

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОКСИПРОЛИНА В ТКАНИ РАСТЕНИЙ

Проблема повышения устойчивости и продуктивности лесных древесных растений в условиях действия техногенных факторов является весьма актуальной. Продуктивность растений обусловлена процессами роста, а именно митозом и растяжением первичной клеточной стенки. В процессе роста растительных клеток растяжением важную роль играют богатые оксипролином структурные белки клеточной стенки и плазмалеммы — экстенсины (гликопротеины) (Шевякова, 1983). Белок экстенсин ковалентно связан в клеточной стенке с целлюлозными волокнами и напоминает коллаген, выполняющий аналогичные функции в животных тканях (Ленинджер, 1974). Высокое (до 90%) содержание оксипролина в экстенсине (Либберт, 1976) и отсутствие его в свободном состоянии у большинства растений (Шевякова, 1983) позволяет использовать данный биохимический показатель в качестве одного из критериев роста клеток растяжением при выявлении ранних, морфологически не проявляющихся и явных признаков нарушения данного процесса у растений, подвергающихся действию различных неблагоприятных факторов внешней среды.

В растительной ткани оксипролин определяется трудоемкими, требующими значительных временных затрат методами хроматографии, предполагающими предварительную экстракцию и очистку белков, их гидролиз, продолжительность которого широко варьирует (Ленинджер, 1974). Применение химического метода определения оксипролина в растительных тканях, особенно в древесных лесных породах, не получило распространения, хотя этот метод широко используется для выявления содержания коллагеновых белков соединительной ткани животных и человека (Neuman, 1950; Бабушкина, Панфилова, 1971; Кацнельсон и др. 1964; Chvapil, 1960; Обоснование ..., 1983).

Для оценки количественного содержания оксипролина в ассимиляционных органах древесных растений мы применяли достаточно точный и быстрый метод определения суммарного содержания оксипролина в гидролизате всей нативной, немодифицированной ткани, а также хорошо зарекомендовавший себя во многих

исследованиях при изучении патологии соединительной ткани в животном организме метод Хапила с некоторыми нашими модификациями. Он предусматривает гидролиз нативной ткани в 6н HCl в присутствии хлорида олова, способствующего адсорбции гуминовых (красящих) веществ, которые мешают при колориметрическом определении оксипролина. Оксипролин в гидролизате выявляется методом Неймана и Логана с помощью наиболее чувствительной и специфичной пирроловой реакции с п-диметиламинобензальдегидом.

Наши модификации метода касались условий гидролиза растительной ткани, а именно выбраны минимальные навеска ткани для отдельных древесных растений и навеска хлорида олова, оптимальный объем 6н HCl, минимальные время гидролиза и степень разбавления гидролизата.

Ход анализа. Материалом для исследований служили высушенные до постоянного веса (105°C) и тщательно измельченные до тонкодисперсного состояния листья березы бородавчатой, осины и хвоя сосны обыкновенной. Образцы собраны из средней части кроны южной экспозиции десяти деревьев в июле 1984 г. в пригородной зоне, в Уральском учебно-опытном лесхозе. Навеска ткани (100—500 мг) переносилась в стеклянную ампулу, пропорционально ей вносился хлорид олова (соответственно 50—250 мг) и 3—6 мл 6н HCl (на 100 мг ткани — 3 мл, на 200 мг и более — 6 мл 6н HCl). Ампулы запаивались, гидролиз ткани проводился в термостате при 110°C первоначально в течение 72 ч (исходя из условий гидролиза животной ткани). Из вскрытой ампулы весь объем кашеобразного гидролизата переносился в химический стаканчик на 25—50 мл, к нему добавлялось две-три капли фенолфталеина. Ампула несколько раз промывалась небольшими объемами (1—2 мл) дистиллированной воды, которая сливалась к гидролизату в химический стаканчик, а затем гидролизат нейтрализовали 2н NaOH. Выпавший осадок гидроокиси олова содержал красящие вещества. Раствор отфильтровывался в мерную колбу (25—50 мл, в зависимости от объема гидролизата), а осадок на фильтре несколько раз промывался водой, объем раствора в колбе доводился водой до метки. Разведенный гидролизат служил для колориметрического определения оксипролина по методу Неймана и Логана. (Если определение откладывается на следующий день, гидролизат следует хранить в холодильнике. При более длительных разрывах во времени между гидролизом и определением оксипролина ампулы не вскрываются).

Реактивы для определения оксипролина: 1) стандартные растворы оксипролина, содержащие 1, 2, 5, 10, 15, 20 мкг оксипролина в 1 мл воды; 2) 0,01 н раствор CuSO_4 ; 3) 2,5 н раствор NaOH; 4) 6%-ный раствор H_2O_2 ; 5) 3 н раствор H_2SO_4 ; 6) 5%-ный раствор п-диметиламинобензальдегида в химически чистом н-пропано-

ле. *N*-диметиламинобензальдегид должен иметь белые или слегка кремоватые кристаллы.

Методика определения. В химические пробирки вносится по 1 мл исследуемого гидролизата, в котором должно содержаться от 2 до 20 мкг оксипролина, или стандартных растворов оксипролина для построения калибровочной кривой, в контрольную — 1 мл воды. Затем в каждую пробирку последовательно добавляется по 1 мл реактивов 2, 3 и 4, содержимое перемешивается и энергично встряхивается в течение 5 мин. Пробирки помещаются в «водяную баню» при 80°C на 5 мин, часто и энергично встряхиваются. После охлаждения пробирок в воде со льдом в каждую добавляют при взбалтывании по 4 мл раствора 5 и по 2 мл раствора 6. Содержимое пробирок тщательно перемешивается, и они помещаются в термостатированную «водяную баню» на 16 мин при 70°C, а затем охлаждаются в водопроводной воде до комнатной температуры. Содержимое пробирок переносится в кюветы и колориметрируется при 540 нм (зеленый светофильтр) против контроля. Исходный стандартный раствор оксипролина (20 мкг в 1 мл) можно хранить в холодильнике в течение 15 сут. При замене одного из растворов 2, 3, 5 вновь готовится калибровочная кривая. Растворы 4, 6 готовятся каждый раз непосредственно перед определением оксипролина. Так как окраска раствора со временем исчезает, не рекомендуется одновременно проводить анализ более 7—8 проб. При этом последовательность прохождения каждой манипуляции должна быть одной и той же. Количество оксипролина в 1 мл исследуемого раствора определяется по точке на калибровочной кривой, соответствующей оптической плотности (*E*). Содержание оксипролина во взятой для анализа навеске ткани рассчитывается из следующего уравнения (мкг на 1 г сухой ткани):

$$\frac{a \cdot v \cdot c}{d} \cdot 1000, \text{ где } a \text{ — количество оксипролина, мкг в 1 мл исследуемого раствора, } v \text{ — объем гидролизата, } c \text{ — кратность разбавления гидролизата водой, } d \text{ — навеска сухой ткани.}$$

Результаты исследований. Выявлен более низкий уровень оксипролина (табл. 1) в хвое сосны по сравнению с листьями березы, что может свидетельствовать о значительно замедленном в ней процессе роста растяжением. Полученные данные согласуются с литературными об уровнях содержания оксипролина в различных видах водорослей (Gotelli, Cleland, 1968).

Увеличение навески хвои сосны и пропорционально ей хлорида олова, объема 6*N*HCl при одинаковой степени разбавления гидролизата (до 25 мл) не оказало существенного влияния на средние показатели оксипролина в исследуемой ткани. Однако большая степень разбавления гидролизата (до 50 мл), благодаря большей кратности промывания осадка на фильтре, позволила выявить статистически значимое возрастание уровня оксипролина в ткани.

Таблица 1

**Содержание оксипролина в хвое сосны (I) и листьях березы (II)
в зависимости от условий гидролиза и разбавления гидролизата (h=3)**

Навеска, мг		Хлорид олова, мг		Объем гидролизата, мл		Объем 6н НСl, мл		Содержание оксипролина, мкг/г	
I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
100	100	50	50	10	25	3	3	628±59,9	1891±98,1
200	200	100	100	25	25	6	6	563±70,1	1405±57,4
300	300	150	150	25	50	6	6	632±63,8	1789±103,8
300	—	150	—	50	—	6	—	880±75,4	—

Различия в содержании оксипролина в листьях березы, независимо от увеличения навесок ткани, хлорида олова, объема 6н НСl и кратности разбавления гидролизата, статистически незначимы. Это позволило выбрать оптимальные условия для проведения гидролиза исследуемых тканей разных древесных пород (табл. 2).

Таблица 2

Условия гидролиза ткани ассимиляционных органов древесных растений

Порода	Навеска ткани, мг	Навеска хлорида олова, мг	Объем 6н НСl, мл	Разбавление гидролизата, мл
Береза	100	50	3	25
Осина	300	150	6	50
Сосна	300	150	6	50

Поскольку содержание оксипролина в листьях осины — $707 \pm 25,5$ мкг/г (по данным другого нашего эксперимента) несколько выше, чем в хвое сосны — $350,5 \pm 11,4$ мкг/г, и ниже, чем в листьях березы — $1155 \pm 30,6$ мкг/г, гидролиз ткани этой породы следует проводить в тех же условиях, что и для хвои сосны.

Для определения полноты выявления оксипролина в следующей серии опытов гидролизат делился на две равные части. К одной части приливалось 100 мл стандартного раствора оксипролина (20 мкг). В обеих частях гидролизата определялось содержание оксипролина (табл. 3) и процент его расчетного уровня.

Таблица 3

Уровень оксипролина в хвое сосны и листьях березы (n=3)

Порода	Содержание оксипролина в 1 мл гидролизата, мкг		Содержание оксипролина во всем объеме гидролизата, мкг	
	I	II	I	II
Сосна	9,1±0,1	9,1±0,1	318,0±3,3	317,0±4,7
Береза	12,9±0,2	11,6±0,1	129,0±2,3	116,1±5,3

Примечание. I — расчетное содержание оксипролина, II — выявленное.

Процент выявления оксипролина (см. табл. 3) в гидролизате листьев березы и хвои сосны достаточно высок и составляет соответственно $89,6 \pm 4,0\%$ и $99,6 \pm 1,3\%$.

С целью сокращения продолжительности анализа в следующей серии опытов проводили гидролиз листьев березы в течение различного времени (от 7 до 105 ч), но достоверного различия в содержании оксипролина не выявлено (табл. 4). Это свидетельствует о том, что в течение 7 ч при 110°C происходит полный гидролиз белка в нативной ткани ассимиляционных органов.

Таблица 4

Содержание оксипролина в листьях березы
в зависимости от продолжительности гидролиза ткани (n=3)

Время гидролиза, ч	Оксипролин, мкг/г	Время гидролиза, ч	Оксипролин, мкг/г
7	$1507 \pm 25,8$	49	$1795 \pm 118,2$
14	$1488 \pm 44,2$	56	$1711 \pm 91,0$
21	$1463 \pm 53,7$	63	$1741 \pm 64,1$
28	$1759 \pm 12,6$	70	$1484 \pm 65,4$
35	$1607 \pm 70,8$	98	$1433 \pm 103,2$
42	$1604 \pm 32,2$	105	$1400 \pm 57,6$

Таким образом, химический метод определения оксипролина в нативной ткани животного организма может быть использован для оценки уровня аминокислоты в ассимиляционных органах древесных растений. С помощью данного метода и предложенных нами его модификаций можно оценивать процесс роста растений растяжением при действии различных неблагоприятных факторов внешней среды.

ЛИТЕРАТУРА

- Бабушкина Л. Г., Панфилова Г. А. О содержании кварца, оксипролина и липидов в легочной ткани и лимфатических узлах больных силикозом и силикотуберкулезом//Гигиена труда. 1971. № 12. С. 35.
- Кацнельсон Б. А., Бабушкина Л. Г., Лемясов М. Ф., Ельничных Л. Н. Сравнительно-экспериментальное изучение кониозоопасности ряда огнеупорных материалов//Гигиена и санитария. 1964. № 12. С. 30.
- Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1974. 957 с.
- Либберт Э. Физиология растений. М.: Мир, 1976. 580 с.
- Обоснование предельно допустимых концентраций (ПДК) аэрозолей в рабочей зоне: Метод. рекомендации. М., 1983.
- Шевякова Н. И. Метаболизм и физиологическая роль пролина в растениях при водном и солевом стрессе//Физиология растений. 1983. Т. 30, вып. 4. С. 768—783.
- Chvapil M. Möglichkeiten einer quantitativen Bestimmung des Fibrosegrades bei der Untersuchung experimenteller Silikose//Beitrag. Silikoseforsch. 1960. № 4. S. 3—71.
- Gotelli I. B., Cleland R. Differences in the occurrence and distribution of hydroxyproline-rich proteins among the algae// Amer. J. Bot. 1968. № 55(8). P. 907—914.
- Neuman M. E., Logan M. A. Determination of collagen and elastin in tissues //J. Biol. chem. 1950. Vol. 186. N 1. P. 549—556.