

# Методы исследования органических кислот

1. Фиксация растительного материала кипящим этанолом (80%).
2. Экстракция органических кислот из гомогената.
3. Ионообменная хроматография с использованием катионитов и анионитов.
4. Бумажная хроматография.
5. Качественное и количественное определение органических кислот.

# Методы исследования органических кислот

6. Современные методы с использованием газовой и жидкостной хроматографии.
7. Использование радиоизотопных (меченых) предшественников.
8. Использование изоферментного состава энзима для характеристики накопления и локализации органических кислот.

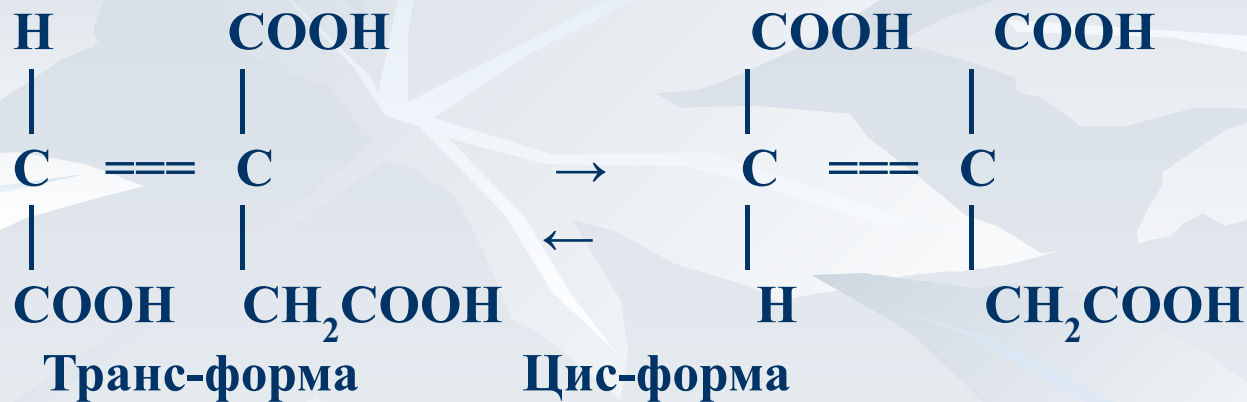
# Функциональная роль органических кислот

1. Транспорт и образование восстановительных эквивалентов (НАДН, НАДФН и др.).
2. Транспорт органического углерода, связанный с фиксацией  $\text{CO}_2$  (цикл Хэтча-Слейка, САМ).
3. Создание фонда органических кислот и снабжение субстратами такого важного энергетического процесса, как цикл Кребса. Используется НАД-зависимая малатдегидрогеназа, декарбоксилирующая (малик-энзим) для раскрутки ЦТК при ингибировании реакции гликолиза.

# Функциональная роль органических кислот

4. Важнейший поставщик электронов и гидрид-ионов для синтеза АТФ.
5. Регуляция величины рН цитоплазмы за счет баланса органических кислот между вакуолью и цитоплазмой.
6. Осморегуляция растений:
  - а) обеспечивает протекание водообмена в органах растений;
  - б) перенос ионов внутрь клетки.
7. Интеграция различных метаболических потоков в растительной клетке (сукцинат, пируват, малат и др.).

# Метаболизм аконитата



Аконитовая кислота является главным компонентом клеточного сока сахарного тростника, кукурузы и некоторых других растений, называемых **«аконитовыми аккумуляторами»**, которые способны накапливать от 1 до 2 % аконитата. Рекордсменом по количеству аконитовой кислоты является *Asarum europeum* (1,5 %).

# Метаболизм аконитата

Долгое время считали, что аконитат накапливается в растениях в **цис-форме**. Главным аргументом служил факт того, что **транс-аконитат** является сильнейшим ингибитором аконитазы.

Информацию о выделении запасного аконитата в транс-форме объявляли артефактом (кипящий спирт). В 1971 году Биверс и Мак-Леннон использовали в экспериментах  **$6\text{C}^{14}$ -аконитат**, который метаболизировался в растительной клетке в цитрат, изоцитрат, аспартат и др.

# Метаболизм аконитата

Был разработан следующий путь утилизации транс-аконитовой кислоты:

Транс-аконитат → цис-аконитат → изоцитрат → ЦТК

Олтекар (1974) выделил фермент **аконитатизомераза** (АИ, КФ 5.3.3.7) из сахарного тростника. На нашей кафедре исследовался фермент АИ из кукурузы и копытня европейского с помощью разработанных методов спектрофотометрического определения активности.



# Методы определения

1. Транс-аконитат  $\xrightarrow{260 \text{ нм}}$  цис-аконитат

2.  $6\text{C}^{14}$ -ТАК  $\rightarrow$   $6\text{C}^{14}$ -ЦАК  $\rightarrow$   $6\text{C}^{14}$ -изоцитрат  $\rightarrow$   
2-оксоглутарат +  $^{14}\text{CO}_2$ .

3. С использованием вспомогательных ферментов.

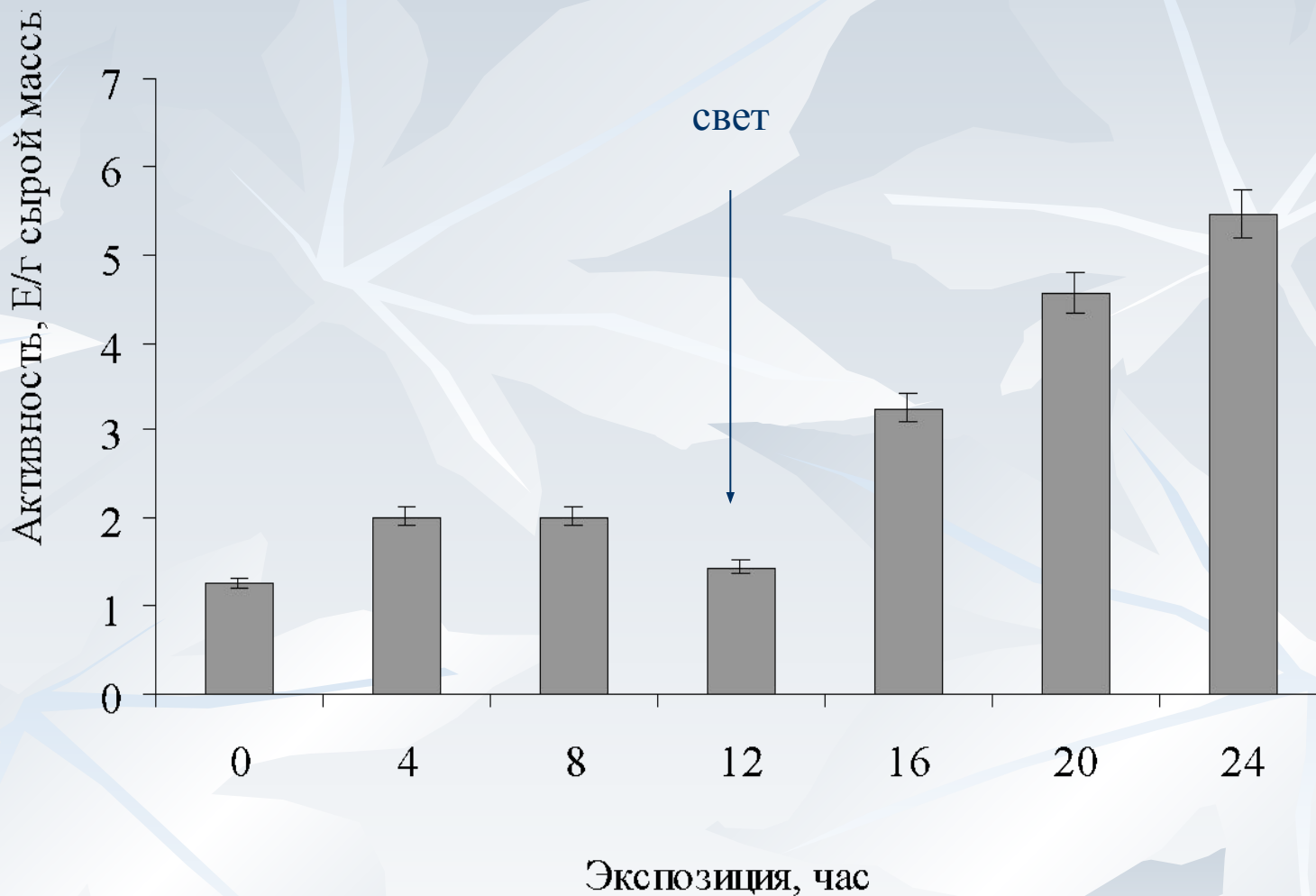
ТАК  $\xrightarrow{\text{АИ}}$  ЦАК  $\xrightarrow{\text{АГ}}$  изоцитрат  $\xrightarrow{\text{ИДГ}}$  2ОГ +  $\text{CO}_2$ .



# Исследование аконитатизомеразы

На нашей кафедре проводятся исследования аспиранткой Добычиной М. и бакалавром Макаревич Я. функционирования аконитатизомеразы (АИ) в листьях кукурузы и пшеницы. На 1 этапе было показано, что активность АИ увеличивается в условиях освещения растительного организма.

Активность АИ на свету выросла почти в 4 раза.



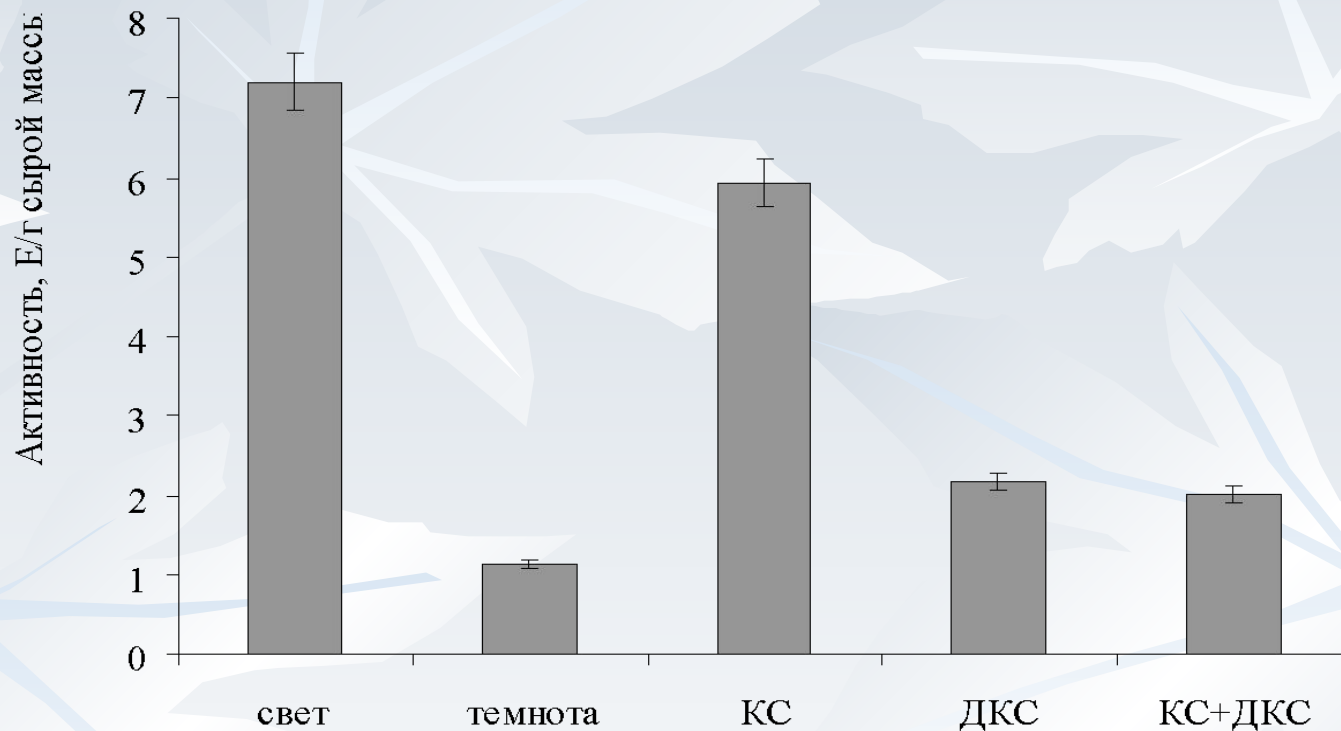
Динамика активности аконитатизомеразы в листьях кукурузы при переходе темнота-свет.

# **Влияние спектрального состава света на активность АИ**

С помощью модели, в которой индукторами красного света являются специфические светодиоды, исследовано влияние действия красного света (660 нм) и дальнего красного (730 нм) на активность аконитатизомеразы в листьях кукурузы. Выбраны длины волн монохроматического света, которые являются индукторами работы фитохромной системы.

# Влияние спектрального состава света на активность АИ

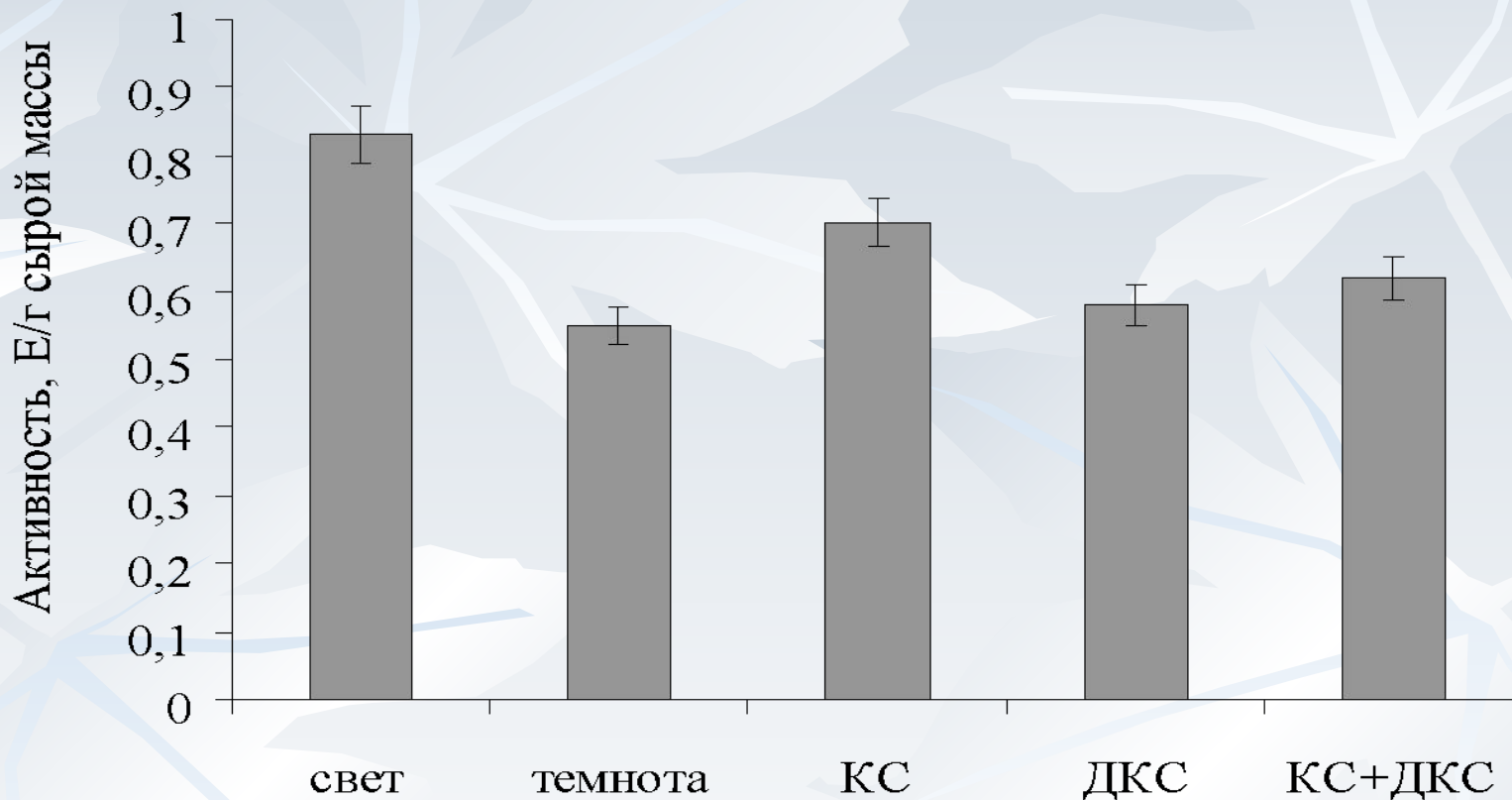
Полученные данные показывают, что на свету и при облучении растений красным светом (660 нм) активность фермента возрастает. При облучении листьев кукурузы дальним красным светом (730 нм) и в темноте активность АИ резко снижается. Делается вывод, что в регуляции активности исследуемого фермента принимает участие фитохромная система (см. учебник Физиология растений).



Активность аконитатизомеразы в листьях кукурузы в условиях различного светового режима. Свет – растения, освещенные белым светом; Тем – растения, выдержанные в темноте; КС – растения, освещенные светом с длиной волны 660 нм; КС+ДКС – растения, последовательно освещенные светом с длиной волны 660 нм и 730 нм.

# Световая регуляция АИ

Известно, что в кукурузе тран-саконитат накапливается в значительных количествах и активность АИ в этом организме значительная. При использовании пшеницы, у которой не обнаружено накопление транс-аконитата активность фермента в несколько раз меньше и при облучении растений лучами разной длины волны не наблюдается индукция активности исследуемого фермента.



Активность аконитатизомеразы в листьях пшеницы в условиях различного светового режима. Свет – растения, освещенные белым светом; Тем – растения, выдержанные в темноте; КС – растения, освещенные светом с длиной волны 660 нм; КС+ДКС – растения, последовательно освещенные светом с длиной волны 660 нм и 730 нм.



# Идентификация гена АИ

Для выяснения экспрессии гена, кодирующего аконитатизомеразу, использовали приемы геномики. Особенность этого исследования связана с поиском гомологичных участков генов из разных организмов. На основе этих гомологичных участков разрабатываются праймеры для идентификации гена АИ. Желтым цветом выделены гомологичные участки, которые используются для разработки праймеров.

```

++..++ ++.++.+.++++.+++.+.+.+++++++ ++.....+.+++. . . .++.
-----
Ustilago (596) -----
Xanthomonas (316) AGTCGGGTGGATTTGGGCAAAATCCTATATCGCCATGGCAGTCAAACAGGGCGCGGCCAAG
Ps.putida (307) AGTCGTGTCGATCTCGGCAAAATCCTATATCGCCATGGCAGTACGCAAAGGTGACCCCAAG
Ps.oryzihabitans (310) AGCCGCGTCGACCTGGGCCAGTCCTTTATCGCCATGGCAGTGCGCCAGGGCGCACCCCAAG
Ps.ssp. VLB120 (310) AGCCGAGTCGACCTGGGCAAGTCTTTTCATTGCCATGGCCGTGCGCAAAGGGCGAACC GAAG
Ps.parafulva (307) AGCCGGGTTCGACCTCGGCGAAATCGTTTCATTGCCATGGCCGTGCGTAAAGGGCGCCCCGAAA
Ps.psychrotolerans (277) AGCCGCGTCGACCTCGGCCAAATCCTTCATCGCCATGGCAGTCCGCCAGGGGGCGCCCAAG
Paucimonas (316) AGCCGCGTGGACCTGGGCAAAATCCTTATATCGCCATGGCCGTGCGCAAAGGGCGAGAGTAAA

```

```

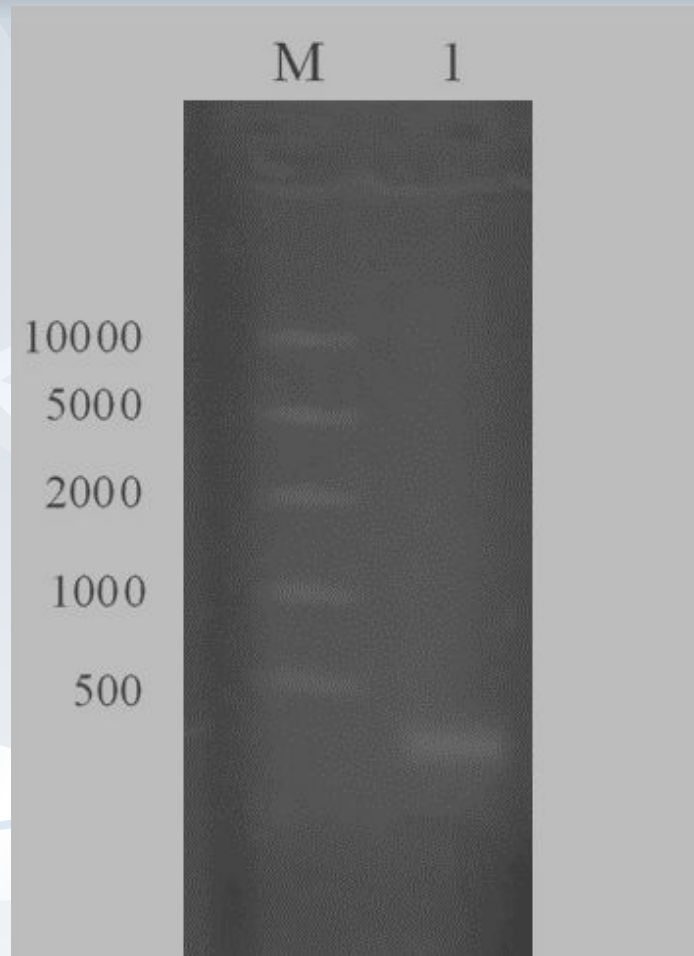
++++.+++++.+++++.+.++.....+++++.+++++.+++++.+.+++.+.+++.+.
GACGTCTCTGGTAGCGTAGTCCCCAAGCTTTTCGCTCATCGGTCCCAGTACAGAGACGACC
Xanthomonas (616) ATCACCATCGTCGGCCTGATTCCCCAGCAGGCGCAGAAAGATGACCCTGTATTCCGGTGCC
Ps.putida (607) ATTGATATCGTTGGCCTGGTTCCAGCGCAGGCACAGAAAGATGACGCTGTATGCCGGCGCT
Ps.oryzihabitans (610) ATCGACATCGTCGGCCTGATCCCCGACCAGGCGCAGAAAGATGACCCTCTACTCCGGCGCC
Ps.ssp. VLB120 (610) ATCGACATCGTTGGCCTGATCCCCGCCCAGGCGCAGAAAATGACAATGTATTCCGGCGCC
Ps.parafulva (607) ATCGATATCGTCGGTCTGATTCCCGACCAGGCGCAGAAAATGACCCTGTATTCTGGCGCA
Ps.psychrotolerans (577) ATCGACATCGTCGGCCTGATTCCCGACCAGGCGCAGAAAGATGACCCTCTACTCCGGCGCC
Paucimonas (616) ATCGATATCGTGGGCCTGATCCCCGACCAGGTTTCAGCAGATGACCCTGTACTCCGGCGCA

```

Сравнение нуклеотидных последовательностей генов аконитатизомеразы из разных организмов. Цветом обозначены участки наибольшей гомологии, используемые для разработки праймеров.

# Идентификация гена АИ

С помощью электрофореза в агарозном геле была осуществлена проверка продукта гена, кодирующего аконитатизомеразу. На слайде видно, что продукт образуется, его размер соответствует теоретически рассчитанному и составляет 429 пар нуклеотидов. Это указывает на наличие гена АИ в исследуемом растительном объекте (в Генбанке информация об этом гене в растениях отсутствует).

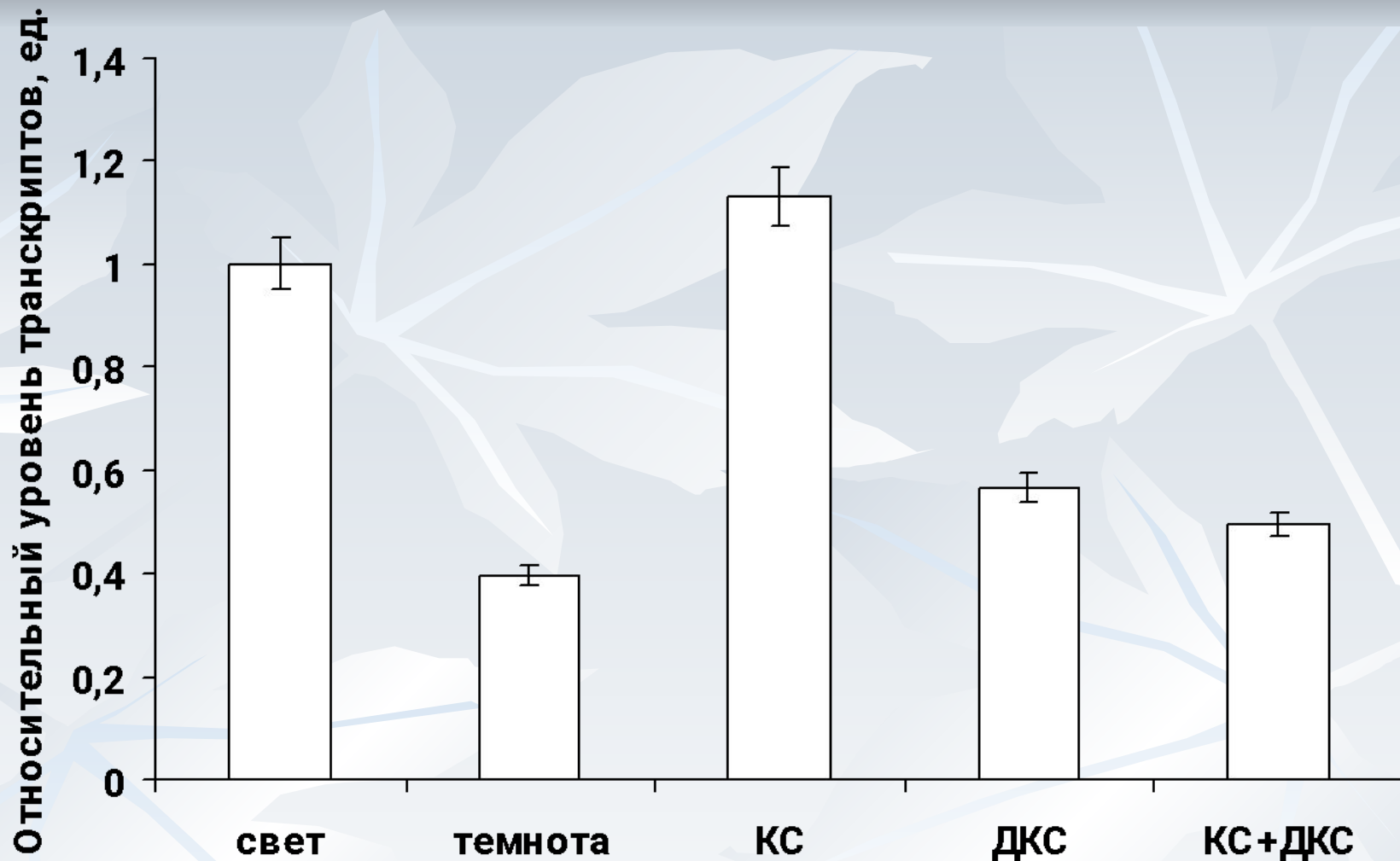


Электрофореграмма в 1-% агарозном геле продуктов амплификации кДНК из листьев кукурузы с праймерами к гену аконитатизомеразы. М – маркеры длин ДНК, п.н. 1 – продукт амплификации.

# Экспрессия гена АИ

Наличие праймера для гена позволило исследовать экспрессию этой структуры в листьях кукурузы при разных условиях освещения. Показано с помощью РТ-ПЦР, что увеличение активности аконитатизомеразы при освещении красным светом (660 нм) и на свету связано с ростом экспрессии исследуемого гена.



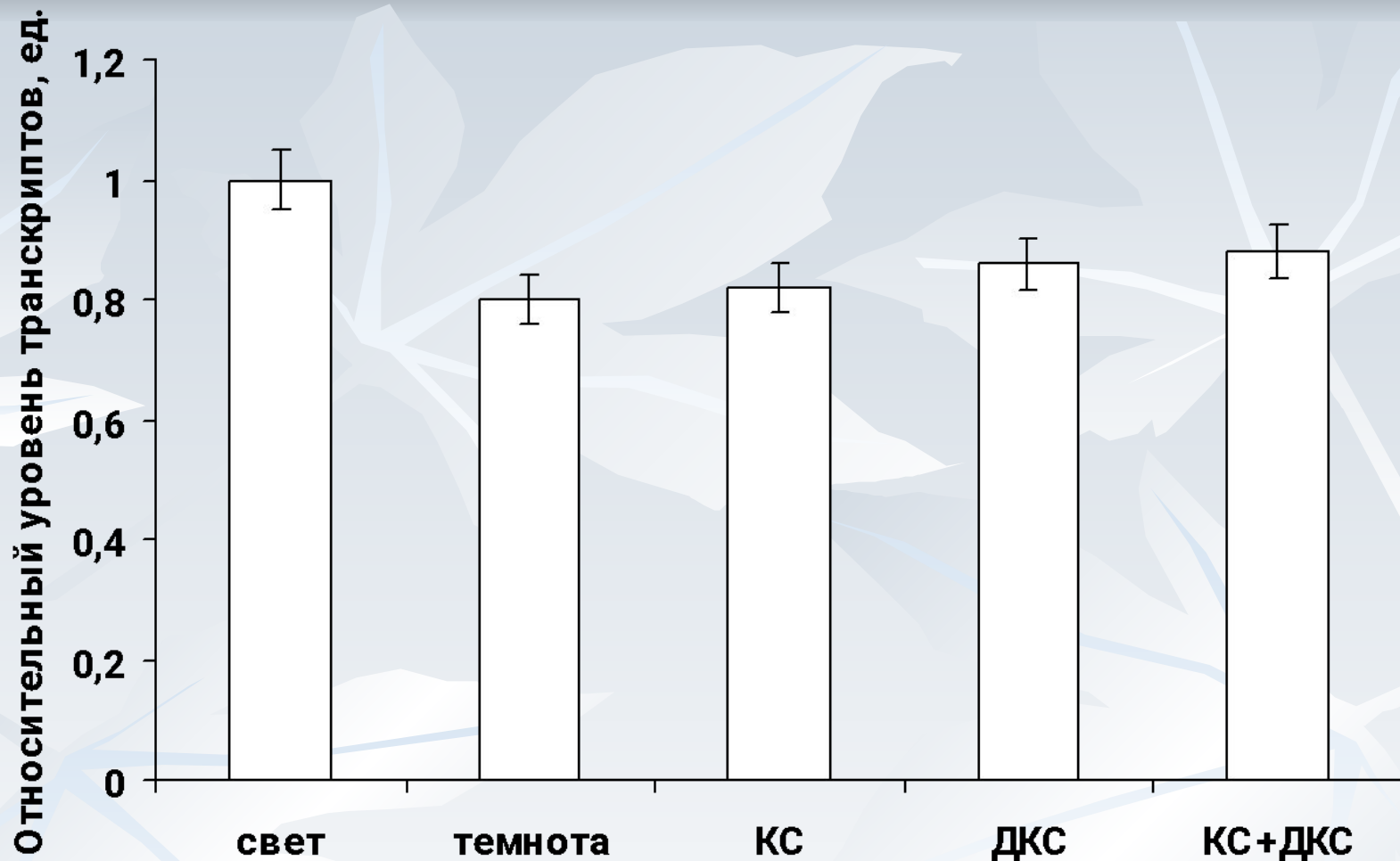


Уровень транскриптов гена *ais* в листьях кукурузы при их облучении светом разной длины волны. Свет – растения, освещенные белым светом; Темнота – растения, выдержанные в темноте; КС – растения, освещенные светом с длиной волны 660 нм; КС+ДКС – растения, последовательно освещенные светом с длиной волны 660 нм и 730 нм

# Светорегуляция аконитатизомеры

Проведенные опыты по влиянию спектрального состава света на экспрессию гена аконитатизомеры продемонстрировали отсутствие корреляции между экспрессией гена и условиями облучения растений (см. рисунок).





Уровень транскриптов гена *ais* в листьях пшеницы при их облучении светом разной длины волны. Свет – растения, освещенные белым светом; Темнота – растения, выдержанные в темноте; КС – растения, освещенные светом с длиной волны 660 нм; КС+ДКС – растения, последовательно освещенные светом с длиной волны 660 нм и 730 нм.

# Заключение

Последняя часть лекционного материала взята из исследовательского «кармана» и кроме объективного интереса может вызвать затруднение как в восприятии, так и в интерпретации. Имейте ввиду, что для будущего вам необходимо пользоваться дополнительной литературой, в частности, учебниками по физиологии растений, биохимии и т.д.

Жду вопросы.