

**КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

Биолого-почвенный факультет
Кафедра генетики

**МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕДОКС-СТАТУСА
КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ**

*Учебно-методическое пособие
к курсам магистратуры «Экологическая генетика»,
«Генетическая токсикология»*

Казань

2011

УДК 577.152.1

*Печатается по решению Редакционно-издательского совета ФГАОУВПО
«Казанский Федеральный (Приволжский) университет»*

методической комиссии биолого-почвенного факультета К(П)ФУ

заседания кафедры генетики К(П)ФУ

Протокол № 1 от 15.09.2011г.

Составители:

м.н.с. лаб. физиологии и генетики культивируемых клеток КИББ КазНЦ РАН Сибгатуллина Г.В., аспирант. лаб. физиологии и генетики культивируемых клеток КИББ КазНЦ РАН Хаертдинова Л.Р., н.с. лаб. физиологии и генетики культивируемых клеток КИББ КазНЦ РАН, к.б.н Гумерова Е.А., н.с. лаб. физиологии и генетики культивируемых клеток КИББ КазНЦ РАН, к.б.н Акулов А.Н., м. н.с. лаб. физиологии и генетики культивируемых клеток КИББ КазНЦ РАН, к.б.н Костюкова Ю.А., аспирант лаб. физиологии и генетики культивируемых клеток КИББ КазНЦ РАН Никонорова Н.А., зав. лаб. физиологии и генетики культивируемых клеток КИББ КазНЦ РАН, к.б.н Румянцева Н.И.

Рецензент:

доцент кафедры физиологии и биотехнологии растений биолого-почвенного факультета К(П)ФУ, к.б.н., Абдрахимова Й.Р.

Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений: учебно-методическое пособие / Сибгатуллина Г.В., Хаертдинова Л.Р., Гумерова Е.А., Акулов А.Н., Костюкова Ю.А., Никонорова Н.А., Румянцева Н.И. – Казань: Казанский (Приволжский) Федеральный университет, 2011. – 61 с.

В пособии описаны методы определения активности основных антиоксидантных ферментов, а также способы их изоферментного анализа. Приведены протоколы определения содержания неферментативных антиоксидантов (глутатиона, аскорбата, фенолов). Описаны методики определения содержания и ультраструктурной локализации пероксида водорода, уровня перекисного окисления липидов, антиоксидантной активности фенолов.

Пособие предназначено для выполнения практических работ по курсам магистратуры «Экологическая генетика», «Генетическая токсикология».

© Казанский (Приволжский) Федеральный университет, 2011

© Сибгатуллина Г.В., Хаертдинова Л.Р., Гумерова Е.А., Акулов А.Н., Костюкова Ю.А., Никонорова Н.А., Румянцева Н.И., 2011

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	5
1.ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ	7
1.1 Определение активности растворимой пероксидазы	7
1.2. Определение активности аскорбатпероксидазы	9
1.3. Определение активности каталазы	12
1.4. Определение активности супероксиддисмутазы	15
1.5. Определение активности глутатионредуктазы	18
1.6. Определение активности глутатионпероксидазы	20
1.7. Определение активности глутатион-S-трансферазы	22
2.ВЫЯВЛЕНИЕ ИЗОФОРМ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ	24
2.1. Подготовка и заливка гелей	24
2.2. Выявление изоферментных спектров каталазы	27
2.3. Выявление изоферментных спектров пероксидазы	28
2.4. Выявление изоферментных спектров супероксиддисмутазы	29
2.5. Выявление изоферментных спектров глутатионредуктазы	31
3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НЕФЕРМЕНТАТИВНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ	33
3.1. Определение содержания глутатиона	33
3.2. Определение суммы растворимых фенольных соединений	36
3.3. Определение антиоксидантной активности фенольных соединений	41
3.4. Определение содержания аскорбиновой кислоты	43
4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНДИКАТОРОВ РАЗВИТИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА	46
4.1. Определение содержания перекиси водорода	46
4.2. Определение уровня перекисного окисления липидов (содержания малонового диальдегида)	48
4.3. Выявление локализации перекиси водорода с помощью хлорида церия	50

5. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ	53
5.1. Определение выхода сухой биомассы	53
5.2. Определение содержания белка	55
5.3. Определение жизнеспособности клеток	57
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	59

ВВЕДЕНИЕ

Образование активных форм кислорода (АФК), таких как перекись водорода, супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$), гидроксильный радикал (OH^{\cdot}) и синглетный кислород (1O_2), происходит в процессе аэробного метаболизма клетки. Окислительный сигнальный каскад запускается в растениях также в ответ на все основные виды стрессоров (чрезмерную или недостаточную освещенность, экстремальную температуру, засуху, засоление, тяжелые металлы, гербициды, ксенобиотики и т.д.). В том случае, если антиоксидантная система клетки не способна эффективно устранять АФК, в клетке развивается окислительный стресс. Будучи высоко реакционноспособными, АФК могут реагировать со всеми макромолекулами (липидами, нуклеиновыми кислотами, белками, полисахаридами), вызывая их повреждения. Изменения в структуре нуклеиновых кислот, не удаленные репарацией, могут реализоваться в виде генных или хромосомных мутаций. Для защиты от повреждающего действия АФК клетки растений используют различные антиоксидантные системы. К ним относятся ферментативные антиоксиданты, такие как аскорбат, глутатион, токоферол, различные фенольные соединения, а также антиоксидантные ферменты, среди которых основными являются каталаза, супероксиддисмутаза и аскорбатпероксидаза. Мониторинг редокс-статуса клеток является важным способом контроля мутагенной активности химических соединений. Культивируемые клетки растений могут быть использованы в качестве модельного объекта для проведения такого тестирования, поскольку выращиваются в контролируемых условиях, и работа с ними не зависит от сезона. Они могут быть размножены в больших количествах и культивироваться как на агаризованных, так и на жидких средах, что облегчает более однородное воздействие исследуемых соединений на все клетки популяции.

В пособии описаны методы определения активности основных антиоксидантных ферментов, а также способы их изоферментного анализа.

Приведены протоколы определения содержания неферментативных антиоксидантов (глутатиона, аскорбата, фенолов). Описаны методики определения содержания и ультраструктурной локализации пероксида водорода, уровня перекисного окисления липидов, антиоксидантной активности фенолов. Пособие может быть использовано для выполнения практических работ по курсам магистратуры «Экологическая генетика», «Генетическая токсикология».

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ

1.1. Определение активности растворимой пероксидазы

Использовали колориметрический метод определения активности пероксидазы по Бояркину (Ермаков и др., 1987). Метод основан на определении скорости реакции окисления бензидина до образования синего продукта его окисления в присутствии перекиси водорода и пероксидазы.

Необходимые реактивы:

1) 0,2 М Na-ацетатный буфер (рН 5,0). Его готовят из следующих концентрированных растворов (сток-растворов):

0,2 М CH_3COOH (2,4 мл CH_3COOH довести до 200 мл дистиллированной водой),

0,2 М CH_3COONa (5,44 г CH_3COONa довести до 200 мл дистиллированной водой).

В определенных случаях критичным является приготовление растворов на сверхчистой (деионизированной, свободной от бактерий и твердых частиц) воде, полученной с помощью системы Milli-Q (“Millipore”, Франция), далее по тексту - *mQ*.

Для приготовления 100 мл раствора 30 мл 0,2 М раствора CH_3COOH и 70 мл 0,2 М раствора CH_3COONa смешать и проверить рН буфера, при несоответствии скорректировать с помощью CH_3COOH и 5% NaOH.

Перед использованием в ацетатный буфер добавить фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) из расчета 20 мкл 100 мМ раствора ФМСФ на 2 мл буфера (34 мг ФМСФ растворить в 2 мл изопропилового спирта).

2) 0,01% раствор солянокислого бензидина (на 10 проб: 5,6 мг бензидина растворить в 1 мл концентрированной уксусной кислоты и довести до 6 мл дистиллированной водой).

3) 0,3% перекись водорода (0,5 мл 3% перекиси довести до 5 мл дистиллированной водой).

Ход работы

Навеску каллусной ткани массой **200-300 мг** растереть в холодной фарфоровой ступке холодным пестиком с **0,5 мл** ацетатного буфера (pH 5,0).

Полученный гомогенат центрифугировать в течение **5 мин** при 12 000 g. Пробы поместить в холодильник при 4 °С.

Реакционная смесь содержит:

0,98 мл 0,2М Na-ацетатного буфера (pH 5,0)

0,5 мл 0,01% раствора солянокислого бензидина

0,02 мл экстракта

0,5 мл 0,3% перекиси водорода

Контрольная кювета содержит:

1,48 мл 0,2 М Na-ацетатного буфера (pH 5,0)

0,5 мл 0,01% раствора солянокислого бензидина

0,02 мл экстракта

Провести измерение оптической плотности при длине волны **590 нм** ежесекундно в течение **120 с**.

Расчёты

Расчет активности пероксидазы в **относительных единицах на один грамм сухого веса** проводится по формуле:

$$A = (\Delta D \cdot V \cdot X) / (T \cdot L \cdot m \cdot \Delta m),$$

где:

A – активность фермента,

ΔD – изменение оптической плотности (вычесть из оптической плотности в конце реакции оптическую плотность в начальный момент времени),

V – общий объём полученной вытяжки, мл

X – конечное разведение вытяжки в кювете (объём реакционной смеси разделить на количество вносимого экстракта),

T – время реакции, с,

L – толщина слоя, см,

m – масса навески, г,

Δm – отношение сухого веса к сырому (см. гл. 5.1.).

Для определения активности фермента на **мг белка** использовали следующую формулу:

$$A = ((\Delta D/T) \cdot X)/(L \cdot C),$$

где:

A – активность фермента,

ΔD – изменение оптической плотности (вычесть из оптической плотности в конце реакции оптическую плотность в начальный момент времени),

X – конечное разведение вытяжки в кювете (объём реакционной смеси разделить на количество вносимого экстракта),

T – время реакции, с,

L – толщина слоя, см,

C – содержание белка в пробе, мг (см. гл. 5.2.).

Измерение активности пероксидазы проводят в нескольких (не менее трёх) биологических и аналитических повторностях. Стандартную ошибку вычисляют в программе Microsoft Office Excel (опция «Описательная статистика»).

1.2. Определение активности аскорбатпероксидазы

Активность аскорбатпероксидазы (EC 1.11.1.7) определяют, как описано Верма и Дубей (Verma, Dubey, 2003). Метод основан на определении скорости разложения перекиси водорода аскорбатпероксидазой исследуемого образца с образованием воды и дегидроаскорбата.

Необходимые реактивы:

1) 50 мМ K₃Na-фосфатный буфер (pH 7,8).

2) 50 мМ K₃Na-фосфатный буфер (pH 7,0).

Оба буфера готовят из сток-растворов:

0,2 М KН₂РО₄ (1,36 г KН₂РО₄ довести до 50 мл дистиллированной водой),

0,2 М NaOH (400 мг NaOH довести до 50 мл дистиллированной водой).

Приготовление 50 мМ K,Na-фосфатного буфера, pH 7,8:

25 мл 0,2 М KH_2PO_4 и 22,25 мл 0,2 М NaOH смешать и довести до 100 мл дистиллированной водой. Проверить pH раствора (если значение не соответствует необходимому, довести pH с помощью концентрированной H_3PO_4 или 5% NaOH).

Приготовление 50 мМ К,Na-фосфатного буфера, pH 7,0:

25 мл 0,2 М KH_2PO_4 и 14,55 мл 0,2 М NaOH смешать и довести до 100 мл дистиллированной водой. Проверить pH раствора (если значение не соответствует необходимому, довести pH с помощью концентрированной H_3PO_4 или 5% NaOH).

3) 5 мМ ЭДТА (20 мг ЭДТА растворить в 10 мл дистиллированной воды).

4) 17 мМ аскорбиновая кислота (30 мг аскорбиновой кислоты растворить в 10 мл дистиллированной воды).

5) 0,06% перекись водорода (200 мкл 3% перекиси водорода добавить к 9,8 мл дистиллированной воды).

б) экстракционный буфер.

Приготовление экстракционного буфера:

25 мг поливинилпирролидона растворить в 2,5 мл 50 мМ К,Na-фосфатного буфера (pH 7,8), добавить 125 мкл 17 мМ раствора аскорбиновой кислоты и 25 мкл 100 мМ раствора фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ) в качестве ингибитора протеиназ.

Ход работы

Навеску каллусной ткани массой 150-200 мг растереть в 300-400 мкл экстракционного буфера в холодной ступке холодным пестиком. Гомогенат центрифугировать в течение 5 минут при 12 000 g, полученный супернатант использовать для анализа. Пробы поместить в холодильник (4 °С).

Реакционная смесь содержит:

2,93 мл 50 мМ К,Na-фосфатного буфера (pH 7,0)

30 мкл 17 мМ раствора аскорбиновой кислоты

30 мкл 5 мМ раствора ЭДТА

10 мкл клеточного экстракта

Реакция запускается внесением в реакционную смесь **30 мкл** 0,06% раствора перекиси водорода.

Контрольная кювета содержит те же реактивы, **НО!** в нее **не вносится** перекись водорода.

Измерение оптической плотности проводят при длине волны **290 нм** ежесекундно в течение 100 с.

Расчёты

Расчет активности аскорбатпероксидазы в **относительных единицах на один грамм сухого веса** проводится по формуле:

$$A = (\Delta D \cdot V \cdot X) / (T \cdot L \cdot m \cdot \Delta m),$$

где:

A – активность фермента,

ΔD – изменение оптической плотности (вычесть из оптической плотности в конце реакции оптическую плотность в начальный момент времени),

V – общий объём полученной вытяжки, мл,

X – конечное разведение вытяжки в кювете (объём реакционной смеси разделить на количество вносимого экстракта),

T – время реакции, с,

L – толщина слоя, см,

m – масса навески, г,

Δm – отношение сухого веса к сырому (см. гл. 5.1.).

Для определения активности фермента на **мг белка** используют следующую формулу:

$$A = ((\Delta D / T) \cdot X) / (L \cdot C)$$

где:

A – активность фермента,

ΔD – изменение оптической плотности (вычесть из оптической плотности в конце реакции оптическую плотность в начальный момент времени),

X – конечное разведение вытяжки в кювете (объём реакционной смеси разделить на количество вносимого экстракта),

T – время реакции, с,

L – толщина слоя, см,

C – содержание белка в пробе, мг (см. гл. 5.2.).

Измерение активности аскорбатпероксидазы проводят в нескольких (не менее трёх) биологических и аналитических повторностях. Стандартную ошибку вычисляют в программе Microsoft Office Excel (опция «Описательная статистика»).

1.3. Определение активности каталазы

Для определения **активности каталазы** (EC 1.11.1.6) используют спектрофотометрический метод, предложенный Эби (Aebi, 1984). Метод основан на определении скорости разложения перекиси водорода каталазой исследуемого образца с образованием воды и кислорода.

Необходимые реактивы:

1) 50 мМ K₂Na-фосфатный буфер (**pH 7,8**).

2) 50 мМ K₂Na-фосфатный буфер (**pH 7,0**).

Буферы готовят из следующих сток-растворов:

0,2 М KH₂PO₄ (1,36 г KH₂PO₄ растворить и довести до 50 мл).

0,2 М NaOH (400 мг NaOH растворить довести до 50 мл).

*Приготовление 50 мМ K,Na-фосфатного буфера, **pH 7,8**:*

25 мл 0,2 М KH₂PO₄ и 22,25 мл 0,2 М NaOH смешать и довести до 100 мл дистиллированной водой. Проверить и скорректировать pH раствора с помощью концентрированной H₃PO₄ или 5% NaOH.

*Приготовление 50 мМ K,Na-фосфатного буфера, **pH 7,0**:*

25 мл 0,2 М KH₂PO₄ и 14,55 мл 0,2 М NaOH смешать и довести до 100 мл дистиллированной водой. Проверить и скорректировать pH раствора.

3) экстракционный буфер (к 2 мл 50 мМ K,Na-фосфатного буфера (pH 7,8) добавить 20 мкл раствора 100 мМ фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ)).

4) 0,6 М перекись водорода (3 мл 3% перекиси водорода довести до 4,5 мл дистиллированной водой).

Ход работы

Навеску каллусной ткани массой 250 мг растереть в охлажденной ступке в 0,5 мл *экстракционного буфера*. Гомогенат центрифугировать в течение 5 мин при 12 000 g. Пробу поместить в холодильник (4 °С).

Реакционная смесь содержит:

2,95 мл 50 mM K₂Na-фосфатного буфера (pH 7,0)

30 мкл экстракта

Реакция запускается внесением в реакционную смесь **20** мкл 0,6 M перекиси водорода.

Контрольная кювета содержит те же реактивы, **НО!** в нее *не вносится* перекись водорода.

Активность каталазы определяют по изменению оптической плотности при длине волны **240** нм ежесекундно в течение 100 с.

Расчёты

Расчет активности каталазы в **относительных единицах на один грамм сухого веса** проводить по формуле:

$$A = (\Delta D \cdot V \cdot X) / (T \cdot L \cdot m \cdot \Delta m),$$

где:

A – активность фермента,

ΔD – изменение оптической плотности (вычесть из оптической плотности в начале реакции оптическую плотность в конечный момент времени),

V – общий объём полученной вытяжки, мл,

X – конечное разведение вытяжки в кювете (объём реакционной смеси разделить на количество вносимого экстракта),

T – время реакции, с,

L – толщина слоя, см,

m – масса навески, г,

Δm – отношение сухого веса к сырому (см. гл. 5.1.).

Для определения активности фермента на **1 мг белка** используют следующую формулу:

$$A = ((\Delta D/T)X)/(L \cdot C)$$

где:

A – активность фермента,

ΔD – изменение оптической плотности (вычесть из оптической плотности в начале реакции оптическую плотность в конечный момент времени),

X – конечное разведение вытяжки в кювете (объём реакционной смеси разделить на количество вносимого экстракта),

T – время реакции, с,

L – толщина слоя, мм,

C – содержание белка в пробе, мг (см. методику по определению содержания белка в пробе).

Возможен еще один вариант расчета активности каталазы в **относительных единицах**, предложенный Мэйл с соавт. (Mehl et al., 2005):

на грамм сухого веса

$$A = (K \cdot X)/(m \cdot \Delta m) \quad (1)$$

или

на мг белка

$$A = (K \cdot X)/C \quad (2),$$

где:

A – активность фермента,

$$K = (2,3/T) \cdot [\log_{10}(A_1/A_2)],$$

где:

T – время реакции, мин,

A₁ – оптическая плотность в начальный момент времени,

A₂ – оптическая плотность в конечный момент времени,

разведение – отношение объема используемого образца к общему объёму реакционной смеси,

m – масса навески, г,

Δm – отношение сухого веса к сырому (см. гл. 5.1.),

C – содержание белка в пробе, мг.

Измерение активности каталазы проводят в нескольких (не менее трёх) биологических и аналитических повторностях. Стандартную ошибку

вычисляют в программе Microsoft Office Excel (опция «Описательная статистика»).

1.4. Определение активности супероксиддисмутазы

Общую активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия (NBT), согласно Гианнополитису и Райсу (Giannopolitis, Ries, 1977) с некоторыми модификациями, как описано Полесской с соавторами (Полесская и др., 2004).

Необходимые реактивы:

1) 50 мМ К,Na-фосфатный буфер (рН 7,8). Для его приготовления необходимо сделать следующие сток-растворы:

0,2 М KH_2PO_4 (1,36 г KH_2PO_4 растворить в дистиллированной воде и довести до 50 мл),

0,2 М NaOH (400 мг NaOH растворить в дистиллированной воде и довести до 50 мл).

Приготовление 50 мМ К,Na-фосфатного буфера, рН 7,8:

25 мл 0,2 М KH_2PO_4 и 22,25 мл 0,2 М NaOH смешать и довести до 100 мл дистиллированной водой. Проверить рН раствора (скорректировать значение с помощью концентрированной H_3PO_4 или 5% NaOH).

2) экстракционный буфер (к 2 мл 50 мМ К,Na-фосфатного буфера (рН 7,8) добавить 20 мкл фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ)).

3) 0,025% раствор рибофлавина (2,5 мг рибофлавина растворить в 10 мл *кипящей* дистиллированной воды).

4) 0,05% раствор п-нитросинего тетразолия (NBT) (5 мг NBT растворить в 10 мл дистиллированной воды).

5) 0,24% раствор Na-ЭДТА (24 мг Na-ЭДТА растворить в 10 мл дистиллированной воды).

Ход работы

Навеску каллусной ткани массой 150-200 мг растереть в охлажденной

ступке в 300-400 мкл *экстракционного буфера*. Гомогенат центрифугировать в течение 5 мин при 12 000g. Пробы хранить в холодильнике при 4 °С.

Реакционная смесь содержит:

0,5 мл 0,05% раствора NBT

0,9 мл 50 мМ К,Na-фосфатного буфера (рН 7,8)

100 мкл экстракта

20 мкл 0,24% раствора Na-ЭДТА

Для каждого образца сделать **2 одинаковые пробирки** с реакционной смесью и экстрактом. Одну пробирку поместить в темноту (шкаф) – **темновой контроль**, другую выставить на свет. Реакционные смеси для света и темноты по своему составу **ничем не отличаются!**

Кроме того, необходимо приготовить **контрольные пробирки без ферментативной вытяжки** – для расчета максимального образования формазана. В эти пробирки вместо экстракта следует внести **100 мкл К,Na-фосфатного буфера**.

Реакция запускается добавлением **20 мкл 0,025%** рибофлавина во все пробирки. Содержимое пробирок быстро перемешать. **Темновые контроли**, включая пробирки для определения максимального образования формазана, поместить в **тёмное место**. **Остальные** пробирки установить под двумя **люминесцентными лампами** (по 18 Вт).

Реакция идёт **15 мин**. По истечении времени реакцию следует остановить выключением света. До определения оптической плотности пробы следует держать в темноте. Оптическую плотность измеряют при длине волны **560 нм**.

Расчёты

За единицу активности СОД принимают количество фермента, способного подавить реакцию восстановления нитросинего тетразолия на 50%. Сначала вычисляется соответствие полученной оптической плотности единице активности. Для этого полученная оптическая плотность максимального образования формазана делится на два и принимается за 50% ингибирования или 0,5 единиц. Расчет производится по формуле:

$$a = 1 - ((D_{\text{образца}} \cdot 0,5) / (D_{\text{формаза́на}} / 2)) \quad (1)$$

Активность СОД рассчитывали по формуле:

$$A = (a \cdot V \cdot X) / (C \cdot L), \quad (2)$$

где:

A – активность фермента,

a – относительная единица активности, см. формулу (1),

V – объём полученной вытяжки, мл,

X – конечное разведение вытяжки в кювете,

L – толщина слоя, мм,

C – количество белка в данной навеске, мг.

Активность СОД выражают в условных единицах на **один мг белка**.

Для расчета активности СОД **на один грамм сухого веса** в формуле (2) **C (количество белка в навеске)** заменяли на **(m·Δm)**, где m – масса сырой навески, Δm - отношение сухого веса к сырому (см. гл. 5.1.).

Расчет активности СОД также можно производить по количественному показателю ингибирования образования **формаза́на**. Для этого используют следующую формулу:

$$\Phi = (\Delta D \cdot X) / (7,2 \cdot C \cdot l),$$

где:

Φ – количество образованного формаза́на, ммоль/мг белка,

ΔD – разность оптической плотности максимального образования формаза́на и оптической плотности образца,

X – разведение в кювете,

7,2 – коэффициент экстинкции формаза́на при длине волны 560 нм, $\text{мм}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$,

C – содержание белка в пробе, мг,

l – длина оптического пути, см.

Измерение активности супероксиддисмута́зы проводят в нескольких (не менее трёх) биологических и аналитических повторностях. Стандартную ошибку вычисляют в программе Microsoft Office Excel (опция «Описательная статистика»).

1.5. Определение активности глутатионредуктазы

Активность фермента определяют согласно методу, описанному Верлан (Верлан, 2008). Глутатионредуктаза катализирует восстановление окисленного глутатиона, используя в качестве восстановительного эквивалента НАДФН. Метод основан на изменении абсорбции раствора при образовании окисленной формы НАДФ⁺.

Необходимые реактивы:

1) экстракционный буфер (680 мг K_2HPO_4 , 4 г ПВП, 3 мг Na-ЭДТА, 280 мкл Тритон X-100 растворить в дистиллированной воде и довести до 100 мл).

Непосредственно перед использованием на каждые 20 мл буфера добавить 4,6 мг аскорбиновой кислоты и 200 мкл 100 мМ раствора фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ) (34 мг ФМСФ растворить в 2 мл изопропилового спирта) (расчёт на 26 проб).

2) буфер измерения, рН **8,0** (6.05 г Трис·HCl (трис(гидроксиметил)аминометан) и 146 мг Na-ЭДТА растворить и довести до объёма 500 мл. Скорректировать значение рН с помощью концентрированной HCl).

3) 0,4% раствор НАДФН (4 мг НАДФН растворить в 1 мл деионизированной воды *mQ*).

4) 3% раствор окисленного глутатиона (15,3 мг окисленного глутатиона растворить в 0,5 мл *mQ*).

Ход работы

К **250 мг** навески добавить **0,75 мл** экстракционного буфера, содержащего 1,3 мМ аскорбиновой кислоты. Растереть в жидком азоте и затем центрифугировать 10 мин при 12 000 g. Пробы до измерения хранить при 4 °С.

Экспериментальная кювета содержит:

1,91 мл буфера измерения,

50 мкл экстракта,

20 мкл 0,4% раствора НАДФН,

Контрольная кювета содержит:

1.93 мл буфера измерения,

50 мкл экстракта,

20 мкл 0,4% раствора НАДФН.

Прямо перед измерением в экспериментальную кювету добавить **20 мкл** 3% раствора окисленного глутатиона и измерять **ежесекундно** в течение **3,5 мин** при длине волны **340 нм**.

Расчёты

Расчет активности глутатионредуктазы в **ммоль в мин на один грамм сухого веса** проводится по формуле:

$$A = (((E1-E2)/(T/60)) \cdot V_{\text{раствора в кювете}} \cdot V_{\text{экстракта}} \cdot X) / (6,22 \cdot m \cdot \Delta m),$$

или ммоль в мин на 1 мг белка по формуле:

$$A = (((E1-E2)/(T/60)) V_{\text{раствора в кювете}} \cdot X) / (6,22 \cdot C),$$

где:

A – активность фермента в ммоль мин⁻¹мг⁻¹ белка (или сухого веса),

E1 – оптическая плотность в начальный момент времени,

E2 – оптическая плотность в конечный момент времени,

X – разведение,

T – время реакции, с,

V_{раствора в кювете} – объём раствора в кювете, мл,

V_{экстракта} – общий объём пробы, мл,

m – масса навески, г,

Δm – отношение сухого веса к сырому (см. гл. 5.1.),

6,22 – коэффициент экстинкции для глутатиона, см⁻¹мМ⁻¹.

Измерение активности фермента проводят в нескольких (не менее трёх) биологических и аналитических повторностях. Стандартную ошибку вычисляют в программе Microsoft Office Excel (опция «Описательная статистика»).

1.6. Определение активности глутатионпероксидазы

Принцип метода: глутатионпероксидаза катализирует реакцию взаимодействия восстановленного глутатиона (GSH) с гидроперекисью трет-бутила (ГПТБ). Активность фермента при этом может быть оценена по изменению содержания GSH в пробах до и после инкубации с субстратом в ходе цветной реакции с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой (ДТНБК) (Paglia, Valentine, 1967).

Необходимые реактивы

1) экстракционный буфер (680 мг K_2HPO_4 , 4 г ПВП, 3 мг Na-ЭДТА, 280 мкл Тритон X-100 растворить в дистиллированной воде и довести до 100 мл).

Непосредственно перед использованием в буфер добавляют фенолметилсульфонилфторид (ФМСФ) из расчета 200 мкл 100 мМ раствора ФМСФ на 20 мл буфера (34 мг ФМСФ растворить в 2 мл изопропилового спирта).

2) 0,1 М Трис·HCl-буфер, **pH 8,5** (1,211 г Трис·HCl (трис(гидрокси-метил)аминометан) растворить в 90 мл дистиллированной воды, довести объём до 100 мл). Довести pH раствора до 8,5 с помощью концентрированной HCl.

3) «сложный» буфер (в 10 мл 0,1 М Трис·HCl-буфера (pH 8,5) растворить 22 мг Na-ЭДТА и добавить 100 мкл 100 мМ ФМСФ).

4) 4,8 мМ раствор GSH (15 мг GSH растворить в 10 мл «сложного» буфера).

5) 0,14% раствор ГПТБ (2 мкл 80% ГПТБ растворить в 1,14 мл дистиллированной воды).

6) 20% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ) (2 г ТХУ растворить в 100 мл дистиллированной воды).

Ход работы

Навеску каллусной ткани массой **250 мг** растереть холодным пестиком в холодной ступке в **0,5 мл** экстракционного буфера. Далее центрифугировать 10 мин при 12 500 g. Супернатант использовать для анализа.

0,2 мл экстракта смешать с **0,73 мл** «сложного» буфера и термостатировать 10 мин при **37 °C** на водяной бане. По истечении времени

достать пробы из бани.

В **контрольный** вариант добавить **0,2** мл ТХУ и **0,07** мл ГПТБ.

В **опытный** вариант добавить только **0,07** мл ГПТБ. **Быстро** поместить пробы обратно на **водяную баню** и инкубировать при **37 °С**. Через **5 мин** **строго по секундомеру(!)** реакцию остановить добавлением **0,2** мл 20% раствора ТХУ в **опытную** пробирку.

Все пробы центрифугировать 7 мин при 12 500 g.

Далее в полученных пробах определяли содержание GSH (см. методику определения содержания глутатиона).

Расчёты

Расчет активности глутатионпероксидазы в **ммоль в мин на один мг белка** проводится по формуле:

$$A = ((\Delta K/T) \cdot X_1 \cdot X_2) / (13,6 \cdot C \cdot L),$$

где:

A – активность фермента в ммоль мин⁻¹мг⁻¹ белка,

ΔK – разность оптической плотности контроля и опыта,

T – время реакции, мин,

X₁ – разведение образца, добавляемого в реакцию (общий объём реакционной смеси разделить на количество образца),

X₂ – разведение образца, взятого для определения количества GSH,

13,6 – коэффициент экстинкции окрашенного аниона, образующегося при взаимодействии GSH с ДТНБК при 340 нм, мм⁻¹см⁻¹,

C – содержание белка в пробе, мг,

L – длина оптического пути, см.

Измерение активности фермента проводят в нескольких (не менее трёх) биологических и аналитических повторностях. Стандартную ошибку вычисляют в программе Microsoft Office Excel (опция «Описательная статистика»).

1.7. Определение активности глутатион-S-трансферазы

Активность глутатион-S-трансферазы определяют по скорости образования глутатион-S-конъюгатов между восстановленным глутатионом (GSH) и 1-хлор-2,4-динитробензолом (ХДНБ) (Habig et al., 1974).

Необходимые реактивы

1) 0,1М К,Na-фосфатный буфер, pH 6,5 (0,68 г KH_2PO_4 и 0,046 г NaOH растворить в 50 мл дистиллированной воды и скорректировать pH раствора до нужного значения с помощью концентрированной H_3PO_4 или 5% раствором NaOH).

2) экстракционный буфер (680 мг K_2HPO_4 , 4 г ПВП, 3 мг Na-ЭДТА, 280 мкл Тритон X-100 растворить в дистиллированной воде и довести до 100 мл).

Непосредственно перед использованием в буфер добавить фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) из расчёта 200 мкл 100 мМ раствора ФМСФ на 20 мл буфера (34 мг ФМСФ растворить в 2 мл изопропилового спирта).

3) 0,015 М раствор GSH (23 мг GSH растворить в 5 мл деионизированной дистиллированной воды).

4) 0,015 М раствор ХДНБ (15 мг ХДНБ растворить в 5 мл 80% метанола).

Ход работы

Навеску каллусной ткани массой **350 мг** растереть холодным пестиком в холодной ступке в 0,7 мл экстракционного буфера. Далее центрифугировать 5 мин при 12 000 g. Супернатант использовать для анализа.

Реакционная смесь содержит:

2,5 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера (pH 6,5)

0,2 мл 0,015 М раствора GSH

0,1 мл супернатанта.

Реакцию инициируют внесением в кювету **0,2 мл** 0,015 М ХДНБ.

Параллельно опытной пробе готовят **контрольную** пробу, в которую вносят все выше перечисленные реагенты, кроме ХДНБ.

Увеличение концентрации конъюгатов в ходе реакции регистрируют

спектрофотометрически при длине волны **340 нм** (максимум поглощения глутатион-S-ХДНБ) при $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ежесекундно в течение **1,5 минут**.

Расчёты

Активность фермента рассчитывают, используя коэффициент экстинкции для GS-ХДНБ при длине волны 340 нм, равный $9,6\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, и выражают в ммоль образующихся глутатион S-конъюгатов в минуту на **мг белка** или **г сух веса**.

Расчет активности глутатион-S-трансферазы в **ммоль в мин на один мг белка** проводится по формуле:

$$A = ((\Delta D/T) \cdot V_{\text{реакц. смеси}} \cdot X) / (e \cdot V_{\text{проб}} \cdot C \cdot L),$$

где:

A – активность фермента, ммоль мин⁻¹ мг⁻¹ белка,

D – изменение оптической плотности (разность оптической плотности в начальный и конечный момент времени),

T – время реакции, мин,

X – разведение используемого объёма вытяжки в реакционной смеси,

e – коэффициент молярной экстинкции при 340 нм ($9,6\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$),

C – содержание белка в пробе, мг,

V_{пробы} – объём пробы, используемый для определения активности GST, мл,

V_{реакц. смеси} – объём реакционной смеси в кювете, мл,

L – длина оптического пути, см (в нашем случае L=1 см).

Измерение активности фермента проводят в нескольких (не менее трёх) биологических и аналитических повторностях. Стандартную ошибку вычисляют в программе Microsoft Office Excel (опция «Описательная статистика»).

2. ВЫЯВЛЕНИЕ ИЗОФОРМ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ

2.1. Подготовка и заливка гелей

Необходимые реактивы:

Важно: все растворы для электрофореза готовят на деионизированной воде *mQ*.

1) 1,5 М буфер для нижнего (разделяющего) геля, **pH 8,8-8,9** (18,2 г Трис·HCl (трис(гидроксиметил)аминометан) растворить в 100 мл воды, довести pH с помощью HCl).

2) 1,25 М буфер для верхнего (концентрирующего) геля, **pH 6,8** (15,1 г Трис растворить в 100 мл воды, довести pH).

3) буфер для проведения электрофореза (электродный, $\times 10$), **pH 8,2-8,3**:

В 1 л воды растворить: 6 г Трис, 28,8 г глицина, 2 г додецилсульфата натрия (ДСН). Довести pH раствора. При использовании буфер разводится из расчёта: **1 часть буфера на 9 частей воды**.

4) 10% персульфат аммония (ПСА), катализатор полимеризации (100 мг ПСА растворить в 1 мл воды. Хранить готовый раствор в холодильнике не более недели).

5) **30% сток-раствор акриламида-бисакриламида** (29 г акриламида (для электрофореза) и 1 г метиленбисакриламида растворить в воде и затем довести водой до 100 мл).

6) 0,65 М буфер для солюбилизации и инкубации белковых проб:

а) для неденатурирующих условий: 0,785 г Трис, 3 мл 30% глицерина, 2,5 мг бромфенолового синего растворить в воде и довести до 10 мл;

б) для денатурирующих условий: 0,785 г Трис, 3 мл 30% глицерина, 2,5 мг бромфенолового синего и 1 г ДСН растворить в воде и довести до 10 мл.

Перед использованием оба концентрированных раствора следует развести в 5 раз, добавить 2 мг дитиотреитола (ДТТ) на 1 мл буфера или 1 мкл 1 М раствора ДТТ на 1 мл буфера.

7) Трис-глициновый буфер для электрофореза, **pH 8,3** (0,6 г Трис и 2,34 г глицина растворить в 1 л воды).

Ход работы

Приготовление сток-раствора для заливки пробки:

Смешать 3 мл 30% акриламида-бисакриламида, 1,5 мл 1,5 М буфера для разделяющего геля, 1,5 мл воды. Для заливки пробки при использовании стекла размером **10×8 см и толщиной 1 мм** взять 1 мл сток-раствора. Непосредственно **перед заливкой** добавить 25 мкл ПСА и 5 мкл ТЕМЕД (тетраметилэтилендиамин).

Приготовление сток-раствора для концентрирующего геля (5%):

Смешать 0,63 мл 1,25 М буфера для концентрирующего геля, 0,83 мл 30% сток-раствора акриламида-бисакриламида и 3,42 мл воды. Для заливки концентрирующего геля при использовании **стекла размером 10×8 см и толщиной 1 мм** взять 2 мл сток-раствора. Непосредственно **перед заливкой** добавить 20 мкл ПСА и 3 мкл ТЕМЕД.

Приготовление разделяющего геля:

10% гель

Смешать 5 мл 1,5 М буфера для разделяющего геля, 6,6 мл 30% сток-раствора акриламида-бисакриламида и 8,1 мл воды. Непосредственно **перед заливкой** добавить на **8 мл** раствора 80 мкл ПСА и 8 мкл ТЕМЕД.

8% гель

Смешать 3 мл 1,5 М буфера для разделяющего геля, 6 мл 30% сток-раствора акриламида-бисакриламида и 15 мл воды. Непосредственно **перед заливкой** добавить на **8 мл** раствора 80 мкл ПСА и 8 мкл ТЕМЕД.

7% гель

Смешать 2 мл 1,5 М буфера для разделяющего геля, 4 мл 30% сток-раствора акриламида-бисакриламида и 10 мл воды. Непосредственно **перед заливкой** добавить на **8 мл** раствора 80 мкл ПСА и 8 мкл ТЕМЕД.

Растворы для приготовления гелей без ПСА и ТЕМЕД можно хранить в холодильнике 2-3 недели.

Заливка геля

- Вымыть камеры детергентом, хорошо сполоснуть, высушить;

- Собрать камеру для проведения гелеэлектрофореза;
- Добавить к нужному количеству раствора для пробки необходимое количество ПСА и ТЕМЕД;
- Немедленно залить пробку;
- После окончания полимеризации пробки добавить в раствор для нижнего (разделяющего) геля ПСА и ТЕМЕД;
- Немедленно залить нижний (разделяющий) гель;
- Наслоить сверху безводным н-бутанолом (1-2 мм);
- После завершения полимеризации отобрать н-бутанол тонкой пипеткой, 2-3 раза хорошо сполоснуть получившийся карман дистиллированной водой до удаления запаха спирта, удалить остатки воды фильтровальной бумагой, не касаясь геля;
- Вставить (не до конца!!!) гребенку между стеклами (до дна кармана должно остаться 0,5-1 см);
- Добавить в раствор для верхнего (концентрирующего) геля ПСА и ТЕМЕД;
- Залить верхний (концентрирующий) гель;
- После полимеризации установить верхнюю камеру в поддон, залить разбавленный буфер для проведения гелеэлектрофореза, вытащить гребенку;
- Немедленно промыть лунки шприцом, поправить изогнувшиеся перегородки между карманами (можно иглой шприца);
- Внести в карманы необходимое количество проб;
- Подсоединить камеру к источнику тока.
- При разделении в концентрирующем геле задать напряжение 50 вольт, в разрешающем – 100 вольт.

2.2. Выявление изоферментных спектров каталазы

Для выявления изоформ каталазы в полиакриламидном геле использовали модифицированный метод Вудбери с соавт. (Woodbury et al., 1983), описанный Бакаловой с соавт. (Bakalova et al., 2004). Изоформы каталазы наблюдают в виде неокрашенных участков на фоне интенсивной сине-зеленой окраски геля. Сине-зеленая окраска геля обеспечивается образованием берлинской лазури при реакции ферроцианида калия (II) с хлоридом железа (III) в присутствии перекиси водорода. Отсутствие окрашивания наблюдается в тех участках геля, где каталаза разрушает перекись водорода.

Необходимые реактивы:

Важно: *все растворы для электрофореза готовят на деионизированной воде тQ.*

1) 0,1 М натрий-фосфатный буфер **pH 8,0** (3,4 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 82,5 мг $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ растворить в 100 мл воды. Довести pH, если это необходимо).

2) Трис-глициновый буфер, **pH 8,3** (0,6 г Трис·HCl (трис(гидроксиметил)-аминометан), 2,34 г глицина, 0,1 г борной кислоты растворить в 1 л воды).

3) *окрашивающие растворы:*

А) 100 мг $\text{K}_3[\text{FeCN}]$ растворить в 10 мл натрий-фосфатного буфера (pH 8,0);

Б) 100 мкл перекиси водорода (3%) добавить к 9,9 мл 10 мл Na-фосфатного буфера (pH 8,0);

В) 100 мг FeCl_3 растворить в 10 мл Na-фосфатного буфера (pH 8,0).

Ход работы

Пробы для электрофореза готовят так же, как описано в методе, предложенном для определения активности каталазы (см. раздел 1.3). Обязательно определяют содержание белка в пробе (см. гл. 5.2.). Для проведения электрофореза пробы выравнивают по содержанию белка (обычно около 15 мкг).

Электрофорез проводят в 7-8% полиакриламидном геле в неденатурирующих условиях согласно методике Лэммли (Laemmli, 1970), исключая додецилсульфат натрия (ДСН) из всех растворов. Разделение

проводят, выставляя напряжение из расчета 2 В/см^2 , при этом разделение продолжают спустя 2 часа после того, как лидирующий краситель полностью вышел из разделяющего геля.

После этого гель помещают в раствор ферроцианида калия (окрашивающий раствор **A**) с добавлением перекиси водорода (окрашивающий раствор **B**) и оставляют на 20 мин. на шейкере. Затем раствор удаляют, и гель промывают дистиллированной водой 1 раз. Далее гель помещают в раствор хлорида железа (окрашивающий раствор **B**) и интенсивно покачивают. Происходит изменение окраски геля с жёлтого на тёмно-зелёный, при этом изоформы каталазы выявляются в виде ярко-жёлтых полос. При появлении окраски гель переносят в дистиллированную воду и быстро фотографируют или сканируют.

2.3. Выявление изоферментных спектров пероксидазы

Выявление изоферментов пероксидазы проводится, как описано Ермаковым с соавторами (Ермаков и др., 1987). Визуализация изоформ происходит в виде синих полос на прозрачном геле. Появление полос обусловлено образованием окрашенного продукта реакции в месте окисления бензидина в присутствии пероксидазы.

Необходимые реактивы:

Важно: *все растворы для электрофореза готовят на деионизированной воде mQ .*

- 1) 0,5% уксусная кислота (1 мл ледяной уксусной кислоты довести водой до 50 мл).
- 2) Трис-глициновый буфер, **pH 8,3** (0,6 г Трис·HCl (трис(гидроксиметил)-аминометан); 2,34 г глицина, 0,1 г борной кислоты растворить в 1 л воды).
- 3) бензидиновый реагент (125 мг основного или солянокислого бензидина растворить в 1 мл ледяной уксусной кислоты и после полного растворения довести объём водой до 50 мл).
- 4) 0,1 % раствор перекиси водорода (0,5 мл 3% перекиси водорода добавить к

14,5 мл воды).

Ход работы

Пробы для электрофореза готовят так же, как описано в методе, предложенном для определения активности растворимой пероксидазы (см. раздел 1.1). Обязательно определяют содержание белка в пробе. Для проведения электрофореза пробы выравнивают по содержанию белка (обычно около 10 мкг).

Электрофорез проводят в 10% полиакриламидном геле в неденатурирующих условиях согласно методике Лэммли (Laemmli, 1970), исключая ДСН из всех растворов. Разделение проводят, выставив напряжение из расчета 2 В/см^2 . В качестве электродного буфера используют Трис-глициновый буфер (рН 8,3) с добавлением борной кислоты в концентрации 0,1%.

После проведения электрофореза гель помещают в раствор 0,5% уксусной кислоты. Через 5-10 минут, слив уксусную кислоту, гель заливают свежеприготовленным бензидиновым реагентом и оставляют на шейкере на 20 минут.

Затем бензидиновый реагент удаляют, и гель 1 раз споласкивают 0,5% раствором уксусной кислоты.

После этого гель заливают 0,1% раствором перекиси водорода и наблюдают появление синих полос изоформ пероксидазы.

При появлении окраски гель фотографируют или сканируют.

2.4. Выявление изоферментных спектров супероксиддисмутазы

Выявление изоформ супероксиддисмутазы в полиакриламидном геле проводят согласно методу, предложенному Бошаном и Фридовичем (Beauchamp, Fridovich, 1971) с модификациями. Изоформы супероксиддисмутазы выявляются в виде светлых полос на фиолетовом фоне. Окрашивание геля в фиолетовый цвет обусловлено фотоиндуцированным свободно-радикальным окислением нитросинего тетразолия. Отсутствие

окрашивания геля говорит об отсутствии свободных радикалов, устранение которых происходит за счет активности супероксиддисмутазы.

Необходимые реактивы:

Важно: все растворы для электрофореза готовят на деионизированной воде тQ.

1) 50 мМ К,Na-фосфатный буфер, **pH 7,8**. Для приготовления К,Na-фосфатного буфера необходимо приготовить следующие сток-растворы:

0,2 М KH_2PO_4 (1,36 г KH_2PO_4 довести до 50 мл водой),

0,2 М NaOH (400 мг NaOH довести до 50 мл водой).

Приготовление 50 мМ К,Na-фосфатного буфера, pH 7,8:

25 мл 0,2 М KH_2PO_4 и 22,25 мл 0,2 М NaOH смешать и довести до 100 мл водой. Проверить pH раствора, и, если необходимо, скорректировать с помощью концентрированной H_3PO_4 или 5% NaOH).

2) Трис-глициновый буфер, **pH 8,3** (0,6 г Трис·HCl (трис(гидроксиметил)-аминометан); 2,34 г глицина, 0,1 г борной кислоты растворить в 1 л воды).

3) окрашивающий раствор (45 мг ЭДТА-Na и 1 мг рибофлавина растворить в 40 мл 50 мМ К,Na-фосфатного буфера (pH 7,8). Непосредственно перед загрузкой геля добавить 4 мг нитросинего тетразолия

Ход работы

Приготовление проб для визуализации изоформ СОД проводят так же, как это описано в разделе 1.4 (определение активности СОД). Обязательно определяют содержание белка в пробе (см. гл. 5.2.). Для проведения электрофореза пробы выравнивают по содержанию белка (обычно около 20 мкг).

Разделение белков проводят в 10% полиакриламидном геле в электродном Трис-глициновом буфере без додецилсульфата натрия (ДСН) по методу Лэммли (Laemmli, 1970). Разделение проводят при 4 °С, останавливая процесс разделения сразу после того, как лидирующий краситель полностью выйдет из разделяющего геля и пробки.

После электрофореза гель помещают в окрашивающий раствор и

инкубируют 20 мин в темноте при комнатной температуре.

Затем гель переносят в чистую прозрачную емкость и облучают двумя 18В люминесцентными лампами дневного света до появления нужной чёткости и интенсивности окрашивания. При этом происходит изменение окраски геля от светло-жёлтой до фиолетовой. Изоформы супероксиддисмутазы проявляются в виде светлых неокрашенных полос. Реакция останавливается выключением света. Гель быстро фотографируют или сканируют.

2.5. Выявление изоферментных спектров глутатионредуктазы

Спектр изоферментов глутатионредуктазы визуализируют согласно модифицированному методу Рао с соавторами (Rao et al., 1996). Выявление изоформ происходит в результате реакции глутатиона, восстановленного глутатионредуктазой, с 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолием бромидом (МТТ) и 2,6-дихлорофенолиндофенолом (DCIP, или реактив Тиллманна).

Необходимые реактивы:

Важно: все растворы для электрофореза готовят на деионизированной воде *mQ*.

- 1) 50 мМ К₂Na-фосфатный буфер, **pH 7,8**. Буфер готовят из сток-растворов:
0,2 М КН₂РО₄ (1,36 г КН₂РО₄ растворить и довести до 50 мл водой),
0,2 М NaOH (400 мг NaOH растворить и довести до 50 мл водой).

Приготовление 50 мМ К,Na-фосфатного буфера, pH 7,8:

25 мл 0,2 М КН₂РО₄ и 22,25 мл 0,2 М NaOH смешать и довести до 100 мл дистиллированной водой. Проверить pH раствора и скорректировать с помощью концентрированной Н₃РО₄ или 5% NaOH.

- 2) Трис-глициновый буфер, **pH 8,3** (0,6 г Трис·HCl (трис(гидроксиметил)-аминометан); 2,34 г глицина, 0,1 г борной кислоты растворить в 1 л воды).

- 3) Окрашивающий раствор: 20 мг ЭДТА-Na, 4,2 мг окисленного глутатиона, 8,4 мг НАДФН растворить в 20 мл 50 мМ К,Na-фосфатного буфера (pH 7,8) и добавить предварительно растворенные в минимальном объёме того же буфера

20 мг 2,6-дихлорофенолиндофенол (DCIP) и 20 мг 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2-тетразолиум бромид (МТТ).

Ход работы

Экстрагирование проб для визуализации изоформ глутатионредуктазы проводят так же, как в методике определения активности глутатионредуктазы (см. раздел 1.5.). Обязательно определяют содержание белка в пробе (см. гл. 5.2.). Для проведения электрофореза пробы выравнивают по содержанию белка (обычно около 20 мкг).

Электрофорез проводят в 10% полиакриламидном геле в неденатурирующих условиях согласно методике Лэммли (Laemmli, 1970), исключая додецилсульфата натрия (ДСН) из всех растворов. Разделение проводят, выставляя напряжение из расчета 2 В/см^2 геля, при $4 \text{ }^\circ\text{C}$, в качестве электродного буфера используют Трис-глициновый буфер (pH 8,3).

После электрофореза гель инкубируют в окрашивающем растворе при покачивании в темноте до появления темно-фиолетовых полос. Гель фотографируют или сканируют.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НЕФЕРМЕНТАТИВНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ

3.1. Определение содержания глутатиона

Определение общего содержания глутатиона, а также восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) форм глутатиона, проводят спектрофотометрически согласно методу, предложенному Зангом и Кирхамом (Zang, Kirkham, 1996). Содержание общего глутатиона в пробах оценивается в ходе цветной реакции при образовании комплекса 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой (ДТНБК) и GSH. Для оценивания содержания GSSG применяется 2-винилпиридин, который связывается с GSH.

Необходимые реактивы:

1) 5% сульфосалициловая кислота (1 г сульфосалициловой кислоты растворить в 20 мл деионизированной воды).

2) 0,5 М натрий-фосфатный буфер (рН 7,5) готовят, используя следующие stock-растворы:

1,55 г NaH_2PO_4 растворить в 50 мл дистиллированной воды,

0,7 г Na_2HPO_4 растворить в 10 мл дистиллированной водой.

Для приготовления 100 мл буфера соответствующие количества stock-растворов (40,5 мл NaH_2PO_4 и 8 мл Na_2HPO_4) смешать и довести до 100 мл дистиллированной водой. Проверить и при необходимости скорректировать рН с помощью 5% NaOH или концентрированной H_3PO_4).

3) 0,18% раствор Na-ЭДТА (36,8 мг Na-ЭДТА растворить в 20 мл 0,5М натрий-фосфатного буфера).

4) 0,12% раствор 5,5-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) (12 мг 5,5-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) растворить в 10 мл этанола).

5) 0,16% раствор НАДФН (1,6 мг НАДФН растворить в 1 мл деионизированной воды).

Ход работы

Навеску каллусной ткани (250 мг) растереть в 1 мл 5% раствора сульфосалициловой кислоты и центрифугировать 5 мин при 10 000 g.

К **0,25** мл супернатанта добавить **0,375** мл 0,5 М натрий-фосфатного буфера (pH 7,5), после этого добавить **12** мкл дистиллированной воды (эту пробу использовать для определения общего содержания глутатиона)

К **0,25** мл супернатанта добавить **0,375** мл 0,5 М натрий-фосфатного буфера (pH 7,5), после этого **ПОД ТЯГОЙ** в **ПЕРЧАТКАХ** добавить **12** мкл 2-винилпиридина (97% 2-винилпиридин, стабилизированный 0,1% 4-третбутилкатехолом) для маскировки восстановленной формы глутатиона. **Плотно закрыть крышкой** и хорошо **встряхнуть** до **образования эмульсии**, после чего инкубировать при комнатной температуре в темноте **1 ч под тягой**. Этот образец используют для определения содержания GSSG.

Реакционная смесь на 10 образцов содержит:

6 мл 0,18% раствора Na-ЭДТА в фосфатном буфере

1 мл 0,16% раствора НАДФН

2 мл 0,12% раствора 5,5-дитиобис(2-нитробензойной кислоты)

Для проведения реакции **непосредственно перед измерением** в пробирку внести **0,9** мл реакционной смеси, затем добавить:

0,1 мл экстракта

2 мкл глутатион редуктазы.

Контрольная кювета содержит **все** реагенты, **кроме экстракта и фермента глутатионредуктазы**. Готовится **1 раз** для **всех образцов**. Измерение оптической плотности проводят **ежесекундно** в течение **1 мин** при длине волны **412 нм**.

Построение калибровочной кривой

Для построения калибровочной кривой используют сток-растворы GSSG и GSH:

100 мкМ GSH (3 мг GSH растворить в **10** мл mQ)

100 мкМ GSSG (3 мг GSSG растворить в **5** мл mQ).

В реакционную смесь вместо экстракта добавляют глутатион в заданной концентрации:

1 мкМ - **10**мкл из сток-раствора

5 мкМ - **50 мкл** из сток-раствора

10 мкМ - **100 мкл** из сток-раствора

20 мкМ - **200 мкл** из сток-раствора

Далее действуют согласно описанной выше процедуре. По полученным значениям оптической плотности строят калибровочную кривую в координатах оптическая плотность-концентрация глутатиона.

Расчёты

Для вычисления концентрации GSH и GSSG используют калибровочные кривые. Концентрация GSSG определяется по калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям GSSG.

Оптическая плотность для определения содержания GSH рассчитывается как

$$\Delta D = D_{\text{общ}} - D_{\text{GSSG}},$$

где:

ΔD – оптическая плотность для определения содержания GSH,

$D_{\text{общ}}$ – оптическая плотность, полученная при измерении пробы общего содержания глутатиона,

D_{GSSG} – оптическая плотность пробы, в которой измеряют содержание GSSG.

Далее с помощью полученной оптической плотности концентрацию GSH определяют по калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям GSH.

Для расчета GSH и GSSG в пробе используют следующую формулу:

$$K = (A \cdot V \cdot X) / (m \cdot \Delta m),$$

где:

A – концентрация глутатиона, мкмоль/мл,

V – объём экстракта, мл,

X – разведение (если добавлять 100 мкл экстракта при конечном объёме реакционной смеси 1002 мкл, то разведение будет равно 10,02),

m – масса навески, г,

Δm – отношение сухого веса к сырому (см. гл. 5.1.),

K – содержание восстановленной формы глутатиона, мкмоль/ г сух веса.

Измерение активности глутатиона проводят в нескольких (не менее трёх) биологических и аналитических повторностях. Стандартную ошибку вычисляют в программе Microsoft Office Excel (опция «Описательная статистика»).

3.2. Определение суммы растворимых фенольных соединений

Определение содержания растворимых полифенолов проводят по методу Фолина и Чокальтеу (Folin, Ciocalteu, 1927) в модификации Синглтона и Росси (Singleton, Rossi, 1965). Метод основан на реакции фенолов с реактивом Фолина-Чокальтеу. Реактив состоит из солей фосфорновольфрамовой и фосфорномолибденовой кислот. В щелочной среде эти соли при взаимодействии с фенолами и полифенолами восстанавливаются с образованием окрашенных в синий цвет комплексов, содержание которых оценивается спектрофотометрически.

Необходимые реактивы:

- 1) водный раствор Na_2CO_3 , (75 г/л).
- 2) реактив Фолина-Чокальтеу. Развести в дистиллированной воде (обычно 1/10, т.е. 1 мл реактива Фолина-Чокальтеу довести до 10 мл).
- 3) 80% этанол.

Приготовление реактива Фолина-Чокальтеу:

100 г вольфрамата натрия ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25 г молибдата натрия ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и 700 мл дистиллированной воды поместить в круглодонную колбу. Добавить 50 мл фосфорной кислоты (85%) и 100 мл концентрированной соляной кислоты. Присоединить обратный холодильник и осторожно кипятить в течение 10 часов. Затем добавить 150 г сульфата лития (Li_2SO_4), 50 мл воды и несколько капель жидкого брома (Br_2). Убрать дефлегматор и продолжать кипятить ещё 15 мин для удаления излишков брома. Охладить, довести объём до 1 л и профильтровать. Полученный реактив не должен иметь зеленоватой окраски, т.к. это означает наличие в нём продуктов реакции восстановления

голубого цвета. Реактив должен храниться хорошо защищённым от пыли, т.к. органические вещества постепенно его восстанавливают. Добавление сульфата лития обусловлено тем, что он предотвращает выпадение в осадок сложных солей натрия.

Хранить желательно в бутылке тёмного стекла.

Ход работы

Приготовить экстракты для определения суммы фенольных соединений.

Подготовка образцов:

Выделение внутриклеточных фенольных соединений. Биомассу суспензионных или каллусных культур лиофильно высушить и вычислить сухой вес. Сухую ткань растереть, навеску (50 мг) перенести в плотно завинчивающиеся пробирки типа "эппендорф", залить 80% этанолом (1,5 мл) и инкубировать на водяной бане при 80 °С в течение 30 мин. Полученный экстракт осадить при 12 000 g в течение 10 мин. Супернатант слить в пробирку-эппендорф объёмом 2 мл. К осадку добавить 0,5-0,7 мл 80% этанола, взболтать и ещё раз центрифугировать при тех же условиях. Супернатанты объединить, конечный объём довести до 2 мл.

Выделение внеклеточных фенолов. Среду культивирования отфильтровать или центрифугировать 30 мин при 3000 g. Фиксированный объём супернатанта лиофильно высушить. Сухой остаток смыть 80% этанолом (1,5 мл) и экстрагировать на водяной бане при 80 °С в течение 30 минут. Полученный экстракт осадить при 12 000 g в течение 10 мин. Супернатант слить в пробирку-эппендорф объёмом 2 мл. К осадку добавить 0,5-0,7 мл 80% этанола, взболтать и ещё раз центрифугировать при тех же условиях. Супернатанты объединить, конечный объём довести до 2 мл.

Выделение водорастворимых фенольных соединений. Среду культивирования отфильтровать или центрифугировать 30 мин при 3000 g и использовать аналогично спиртовым экстрактам.

Количество 96% этанола для получения необходимого объёма 80% этанола рассчитывается по формуле:

$$V_{96\%} = (V_{80\%} \cdot 80) / 96,$$

где:

$V_{96\%}$ – объём 96% этанола, необходимый для получения нужного объёма 80% этанола,

$V_{80\%}$ – необходимый объём 80% этанола,

Выбор растворителя для экстракции определяется исследователем, исходя из поставленных целей и задач. Следует отметить, что, например, по сравнению с этанолом метанол экстрагирует фенольные соединения в большей степени.

Определение суммы фенольных соединений

Для определения оптической плотности можно использовать разные спектрофотометрические кюветы (стандартные и микро) и, соответственно, готовить разные объёмы реакционной среды:

Реакционная смесь содержит:

<u>для стандартной кюветы</u>	<u>для микрокюветы</u>
0,5 мл экстракта	0,1 мл экстракта
2,5 мл разведенного реактива Фолина-Чокальтеу	0,5 мл разведенного реактива Фолина-Чокальтеу
добавить <u>через 3 мин!</u> 2,0 мл Na₂CO₃ (75 г/л)	добавить <u>через 3 мин!</u> 0,4 мл Na₂CO₃ (75 г/л)

После добавления раствора Na₂CO₃ реакционная смесь в разной степени посинеет.

В контрольные пробирки добавить соответственно по **0,5** или **0,1 мл 80% этанола**. Пробирки с реакционной смесью **хорошо встряхнуть** и оставить на **2 часа**.

Измерение оптической плотности проводить на спектрофотометре при длине волны **765 нм**.

Построение калибровочной кривой

При построении калибровочной кривой используют тот же тип кювет, что и в эксперименте. Приготовить сток-раствор галловой кислоты – 10 мг галловой кислоты растворить в 20 мл 80% этанола.

Пробирки пометить, имея в виду повторности. В пробирки внести определённые объёмы сток-раствора галловой кислоты и добавить 80% этанол в объёмах, необходимых для получения нужной концентрации (см. таблицу).

Концентрация галловой кислоты, мг/л	для стандартной кюветы		для микрокюветы	
	Объём сток-раствора для приготовления пробы, мл	Объём 80% этанола для приготовления пробы, мл	Объём сток-раствора для приготовления пробы, мл	Объём 80% этанола для приготовления пробы, мл
Контроль, 0	0,0	0,5	0,0	0,1
25	0,025	0,475	0,005	0,095
50	0,05	0,45	0,01	0,09
100	0,1	0,4	0,02	0,08
150	0,15	0,35	0,03	0,07
200	0,2	0,3	0,04	0,06
250	0,25	0,25	0,05	0,05

Далее в реакционную смесь добавляют в соответствующих количествах остальные компоненты и проводят измерения, согласно изложенной ранее процедуре.

По полученным данным строят калибровочную кривую в координатах оптическая плотность–концентрация галловой кислоты.

Важно! Работа с малыми объёмами реактивов требует большого внимания и тщательности!

Расчёты

Содержание фенольных соединений в экстракте определить с помощью калибровочной кривой, построенной по галловой кислоте. Содержание

фенольных соединений выражают в мг-экв галловой кислоты.

Далее рассчитать содержание **внутриклеточных** фенольных соединений в образце по формуле:

$$\Phi = (C \cdot V_{\text{экстракта}}) / (m \cdot 1000),$$

где:

Φ – общее содержание **внутриклеточных** фенольных соединений, мг-экв галловой кислоты/г сухого веса,

C – концентрация фенольных соединений, полученная по калибровочной кривой, исходя из оптической плотности образцов, мг-экв галловой кислоты/л,

$V_{\text{экстракта}}$ – общий объём экстракта, мл,

m – масса навески, г,

1000 – коэффициент перевода л в мл (объёма экстракта).

Содержание **внеклеточных** фенольных соединений рассчитывается по формуле:

$$\Phi = (C \cdot V_{\text{экстракта}}) / (m \cdot V_{\text{среды}}),$$

где:

Φ – содержание **внеклеточных** фенольных соединений, мг-экв галловой кислоты/г сухого веса,

C – концентрация фенольных соединений, полученная по калибровочной кривой, исходя из оптической плотности образцов, мг-экв галловой кислоты/л,

$V_{\text{экстракта}}$ – общий объём экстракта, мл,

m – общий сухой вес биомассы, г,

$V_{\text{среды}}$ – объём лиофилизированной среды, мл.

Измерения проводят в нескольких (не менее трёх) биологических и аналитических повторностях. Стандартную ошибку вычисляют в программе Microsoft Office Excel (опция «Описательная статистика»).

3.3. Определение антиоксидантной активности фенольных соединений

Антиоксидантную активность фенолов определяли по модифицированному методу, первоначально разработанному Блуа (Blois, 1958), а затем предложенному Бранд-Вильямсом с сотрудниками (Brand-Williams et al., 1995) для оценки антиоксидантной активности различных соединений и экстрактов. Спектрофотометрический метод основан на использовании свободного стабильного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидрозила (ДФПГ). Суть метода заключается в снижении оптической плотности раствора ДФПГ в присутствии антиоксидантов.

Необходимые реактивы:

- 1) 0,2 мМ раствор ДФПГ ($M_{ДФПГ} = 394,33$) на 80% этаноле. Необходимый объем раствора рассчитывается, принимая во внимание количество проб и построение калибровочной кривой (7 точек).
- 2) **сток-раствор Trolox** (водорастворимый витамин E, $M_{Trolox} = 250,29$) для построения калибровочной кривой (6 мг растворить в 2,4 мл 80% этанола).
- 3) 80% этанол.

Ход работы

Экстракты фенольных соединений получить, как описано в предыдущем разделе «Определение суммы растворимых фенольных соединений».

Реакционная смесь содержит:

0,25 мл фенольного экстракта

1,75 мл 80% этанола

2 мл 0,2 мМ раствора ДФПГ.

В контрольные пробирки вместо фенольного экстракта добавить 80% этанол, т.е. всего 2 мл (0,25 и 1,75). Реакция запускается добавлением раствора ДФПГ.

Пробирки хорошо встряхнуть и оставить на 30 мин в темноте при комнатной температуре. По истечении времени измерить оптическую плотность при длине волны 517 нм.

Построение калибровочной кривой

Калибровочная кривая по Trolox строится заново при каждом измерении оптической плотности.

Приготовить сток-раствор Trolox. Пробирки пометить, имея в виду повторности и контроль.

В пробирки внести определённые объёмы сток-раствора Trolox и добавить 80% этанол в объёмах, необходимых для получения нужной концентрации (см. таблицу).

В контрольные пробирки внести вместо раствора Trolox соответствующий объём 80% этанола. Далее в реакционную смесь добавить по 2 мл 0,2 мМ раствораДФПГ и провести измерения, согласно изложенной ранее процедуре.

Кон-ция р-ра Trolox, мкмоль	Объём сток-р-ра Trolox для приготовления 2 мл р-ра, мкл	Объём 80% этанола для приготовления 2 мл р-ра, мкл
0	0	2000
10	2	1998
25	5	1995
50	10	1990
75	15	1985
100	20	1980
125	25	1975

Расчёты

Рассчитать процент ингибированияДФПГ для построения калибровочной кривой и образцов:

$$\% \text{ ингибированияДФПГ} = 100 \cdot (D_k - D_o) / D_k$$

где:

D_k – оптическая плотность в отсутствии антиоксидантов (контроль);

D_o – оптическая плотность в присутствии антиоксидантов (для калибровочной кривой - Trolox в известных концентрациях).

По полученным данным построить калибровочную кривую в координатах % ингибированияДФП–концентрация Trolox.

По калибровочной кривой определить антиоксидантную активность экстрактов, которая выражается в мкМ-экв Trolox. Пересчитать антиоксидантную активность на содержание фенолов в пробе.

Измерения проводят в нескольких (не менее трёх) биологических и аналитических повторностях. Стандартную ошибку вычисляют в программе Microsoft Office Excel (опция «Описательная статистика»).

3.4. Определение содержания аскорбиновой кислоты

Количественное определение содержания аскорбиновой кислоты в тканях проводили с помощью гексацианоферрата калия (Методы биохимического анализа растений, 1978). В кислой среде аскорбиновая кислота стехиометрически восстанавливает гексацианоферрит калия (Fe^{+3}) до гексацианоферрата калия (Fe^{+2}), который в присутствии ионов трехвалентного железа образует гексацианоферрат железа (берлинская лазурь). При этом если в среде присутствуют ионы фтора, то берлинская лазурь не выпадает в осадок, а получается раствор синего цвета.

Необходимые реактивы:

- 1) 0,1 М цитратный буфер, **pH 3,69** (2,26 г цитрата аммония растворить в 100 мл дистиллированной воды. Довести pH раствора концентрированной HCl).
- 2) 1% раствор $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (100 мг $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ растворить в 10 мл дистиллированной воды).
- 3) 2% раствор NaF (200 мг NaF растворить в 10 мл дистиллированной воды).
- 4) 2% раствор FeCl_3 (200 мг FeCl_3 растворить в 10 мл дистиллированной воды).
- 5) 0,2% раствор аскорбиновой кислоты (4 мг аскорбиновой кислоты растворить в 2 мл дистиллированной воды).

Ход работы

Навеску каллусной ткани массой **500** мг растереть в **1** мл буферного раствора (pH 3,69), перенести в пробирки типа эппендорф, сильно встряхнуть и

центрифугировать 5 мин при 12 500 g. Супернатант (экстракт) использовать для дальнейших измерений.

Реакционная смесь содержит:

500 мкл экстракта (буфера – в качестве контроля)

25 мкл 1% раствора $K_3[Fe(CN)_6]$

25 мкл 2% раствора NaF

1,9 мл дистиллированной воды

50 мкл 2% раствора $FeCl_3$

Примечание: после добавления первых трех компонентов реакционной смеси пробирки встряхнуть и подождать 5 мин. После чего добавить дистиллированную воду и 2% раствор $FeCl_3$. Полученный раствор выдержать 5-7 мин, периодически встряхивая, после чего проводить измерение оптической плотности относительно контрольного раствора (реакционная смесь с буфером вместо экстракта) при красном светофильтре (**680 нм**).

Построение калибровочной кривой

Приготовить **0,2% сток-раствор** аскорбиновой кислоты (4 мг аскорбиновой кислоты растворить в 2 мл дистиллированной воды). Приготовить серию растворов с концентрацией аскорбиновой кислоты от 2 до 60 мкг/мл (см. табл.). Далее к растворам аскорбиновой кислоты с известной

Концентрация аскорбиновой кислоты, мкг/мл	Объём сток-раствора аскорбиновой кислоты, мкл	Объём дистиллированной воды, мкл
2	5	495
4	10	490
6	15	485
12	30	470
24	60	440
36	90	410
48	120	380
60	150	350

концентрацией добавить остальные реактив и проводить измерения, как описано ранее.

По полученным данным строят калибровочную кривую в координатах оптическая плотность–концентрация аскорбиновой кислоты.

Расчёты

Содержание аскорбиновой кислоты в экстракте определить с помощью калибровочной кривой.

Далее рассчитать содержание аскорбиновой кислоты в образце по формуле:

$$C = (K \cdot V \cdot X) / (m \cdot \Delta m \cdot L),$$

где:

C – содержание аскорбиновой кислоты, мкг/г сырого веса,

K – концентрация аскорбиновой кислоты, мкг/мл,

V – общий объём экстракта, мл,

X – разведение экстракта в реакционной смеси (в данном случае в 6 раз),

L – длина оптического пути, см,

m – масса сырой навески, г,

Δm – отношение сухого веса к сырому (см. гл. 5.1.).

Измерения проводят в нескольких (не менее трёх) биологических и аналитических повторностях. Стандартную ошибку вычисляют в программе Microsoft Office Excel (опция «Описательная статистика»).

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНДИКАТОРОВ РАЗВИТИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

4.1. Определение содержания перекиси водорода

Содержание перекиси водорода определяют спектрофотометрически согласно Беллинкампи с соавт. (Bellincampi et al., 2000). Метод основан на окислении ионов железа Fe^{+2} перекисью водорода до ионов железа Fe^{+3} , которые образуют окрашенные соединения с ксиленоловым оранжевым.

Необходимые реактивы

- 1) охлажденный (-18 °С) ацетон, ч.д.а.
- 2) реактив ксиленоловый оранжевый.

Приготовление реактива ксиленолового оранжевого:

260 мкл концентрированной серной кислоты развести в небольшой объеме дистиллированной воды, добавить 9,5 мг соли Мора ($FeSO_4 \cdot (NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$). В другом объеме воды растворить 7,6 мг ксиленолового оранжевого. Оба раствора смешать, при этом окраска изменяется от темно-малиновой до светло-красной или темно-оранжевой. В полученном растворе растворить 1,822 г сорбитола и довести объем до **50 мл**. Реактив оставить на ночь в холодильнике.

Ход работы

200-300 мг каллусной ткани растереть с 1,0-1,5 мл сильно охлажденного ацетона в холодной ступке холодным пестиком. Полученный гомогенат центрифугировать 10 мин при 12 000 g. Супернатант использовать для анализа.

В эппендорфы внести равные объемы полученной вытяжки и реактива ксиленолового оранжевого, обычно берут **0,5 мл** вытяжки и **0,5 мл** реактива ксиленолового оранжевого.

Контрольная проба содержит 0,5 мл чистого ацетона и 0,5 мл реактива ксиленолового оранжевого.

Пробы выдерживают **45 мин** при комнатной температуре.

Прореагировавшую смесь центрифугируют в течение 5 мин при 10 000 g.

Далее проводят измерение оптической плотности при длине волны

560 нм.

Построение калибровочной кривой

Приготовить **сток-раствор** перекиси водорода (1 мкл 3% перекиси разводят в 10 мл ацетона). Затем приготовить растворы перекиси водорода различной концентрации (см. табл.).

Концентрация перекиси водорода, нг/мл	Количество сток-раствора, мкл	Количество растворителя, мкл
1500	500	500
1000	330	670
750	250	750
600	200	800
500	167	833
429	143	857
333	111	889
300	100	900
273	90	910

Далее к растворам перекиси водорода с известной концентрацией добавить реактив ксиленоловый оранжевый и проводить измерения, как описано ранее.

По полученным данным строят калибровочную кривую в координатах оптическая плотность–концентрация перекиси водорода.

Примечание: В случае возникновения затруднений измерения оптической плотности необходимо изменить разведение пробы.

Рекомендуется ознакомиться со статьей Queval с соавт. (2008).

Расчёты

Содержание перекиси водорода определяют по калибровочной кривой, построенной с использованием известных концентраций H_2O_2 , исходя из результатов измерений оптической плотности образцов.

Для расчета содержания перекиси водорода (мкмоль/г сухого веса)

используют формулу:

$$C = ((K \cdot V \cdot X) / (m \cdot \Delta m)) / 880,$$

где:

C – содержание H₂O₂, мкмоль/г сухого веса,

K – концентрация H₂O₂ (определяется по калибровочной кривой), нг/мл,

V – общий объём экстракта, мл,

X – разведение (отношение количества внесенного образца к общему объёму реакционной смеси),

m – масса сырой навески, г,

Δm – отношение сухого веса к сырому (см. гл. 5.1.),

880 – коэффициент перевода нг в мкмоль.

Измерение содержания перекиси водорода проводят в нескольких повторностях (не менее трёх). Стандартную ошибку вычисляют в программе Microsoft Office Excel (опция «Описательная статистика»).

4.2. Определение уровня перекисного окисления липидов (содержания малонового диальдегида)

Об уровне перекисного окисления липидов (ПОЛ) судят по накоплению продукта ПОЛ – малонового диальдегида (МДА). Содержание МДА оценивают по степени накопления продукта его реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) (Kumar, Knowles, 1993).

Необходимые реактивы:

- 1) 20% ТХУ (20 г сухой ТХУ растворить в 100 мл дистиллированной воды).
- 2) 0,5% раствор ТБК (50 мг ТБК растворить в 10 мл 20% ТХУ).

Ход работы

500 мг каллусной ткани растереть с 1 мл 20% ТХУ. Полученный гомогенат центрифугировать в течение 5 мин при 12 000 g. Полученный супернатант использовать в качестве образца для анализа.

В две плотно закрывающиеся пробирки внести по 0,4 мл супернатанта. К одной из проб добавить 0,4 мл 20% ТХУ; в дальнейшем эту пробу использовать

при спектрофотометрических измерениях в качестве **контроля**. К другой пробе добавить 0,4 мл 0,5% раствора ТБК. Пробы инкубировать на кипящей водяной бане (100 °С) в течение **30 мин**, затем охладить при комнатной температуре.

Измерения проводят на спектрофотометре при длине волны **532 нм**, а также при **600 нм** для корректировки неспецифического поглощения (Hodges et al., 1999).

Расчёты

Для вычисления содержания МДА используют коэффициент экстинкции $e = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Расчет производят по формуле:

$$C = ((\Delta D / 155) \cdot X \cdot V) / ((m \cdot \Delta m) \cdot l),$$

где:

C – количество МДА, ммоль/г сухого веса,

ΔD – разность оптической плотности образца при 532 нм и 600 нм,

155 – коэффициент экстинкции МДА при 532 нм, $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$,

X – разведение (общий объём реакционной смеси разделить на количество вносимого образца экстракта),

V – объём вытяжки, мл,

m – масса сырой навески, г,

Δm – отношение сухого веса к сырому (см. гл. 5.1.),

l – длина оптического пути, см.

Измерения проводят в нескольких (не менее трёх) биологических и аналитических повторностях. Стандартную ошибку вычисляют в программе Microsoft Office Excel (опция «Описательная статистика»).

4.3. Выявление локализации перекиси водорода с помощью хлорида церия

Локализацию перекиси водорода в клетке определяют по методике, предложенной Бествик (Bestwick, 1995). Гистохимический метод основан на выявлении темного преципитата пергидроксида церия, образующегося при реакции перекиси водорода и CeCl_3 , на электронно-микроскопических срезах клеток растений.

Необходимые реактивы:

1) 50 мМ какодилатный буфер, **pH 7,2** (21,4 г $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ растворить в 100 мл дистиллированной воды, довести pH раствора концентрированной HCl. Довести объём дистиллированной водой до 200 мл).

2) 50 мМ 3-(N-морфолино)пропансульфоная кислота (МОПС), **pH 7,2** (1,045 г МОПС растворить в 100 мл дистиллированной воды, довести pH концентрированной HCl).

3) 5 мМ CeCl_3 , приготовленный на 50 мМ 3-(N-морфолино) пропансульфоной кислоте (pH 7,2) (растворить 0,227 г CeCl_3 в 100 мл 50 мМ 3-(N-морфолино)пропансульфоной кислоты).

4) 1,25% глутаровый альдегид, приготовленный на какодилатном буфере, **pH 7,2**. При приготовлении следует принимать во внимание исходную концентрацию глутарового альдегида (ГА). При концентрации ГА 2,5% к 0,5 мл ГА необходимо добавить 9,5 мл 50 мМ какодилатного буфера. **Готовить под тягой! Токсичное вещество!**

5) 1% OsO_4 , приготовленный на какодилатном буфере. При приготовлении следует принимать во внимание исходную массу реактива. 1 г OsO_4 растворить в 100 мл какодилатного буфера. Оставить на сутки в холодильнике до полного растворения. При фиксации материала на 1 мл 1% OsO_4 добавить 25 мг сахарозы. **Готовить под тягой! Токсичное вещество!**

б) раствор этанола восходящей концентрации: 30%, 50%, 70%, 96%.

	30% этанол	50% этанол	70% этанол	96% этанол
Этанол, мл	10	16	21	30
Дистиллированная вода, мл	22	14,6	7,8	0

7) 100% ацетон (ч.д.а.)

8) 100% пропилен (ч.д.а.).

9) эпоксидные смолы DDSA, эпон-812, MNA и катализатор DMP-30 («Sigma-Aldrich»).

Приготовление смолы для заливки. В чистую сухую посуду добавить 25 мл эпон-812, 10 мл DDSA, 15 мл MNA и 1мл DMP-30. Перемешивать на мешалке в течение 1-1,5 часов. **Готовить под тягой! Токсичное вещество!**

В процессе заливки образцов используют смесь смол с пропиленом в следующих соотношениях: 1:2, 1:1, 2:1. **Смеси из смолы и пропилена готовят непосредственно перед заливкой!**

10) 0,3% цитрат свинца (Прокипятить 50 мл дистиллированной воды в колбе с плотно закрытой ватной пробкой. Быстро охладить. Добавить 0,15 г цитрата свинца. Интенсивно перемешивать в течение 1 минуты. Добавить 0,5 мл 10 М NaOH. Через сутки при наличии осадка добавлять щелочь по одной капле с помощью пипетки до полного растворения осадка.

11) 2% уранилацетат (0,6 г уранилацетата растворить в 30 мл дистиллированной воды и оставить на 24 часа при температуре 6-8 °С).

Ход работы

Объект поместить в раствор 5 мМ CeCl_3 , приготовленный на 50 мМ 3-(N-морфолино)пропансульфоновой кислоте (рН 7,2), на 1 час.

Аккуратно удалить пипеткой раствор и добавить 1,25% ГА, приготовленный на 50 мМ какодилатном буфере, выдержать 1 час.

Удалить пипеткой предыдущий раствор и промыть объекты 50 мМ какодилатным буфером дважды по 10 минут.

Удалить пипеткой предыдущий раствор и добавить раствор OsO_4 с сахарозой. Оставить на 3 часа при температуре 6-8 °С.

Удалить пипеткой предыдущий раствор и провести дегидратацию тканей в спиртах. Выдерживать объекты в растворах этанола восходящей концентрации (30%, 50%, 70%) дважды по 15 минут. В 70% спирте можно оставить на ночь при температуре 6-8 °С. В 96% спирте объект обезвоживать

трижды по 15 минут, удаляя каждый раз предыдущий раствор.

Удалить спирт, добавить пипеткой ацетон (трижды по 20 минут, удаляя предыдущий раствор).

Удалить ацетон добавить пипеткой пропилен (трижды по 20 минут, удаляя предыдущий раствор).

Провести пропитку тканей смолой с постепенным увеличением её концентрации по схеме:

Смесь эпон:пропилен	Продолжительность обработки, ч
1:2	24
1:1	24
2:1	24

После завершения процедуры пропитки ткани поместить в чистую смолу.

Процесс полимеризации провести в течение двух суток при соблюдении следующего температурного режима: в первые сутки - при температуре 45 °С, вторые - при температуре 60 °С.

Для электронной микроскопии приготовить срезы на микротоме. Затем провести контрастирование срезов. Для этого сеточки со срезами поместить в каплю уранилацетата на 20 минут при $t=60\text{ }^{\circ}\text{C}$, затем промыть дистиллированной водой в 3-х бюксах. Убрать лишнюю влагу, выложив сеточки на фильтровальную бумагу. Затем сеточки со срезами поместить в капли цитрата свинца, в свободные от сеточек места выложить пластинки щелочи, добавить воды и окрашивать в парах щёлочи 10 минут при комнатной температуре. По окончании процедуры сеточки промыть дистиллированной водой в 3-х бюксах. Выложить сеточки на фильтровальную бумагу.

Просматривать срезы на электронном микроскопе.

5. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

5.1. Определение сухой биомассы в соответствии с ГОСТ 16932-93

Содержание сухого вещества в образце – отношение массы испытуемого образца после сушки до постоянной массы при температуре (105 ± 2) °С при определённых условиях к его массе до высушивания. Содержание сухого вещества выражается в процентах.

Необходимое оборудование:

- 1) сосуды для взвешивания образцов водонепроницаемые с притёртыми пробками.
- 2) сушильный шкаф, обеспечивающий температуру (105 ± 2) °С, имеющий вентиляцию.
- 3) весы с погрешностью взвешивания не более 0,001 г.
- 4) эксикатор.

Ход работы

Навеску образца взвешивают с точностью до третьего десятичного знака в закрытом, предварительно высушенном и взвешенном сосуде. Сырой материал должен лежать в сосуде рыхло. Затем сосуд открывают и помещают его с испытуемым образцом и открытой крышкой в сушильный шкаф при температуре (105 ± 2) °С на время, необходимое для достижения **постоянной массы**. Считают, что образец достиг **постоянной массы**, если различие между результатами двух последующих взвешиваний не превышает 0,1% исходной массы испытуемого образца. Время сушки между двумя последующими взвешиваниями должно составлять не более половины минимального времени первоначальной сушки.

По окончании сушки сосуд с испытуемым образцом закрывают крышкой и охлаждают в эксикаторе в течение 45 мин или другого времени, необходимого для достижения комнатной температуры. Контролируют температуру термометром, помещенным в эксикатор.

После охлаждения уравнивают давление воздуха внутри и снаружи сосуда, быстро приоткрыв и закрыв крышку. Затем сосуд с содержимым

взвешивают.

В процессе сушки не рекомендуется помещать в сосуд новую порцию образцов. Время сушки – не менее 3 ч и не более 16 ч.

Выполняют два параллельных определения или более.

Примечание. Если количество собранного растительного материала мало или нет возможности взять для проведения анализов отдельные пробы, то материал высушивают при 50-60 °С и хранят в закрытых бюксах в эксикаторе. Высушивание при 50-60 °С не удаляет всей воды, часть её, прочно удерживаемая коллоидами, остается в материале. Можно проверить, какой процент воды сохраняется. Обычно он составляет незначительную часть от общего содержания воды в материале.

Расчёты

Содержание сухого вещества рассчитывают по формуле:

$$C=(m_2/m_1)\cdot 100,$$

где:

C – содержание сухого вещества, выраженное в процентах по массе,

m_1 – масса образца до высушивания, г,

m_2 – масса образца после высушивания, г.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое всех параллельных определений сухого вещества, округлённое до первого десятичного знака.

Расхождение между параллельными определениями не должно превышать 0,1%.

Соотношение сухой и сырой биомассы вычисляется по формуле:

$$\Delta m = m_{\text{сух}}/m_{\text{сыр}},$$

где:

$m_{\text{сух}}$ – масса сухой навески, г,

$m_{\text{сыр}}$ – масса исходной сырой навески, г

5.2. Определение содержания белка

Метод Брэдфорд (Bradford, 1976) основан на сдвиге спектра поглощения в сторону значений 595 нм красителя кумасси ярко-голубого (Coomassie Blue G-250) при связывании его с белком, прямо пропорционально концентрации последнего. Кумасси образует комплекс с белком, в результате чего цвет красителя из красновато-коричневого становится голубым.

Необходимые реактивы:

1) реактив Брэдфорд.

Приготовление реактива Брэдфорд:

100 мг красителя Кумасси ярко-голубого (СВВ G-250) растворить в 50 мл 96% этанола. Затем к этому раствору, постоянно перемешивая его стеклянной палочкой, добавить 100 мл 85% фосфорной кислоты. При добавлении фосфорной кислоты окраска раствора из синего должна перейти в коричневый. В стакан объёмом 1 л налить 500-700 мл дистиллированной (лучше *MQ*) воды и медленно, помешивая воду стеклянной палочкой, добавлять в неё раствор, содержащий краситель Кумасси голубой, этанол и фосфорную кислоту. Довести раствор до 1 литра и оставить на ночь при комнатной температуре. После этого полученный раствор необходимо профильтровать. Реактив Брэдфорд хранить в холодильнике в колбе из темного стекла с притёртой пробкой. При длительном хранении (более 1 месяца) реактив необходимо повторно калибровать.

Ход работы

0,1 мл раствора препарата, содержащего 0,01-0,1 мг испытуемого белка помещают в пробирки, прибавляют 5 мл реактива Брэдфорд, перемешивают и оставляют при комнатной температуре в течение одинакового времени в интервале от 2 до 60 мин (**обычно 10 мин**). Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при длине волны **595 нм**. В качестве раствора сравнения вместо образца берут аналогичное количество буфера или экстрагирующего раствора.

Примечание. При постановке реакции Брэдфорд используют

соотношение объёма реагента к образцу равно 50:1 (минимально рекомендуемый объём соответствует 200 мкл реагента и 4 мкл образца – в данном случае измерение поглощения при 595 нм проводят в кювете с длиной оптического пути 1 мм).

Построение калибровочной кривой

Калибровочную кривую строят, используя бычий сывороточный альбумин (БСА) или яичный альбумин.

Приготовление сток-раствора БСА: 10 мг БСА растворить в 10 мл дистиллированной воды (лучше *MQ*). Приготовить растворы белка в пределах известных концентраций 0,01-0,1 мг/мл (см. табл.). Провести измерения оптической плотности согласно ранее изложенному ходу работы.

Концентрация белка, мкг/мл	объём сток-раствора, мкл	объём воды, мкл
10	10	990
30	30	970
50	50	950
75	75	925
100	100	900

Расчёты:

Построить калибровочную кривую в координатах концентрация белка-оптическая плотность. Содержание белка в пробе в мг/л определить по калибровочной кривой.

Измерения проводят в нескольких (не менее трёх) биологических и аналитических повторностях. Стандартную ошибку вычисляют в программе Microsoft Office Excel (опция «Описательная статистика»).

5.3. Определение жизнеспособности клеток

Жизнеспособность каллусных культур определялась по модифицированному методу Кастро-Кончи с соавторами и Бейкера и Мока (Castro-Concha et al., 2006; Baker, Mock, 1994). Краситель Эванса синий не способен проникать в живые клетки, т.е. он является надёжным красителем для определения мёртвых клеток. Метод основан на спектрофотометрическом определении жизнеспособности клеточной культуры по степени удержания красителя мёртвыми клетками.

Необходимые реактивы:

- 1) 0,025% водный раствор Эванса синего (12,5 мг растворить в 50 мл деионизированной воды).
- 2) 1% раствор додецилсульфата натрия (ДСН) на 50% этаноле (500 мг ДСН растворить в 50 мл 50% этанола).

Ход работы

К **150 мг** каллусной ткани добавить **0,5 мл** 0,025% раствора Эванса синего. Образцы инкубировать 15 мин при комнатной температуре. Затем отмыть образцы дистиллированной водой от избыточного и несвязанного красителя до прозрачного раствора.

Для вымывания связанного мёртвыми клетками красителя к отмытым клеткам добавить 1 мл 1% раствора ДСН, выдержать на водяной бане при 60 °С в течение 30 мин.

Центрифугировать 10 мин при 9 000 g. Объём супернатанта довести до 1 мл.

Измерить оптическую плотность образца при длине волны **600 нм** относительно 1% раствора ДСН.

Каждой пробе должен соответствовать контроль сравнения, т.е. образец, состоящий на 100% из *мёртвых* клеток. Для получения контроля сравнения каллусную ткань выдержать в микроволновой печи при мощности 900 Вт в течение 3-5 мин. Далее провести процедуру, как описано выше.

Расчёты

Жизнеспособность в процентах от оптической плотности контроля сравнения рассчитывают по формуле:

$$\text{Жизнеспособность} = 100 - (100 \cdot (C \cdot D)),$$

где:

C – значение оптической плотности образца,

D – значение оптической плотности контроля сравнения,

Измерения проводят в нескольких (не менее трёх) биологических и аналитических повторностях. Стандартную ошибку вычисляют в программе Microsoft Office Excel (опция «Описательная статистика»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Верлан Н.В.*, Клинико-фармакологический анализ состояния системы глутатиона при церебральной ишемии // Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук. Москва. - 2008. - 37 с.
2. *Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И.* Методы биохимического исследования растений // Л.: Агропромиздат. - 1987. - С. 41-45.
3. Методы биохимического анализа растений // Учебное пособие (Ред.: Полевой В.В., Максимов Г.Б. - Л.: изд-во Ленингр. Ун-та. - 1978. - 192 с.
4. *Полесская О.Г., Каширина Е.И., Алехина Н.Д.* Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях пшеницы в зависимости от формы и дозы азота в среде // Физиология растений. - 2004.- Т. 51. - С. 686-691.
5. *Aeby H.*, Catalase in vitro // Methods Enzymol. - 1984. - V. 105. - P. 121-126.
6. *Bakalova S., Nikolova A., Nedeva D.* Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by stress and ABA during germination of wheat seeds // Bulg. J. Plant Physiol. - 2004. - V. 30 (1-2). - P. 64-77.
7. *Baker C.J., Mock N.M.* An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue // Plant Cell Tiss. Org. Cult. - 1994. - V. 39. - P. 7-12.
8. *Beauchamp C.H., Fridovich I.* Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. - 1971. - V. 44. - P. 276-287.
9. *Bellincampi D., Dipperro N., Salvi G., Cervcone F., De Lorenzo G.* Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the Auxin-Regulated *rolB* gene expression in tobacco leaf explants // Plant Physiology. - 2000. - V. 122. - P. 1379-1385.
10. *Bestwick C.S., Bennett M.N., Mansfield J.W.* Hrp mutant of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola induces cell wall alterations but not membrane damage leading to the HR in lettuce (*Lactuca sativa*) // Plant Physiol. - 1995. - V. 108. -

P. 503-516.

11. *Blois M.S.* Antioxidant determinations by the use of a stable free radical // *Nature*. - 1958. - V. 181. - P. 1199-1200.
12. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // *Anal. Biochem.* - 1976. - V. 72.- P. 248-254.
13. *Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C.* Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity // *LWT*. - 1995. - V. 28. - P. 25-30.
14. *Castro-Concha L.A., Escobedo R.M., Miranda-Ham M.L.* Measurement of cell viability in *in vitro* cultures // *Methods in Mol. Biol.* - 2006. - V. 318. - P. 71-76.
15. *Folin O., Ciocalteu V.* On tyrosine and tryptophane determinations in proteins // *J. Biol. Chem.* - 1927. - V. 73, №2. - P. 627-650.
16. *Giannopolitis C.N., Ries S.K.* Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants // *Plant Physiol.* - 1972. - V. 59. - P. 309-314.
17. *Habig W.H., Pabst M.S., Jakoby W.B.* Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // *J. Biol. Chem.* - 1974. - V. 246. - P. 7130-7139.
18. *Hodges D.M., Delong J.M., Forney C.F., Prange P.K.* Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds // *Planta*. - 1999. - V. 207. - P. 604-611.
19. *Kumar G.N.M., Knowles N.R.* Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers // *Plant. Physiol.* - 1993. - V. 102. - P. 115-124.
20. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4 // *Nature*. -1970. - V. 227. - P. 680-685.
21. *Mehl K.A., Davis M., Berger F.G., Carson J.A.* Myofiber degeneration/regeneration is induced in the cachectic *Aps*^{Min/+} mouse // *J. Appl. Physiol.* - 2005. - V. 99. - P. 2379-2387.

22. *Pagila D.E., Valentine W.N.* Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase // *Lab. Clin. Med.* - 1967. - V. 70. - P. 158-169.
23. *Queval G., Hager J., Gakiere B., Noctor G.* Why are literature data for H₂O₂ so variable? A discussion of potential difficulties in the quantitative assay of leaf extracts // *Journal of Experimental Botany.* - 2008. - V. 59.- P. 135-146.
24. *Rao M.V., Paliyath G., Ormrod D.P.* Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol.* - 1996. - V. 110. - P. 125-136.
25. *Singleton V.L., Rossi J.A.* Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phoungstic acid reagent // *Am. J. Enol. Vitic.* - 1965. - V. 16. - P. 144-158.
26. *Verma S., Dubey R.S.* Lead toxicity induces lipid peroxidation and alert the activities of antioxidant enzymes in grooving rice plants // *Plan. Sci.* - 2003. - V. 64. - P. 645-655.
27. *Woodbury W., Spenser A.K., Stahmann M.A.* An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isoenzymes // *Anal. Biochem.* – 1971. – V. 44. – P. 301-305.
28. *Zhang J., Kirkham M.B.* Enzymatic responses of the ascorbate-glutathione cycle to drought in sorghum and sunflower plants // *Plant Sci.* - 1996. - V. 113. - P. 139-147.