекты исследования

Для тестирования использовали образцы лоха узколистного (*Elaeagnus angustifolia* L.), семейство Лоховые (Elaeagnaceae), и солероса европейского (*Salicornia europaea* L.), семейство Маревые (Chenopodiaceae), произрастающих на побережье гиперсоленого Куяльницкого лимана. По результатам анализа выполненной серии определений пролина в образцах галофитов по классическому методу Бейтса и в модификациях предложено провести оптимизацию методики в части условий экстракции пролина из биоматериала и условий проведения нингидриновой реакции. В нашей модификации методика определения свободного пролина выглядит следующим образом.

Содержание свободного пролина определяли с помощью кислого нингидринового реактива, приготовленного без нагревания (1,25 г нингидрата + 30 мл ледяной уксусной кислоты + 20 мл 6 М H_3PO_4). Навеску свежей растительной ткани листовой пластины растения (200 мг) заливали 5–20 мл кипящей дистиллированной воды и выдерживали в течение 10 минут на водяной бане при температуре 100°C. В случае, если полученный экстракт мутный, его фильтруют. Затем в чистую пробирку заливали 2 мл ледяной уксусной кислоты, 2 мл нингидринового реактива и добавляли 2 мл приготовленного экстракта. Пробы инкубировали в течение 20 мин на водяной бане при температуре 100°C, после чего быстро охлаждали до комнатной температуры. После искусственного охлаждения (холодной водой или льдом) измеряли оптическую плотность продуктов реакции при длине волны 520 нм на спектрофотометре ULAB S131UV в кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм. Значения содержания пролина рассчитывали с помощью калибровочной кривой, используя для ее построения химически чистый пролин («Sigma»).

С целью выявления подчинения закону светопоглощения продуктов реакции пролина с раствором нингидрина при длине волны 520 нм нами исследована зависимость светопоглощения от концентрации пролина в широком интервале концентраций до 0,6 мМ/мл. При этом очевидно, что калибровочный график во всем интервале измерений не является линейным. Для использования мы разбили его на линейные отрезки с целью получения линейной зависимости для каждого интервала концентраций пролина (рис. 1, 2).

Следует отметить, что для измерения мы использовали стеклянные кюветы, так как на стенках кварцевых и пластиковых кювет адсорбируется значительное количество красителя.

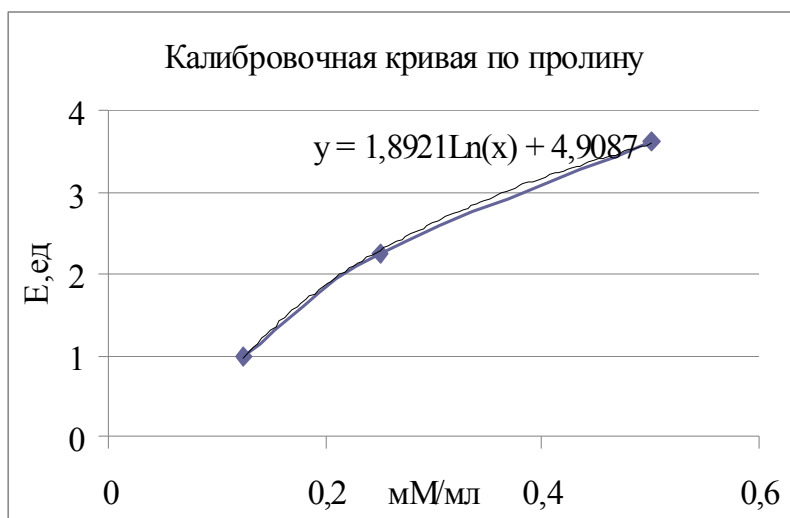


Рис. 1. Калибровочный график продукта реакции пролина (концентрации 0,1–0,6 мМ/мл)

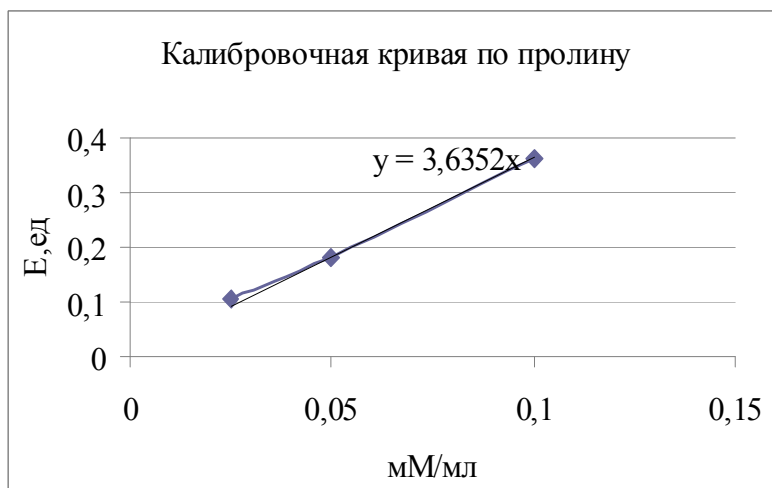


Рис. 2. Калибровочный график продукта реакции пролина (концентрации 0,025–0,1 мМ/мл)

Результаты и обсуждение

Серия проведенных исследований по экстракции пролина из образцов листовых пластинок галофитов с применением кислотных вытяжек при центрифугировании в 10 мл 3%-ного раствора сульфосалициловой кислоты в течение 10 мин при 5000 g (Bates et al., 1973), спиртовых (Carillo, Gibon, 2011) и водных вытяжек (Бурмистрова и др., 2011) с кипячением их на водяной бане при температуре 100°C в течение от 10 до 60 мин с последующим проведением нингидриновой реакции в соответствии с методом Бейтса показали, что максимумы поглощения продуктов реакции пролина с нингидриновым реактивом при всех методах экстракции фиксируются в видимой области спектра при длине волны 518, 520 и 521 нм, в УФ-области – при длинах волн 330, 361 и 364 нм. Спектры с максимумами поглощения чистого пролина также фиксировались при длинах волн около 361 и 521 нм. Максимумы поглощения проб с экстрактами лоха или солероса, к которым был добавлен экзогенный пролин в той же концентрации, фиксировались при длинах волн 330, 364 и 520 нм. Для сравнительных исследований мы в дальнейшем проводили спектрофотометрирование продукта реакции пролина с нингидрином в видимой области при длине волны 520 нм, т.к. при этих условиях образуется более стабильный продукт с максимальными значениями оптической плотности.

Мы изучили также влияние продолжительности извлечения пролина кипячением водных и спиртовых вытяжек при времени экспозиции 10, 20 и 60 мин. Полученные результаты показали, что для максимального извлечения достаточно проводить реакцию извлечения нагреванием в растворителе при температуре 100°C в течение 10 мин, так как более длительное нагревание может приводить к разложению продукта и в последующем при реакции с нингидрином к снижению оптической плотности. Причем, следует отметить, что интенсивность поглощения при использовании спиртовых вытяжек намного ниже, что, вероятнее всего, связано как с потерями при кипячении, так и возможным разложением проб (потери индикации пролина при кипячении составляют около 50%). В соответствии с чем наиболее оптимальными для массовых анализов, на наш взгляд, условиями извлечения пролина из биоматериала является водная экстракция методом кипячения на водяной бане при времени экспозиции 10 мин.

Далее осталось выяснить, какой тип нингидринового реактива нам использовать, и оптимизировать условия проведения нингидриновой реакции. Согласно Бэйтсу: к 1,25 г нингидрина прибавляли 30,0 мл ледяной уксусной кислоты, 20,0 мл 6 М раствора ортофосфорной кислоты. При этом одни авторы (Стаценко, Бутылкин, 2000) для его приготовления кипятят, другие (Михальская и др., 2009) обходятся без кипячения. P.Carillo и Y.Gibon вообще используют смесь: 1% нингидрин в 60% уксусной кислоте, содержащей 20% этанола. Мы остановились на первой смеси.

В классических работах нингидриновая смесь с биоэкстрактом кипит около 60 мин, но в работе (Carillo, Gibon, 2011) заявлено, что достаточно 20 мин. Далее по истечении времени инкубации 20 и 60 мин при температуре 100°C смесь с биоэкстрактом быстро охлаждали до комнатной температуры или во льду: мы не получили существенных различий как по времени инкубации нингидриновой смеси с биоэкстрактом, так и по схеме охлаждения.

Учитывая, что при стрессовых условиях уровень других нингидрин-зависимых соединений невысок (Carillo, Gibon, 2011), нет также необходимости использовать толуол (бензол, ксилол) или другие жирорастворимые растворители для элюирования хромофора. Это значительно упрощает использование данной методики. Во-первых, ароматические углеводороды токсичны, во-вторых, бензол и толуол относятся к прекурсорам, для работы с которыми необходима лицензия. Использование для элюирования хромофора изобутанола (Коренман, 1975) не приводит к четкому расслоению водной и органической фракции.

Согласно полученным данным, с помощью обсуждаемой методики содержание пролина в листовой пластине образцов лоха узколистного, отобранного одновременно на модельных площадках с различным уровнем засоления почв, колебалось в интервале от 55,3–375,8 мкмоль/г массы сырого вещества, а у солероса европейского содержание пролина составляло 21,5–36,9 мкмоль/г. По классическому методу Бейтса содержание пролина у лоха узколистного составило 60,2–340,1 мкмоль/г, а у солероса европейского – 22,6–38,4 мкмоль/г. Из приведенных данных видно, что содержание пролина не отличается в исследуемых образцах от данных, полученных при использовании классического метода Бейтса.

Таким образом, предложенная нами модифицированная методика определения свободного пролина в растительных объектах, описанная выше в разделе «Методика», отличается простотой, быстротой определения, доступностью (относительная ошибка результата отдельного определения не превышает 5%), большей безвредностью для исследователя, т.к. лишена необходимости использовать прекурсор толуол или другие токсичные жирорастворимые агенты, и может быть использована для массовых исследований при изучении процессов адаптации галофитных и гликофитных растений к условиям действия стрессовых факторов (засоления, засухи, антропогенного загрязнения).

Список литературы

- Бурмистрова Н.А., Гомаа А., Ралдугина Г.Н. Содержание растворимых сахаров и холодоустойчивость растений рапса со встроенным геном *osmyb4* // Материалы международной конференции «Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды». – Петрозаводск, 2011. – С. 53–59. /Burmistrova N.A., Gomaa A., Raldugina G.N. Soderzhaniye rastvorimyykh sakharov i kholodoustoychivost' rasteniy rapsa so vstroennym genom osmyb4 // Materialy mezhdunarodnoy konferentsii «Strukturnyye i funktsional'nyye otkloneniya ot normal'nogo rosta i razvitiya rasteniy pod vozdeystviyem faktorov sredy». – Petrozavodsk, 2011. – S. 53–59./
- Калинкина Л.Г., Назаренко Л.В., Гордеева Е.Е. Модифицированный метод выделения свободных аминокислот для определения на аминокислотном анализаторе // Физиология растений. – 1990. –

T.37. – С. 617–621. /Kalinkina L.G., Nazarenko L.V., Gordeeva Ye.Ye. Modifitsirovannyi metod vydeleniya svobodnykh aminokislot dlya opredeleniya na aminokislotnom analizatore // Fiziologiya rasteniy. – 1990. – Т.37. – С. 617–621./

Коренман И.М. Фотометрический анализ (издание 2). – М.: Изд-во «Химия», 1975. – 360с. /Korenman I.M. Fotometricheskii analiz (izdaniye 2). – М.: Izd-vo «Khimiya», 1975. – 360s./

Михальская С.И., Порецкая Е.И., Сергеева Л.Е. Варьирование уровня свободного пролина у W-устойчивой клеточной линии сои при культивировании на различном стрессовом фоне // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2009. – Т.7, №1. – С. 74–81. /Mikhal'skaya S.I., Poretskaya Ye.I., Sergeyeva L.ye. Var'yirovaniye urovnya svobodnogo prolina u W-ustoychivoy kletochnoy linii soi pri kul'tivirovanii na razlichnom stressovom fone // Visn. Ukr. tov-va genetykiv i selektsioneriv. – 2009. – Т.7, №1. – С. 74–81./

Невмержицкая Ю.Ю., Тимофеева О.А. Практикум по физиологии и биохимии растений (белки и ферменты). – Казань: Казанский университет, 2012. – 36с. /Nevmerzhitskaya Yu.Yu., Timofeyeva O.A. Praktikum po fiziologii i biokhimii rasteniy (belki i fermenty). – Kazan': Kazanskiy universitet, 2012. – 36s./

Саматова И.С., Дунаева С.Е., Шарова Е.И. и др. Особенности микроразмножения и динамика морфофизиологических показателей некоторых представителей родов Rubus и Fragaria (Rosaceae) при хранении in vitro // Растительные ресурсы. – 2009. – Т.45, вып.4. – С. 1–12. /Samatova I.S., Dunayeva S.Ye., Sharova Ye.I. i dr. Osobennosti mikrorazmnozheniya i dinamika morfofiziologicheskikh pokazateley nekotorykh predstaviteley rodov Rubus i Fragaria (Rosaceae) pri khranenii in vitro // Rastitel'nyye resursy. – 2009. – Т.45, вып.4. – С. 1–12./

Симонян А.В., Саламатов А.А., Покровская Ю.С., Аванесян А.А. Использование нингидриновой реакции для количественного определения α-аминокислот в различных объектах: Методические рекомендации. – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2007. – 106с. /Simonyan A.V., Salamatov A.A., Pokrovskaya Yu.S., Avanesyan A.A. Ispol'zovaniye ningidrinovoy reaktsii dlya kolichestvennogo opredeleniya α-aminokislot v razlichnykh ob'yektakh: Metodicheskiye rekomendatsii. – Volgograd: Izd-vo VolGMU, 2007. – 106s./

Стаценко А.П., Бутылкин Ф.А. Способ оценки жаростойкости растений. Патент №2159033. Российская Федерация. А01Н1/04. №99105552/13. Заявл. 15.03.1999. Оpubл. 20.11.2000. /Statsenko A.P., Butylkin F.A. Sposob otsenki zharostoykosti rasteniy. Patent №2159033. Rossiyskaya Federatsiya. A01H1/04. №99105552/13. Zayavl. 15.03.1999. Opubl. 20.11.2000./

Bates L.E., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant Soil. – 1973. – Vol.39. – P. 205–207.

Carillo P., Gibon Y. Protocol: Extraction and determination of proline. 2011

(<http://prometheuswiki.publish.csiro.au/tiki-index.php?page=Extraction+and+determination+of+proline>)

Представлено: Р.Е.Хома / Presented by: R.E.Khoma

Рецензент: О.О.Авксентьева / Reviewer: O.A.Avksentyeva

Подано до редакції / Received: 10.04.2014