

Соколова Мария Леонидовна

студентка

ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет»

г. Киров, Кировская область

РАЗРАБОТКА ОСНОВЫ ЭКСПРЕСС-ТЕСТА ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЛУТАТИОН-ЗАВИСИМОЙ ЗАЩИТНОЙ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗМА

Аннотация: в работе представлены результаты выбора способа экстракции глутатиона восстановленного из растений, выбран наиболее оптимальный вариант. Выбран материал для создания основы экспресс-теста определения работы глутатион-зависимой защитной системы растений.

Ключевые слова: глутатион восстановленный, экспресс-тест, реактив Элмана, экстракция, спектрофотометрия, силикагель.

Глутатион представляет собой трипептид, содержащийся в растениях и животных. Количество глутатиона и его редокс-состояние являются показателями устойчивости организма к действию агрессивных факторов биотической и абиотической природы [1, с. 145]. Поэтому его количество в клетках растений может служить индикатором загрязнения.

Создание экспресс-теста для определения уровня восстановленного глутатиона в растениях, позволит быстро оценивать состояние растений на территории, подверженной воздействию стресс-факторов. Экспресс-тест будет содержать индикаторную зону с нанесенными реагентами. Реагенты, вступая в реакцию с глутатионом, содержащимся в экстракте из растения, будут приобретать определенную окраску. По интенсивности окраски можно будет оценить уровень воздействия негативных факторов. Реагент может быть закреплен как на твердый, так и на жидкий носитель или по-другому на матрицу. Наибольшую распространенность получили тест-системы на твердом носителе.

Для того чтобы создать глутатион-зависимую тест-систему, на первом этапе необходимо подобрать способ экстракции глутатиона из растений и на втором выбрать материал в качестве основы тест-системы.

Для выделения глутатиона из растений выбрали два способа: кислотная и буферная экстракция. Кислотная экстракция: 5 г листьев растирают в фарфоровой ступке с добавлением 5 см³ 5% раствора сульфосалициловой кислоты. Буферная экстракция: 5 г листьев растирают в фарфоровой ступке с добавлением 5 см³ 0,5 М натрий фосфатного буфера (pH = 7,5) и 1 см³ 0,18% раствора трилона Б. Полученные суспензии центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин и центрифугат фильтровали через фильтр «синяя лента» до полного удаления взвешенных частиц.

Для определения содержания глутатиона в экстракте использовали метод спектрофотометрии с реактивом Элмана [3, с. 70].

Полученные результаты показывают, что в пробе, в которую вносили ионы меди(II), концентрация глутатиона оказалась выше, чем в контроле. При буферной экстракции она составила $(1,25 \pm 0,38) \cdot 10^{-2}$ ммоль/дм³, а в контроле $(3,2 \pm 0,11) \cdot 10^{-3}$ ммоль/дм³. При кислотной экстракции зависимость наблюдаем аналогичную, у растений подверженных воздействию ионов металла концентрация глутатиона восстановленного составила $(1,91 \pm 0,46) \cdot 10^{-2}$ ммоль/дм³, а в контроле $(1,28 \pm 0,1) \cdot 10^{-2}$ ммоль/дм³.

В буферном и кислотном экстракте, приготовленном из растений одного и того же варианта концентрации восстановленного глутатиона различные. Это возможно связано с тем, что при кислотной экстракции происходит разрушение глутатиона до аминокислот, а при буферной экстракции система достаточно эффективна, так как буфер имеет ионную силу, близкую к физиологической. Поэтому, наиболее целесообразнее использовать метод буферной экстракции.

Для основы тест-системы были выбраны следующие материалы: фильтровальная бумага, силикагель, бумага для тонкослойной хроматографии. Полоску бумаги (фильтровальная и хроматографическая) пропитали реактивом Элмана и высушили. Затем край бумаги внесли в исследуемый раствор, однако реактив расплылся по всей бумаге и окраска изменилась незначительно. Возможно причиной является капиллярный эффект, который не дал точной концентрации.

Наиболее оптимальным материалом был выбран силикагель, так как он обладает следующими преимуществами: обладает высокой сорбционной способностью, не имеет окраски и легко принимает и сохраняет необходимую форму. Силикатные материалы легкие и недорогие, что позволяет широко использовать их в качестве носителя в разработке тест-систем.

В ходе реализации экспериментальной части исследования была подобрана методика синтеза пористого материала на основе силикагеля. В химический стакан помещали навеску силикагеля массой по 2 грамма, приливали реактив Элмана перемешивая, формировали в таблетки и оставляли на 24 часа при t 20–25°C. После чего, сорбент стабилизировали методом тепловой обработки 8 часов при $t = 30–35^\circ\text{C}$.

На основе таблеток была получена цветовая шкала, для визуального экспресс-определения глутатиона в растворе. Диапазон концентраций составил от $1 \cdot 10^{-4}$ до $1 \cdot 10^{-7}$ моль/дм³ и был обоснован возможными концентрациями тиоловых групп в растениях. Однако концентрации тиоловых групп в растениях невелики, поэтому необходимо рассматривать шкалу на темном фоне. Таким образом, выбран наиболее целесообразный метод экстракции глутатиона из растения – буферная экстракция. Получена основа для тест-системы, однако пористый материал имеет недостатки, поэтому данная работа требует доработки выбора основы тест-системы.

Список литературы

1. Agrawal S.B. Changes in polyamine and glutathione contents of a green alga, *Chlorogoniumelongatum* (dang) france exposed to mercury / S.B. Agrawal, M. Agrawal, E.H. Lee, G.F. Kramert, P. Pillai // *Environ. Exp. Botany*. – 1992. – 145 p.
2. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1959. – Vol. 82. – P. 70–81.