

## МЕТОДИКА

УДК 581.1+581.12

### МОДИФИКАЦИЯ ЛЮЦИФЕРИН-ЛЮЦИФЕРАЗНОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АТФ В ВЫСШИХ РАСТЕНИЯХ

Т. Л. КУТИС, С. Д. КУТИС

Горьковский государственный университет им. Н. И. Лобачевского  
Специальная научно-исследовательская лаборатория  
по усвоению атмосферного азота живыми организмами  
603005 Горький 5, ул. Ошарская, 8-Д

Предложен вариант люциферин-люциферазного метода определения АТФ в высших растениях с применением 1,5 N раствора NaOH в качестве фиксатора и экстрагента. Навеску свежего растительного материала (от 0,1 до 3,0 г) тщательно растирали в фарфоровой ступке с 30—50-кратным (от массы навески) количеством 1,5 N раствора NaOH. Образец экстрагировали этим раствором в течение 10 мин, затем центрифугировали 10 мин при 3000 g, надосадочную жидкость сливали в бюксы с притертыми пробками. Непосредственно перед определением АТФ препараты нейтрализовали 1,5 N раствором HCl до pH 7,0. Образцы, хранившиеся 41 сутки при комнатной температуре, сохранили исходное содержание АТФ. Метод может быть рекомендован для проведения серийных анализов, особенно образцов, отобранных в экспедиционных условиях.

Важная роль АТФ в растительном организме вызывает интерес к его содержанию в норме и при различных воздействиях. Однако применяемые методы определения АТФ, а также других нуклеотидов часто обладают рядом существенных недостатков (сложность анализа, недостаточная чувствительность, плохая воспроизводимость и т. п.).

Наиболее чувствительным является люциферин-люциферазный метод, предложенный Мак-Элроем и Стрелером в 1949 г. Он позволяет определять концентрацию АТФ до  $10^{-12}$  М, превышая чувствительность остальных методов на несколько порядков. К преимуществам биолюминесцентного метода следует отнести его хорошую воспроизводимость, возможность обходиться минимальными количествами исследуемого материала [3], а также высокую специфичность, обусловленную тем, что люциферин-люциферазная система не реагирует (при соблюдении определенного времени реакции) на ГТФ, УТФ, ЦТФ и другие макроэргические соединения.

При определении компонентов адениловой системы в растительных объектах другими методами, например хроматографическим, большую трудность обычно представляет очистка исследуемого материала от пигментов, фенолов и т. п. В связи с этим биолюминесцентному методу следует отдать предпочтение, так как он позволяет определять компоненты адениловой системы, не освобождаясь от пигментов и других сопутствующих веществ. Дальнейшие разработки биолюминесцентного метода определения АТФ продолжаются и сейчас [1, 3, 4, 8].

Большой интерес представляют методики, позволяющие хранить исследуемый материал в течение некоторого времени. Обычно пробы или экстракты сохраняют на протяжении суток в жидком азоте. В некоторых случаях растительный материал после замораживания в жидком азоте содержат при  $-20^{\circ}\text{C}$  [6] или над  $\text{CaCl}_2$  при  $-27^{\circ}\text{C}$  [7]. Указывается, что при этом не происходит деградации нуклеотидов в течение одной-двух недель. Данные о сохранности лиофилизированного материала носят противоречивый характер [2].

Принятые сокращения: АТФ — аденозинтрифосфат, ГТФ — гуанозинтрифосфат, УТФ — уридинтрифосфат, ЦТФ — цитидинтрифосфат.

Новым шагом стала явилась разработка метода определения АТФ из клеток. При этом в центре внимания — определение концентрации АТФ в клетках. Представилось, что в некоторых случаях представлялось бы возможным использовать некоторые из этих методов.

Навеску свежесобранного материала с 3—50-кратным количеством 1,5 N раствора NaOH экстрагировали в течение 10 мин при 3000 g с притертыми пробками. Непосредственно перед определением АТФ препараты нейтрализовали 1,5 N раствором HCl до pH 7,0. Образцы, хранившиеся 41 сутки при комнатной температуре, сохранили исходное содержание АТФ. Метод может быть рекомендован для проведения серийных анализов, особенно образцов, отобранных в экспедиционных условиях.

Результаты фиксации с последующим определением АТФ в листьях люциферин-люциферазного метода представлены в табл. 2. В листе № 2 содержание АТФ на 24 % больше, чем в листе № 1. Это связано с биологическими особенностями листьев при фиксации. В некоторых случаях

ТАБ  
одуван  
парад  
книжки

Номер

В качестве примера в табл. 2 по содержанию АТФ в листьях проростков люциферин-люциферазного метода фиксации ( $\pm 3\%$ ) с между контролем значимо выявлено.

Проведена фиксация проростков люциферин-люциферазного метода фиксации АТФ в образцах

ЗНОГО  
РАСТЕНИЯХ

кого

едления АТФ в высших фиксатора и экстрагента. ) тщательно растирали в личеством 1,5 N раствора 0 мин, затем центрифуги и в бюксы с притертыми аты нейтрализовали 1,5 N и комнатной температуре, мендован для проведения ционных условиях.

ывает интерес к его нях. Однако приме- х нуклеотидов часто нность анализа, не- мость и т. п.). ерин-люциферазный 1949 г. Он позволя- вшая чувствитель- . К преимуществам орошую воспроизво- количества иссле- чность, обусловлен- не реагирует (при ТТФ, УТФ, ЦТФ и

емы в раститель- графическим, боль- дуемого материала минесцентному ме- зволяет определять от пигментов и ботки биолуминес- сейчас [1, 3, 4, 8]. воляющие хранить ни. Обычно пробы идком азоте. В не- раживания в жид- при  $-27^{\circ}\text{C}$  [7]. ни нуклеотидов в диофилизирован-

— гуанозинтрифосфат,

ений, 1984, т. 16, № 6

Новым шагом в этом вопросе, а также в методе фиксации матери- ала явилась работа Фришкнехта и Шнайдера [5]. Для экстракции АТФ из клеток водорослей они применяли 1,5 N раствора NaOH. Кон- центрация АТФ в образцах оставалась стабильной при  $+20^{\circ}\text{C}$  в те- чение одного месяца без нейтрализации экстрагируемой смеси. Нам представилось перспективным попробовать применить этот метод с некоторыми модификациями для определения АТФ в высших растени- ях. Результаты исследования представлены в настоящей работе.

Навеску свежего растительного материала (от 0,1 до 3,0 г) тщательно расти- рали с 3—50-кратным количеством (от массы навески) 1,5 N раствора NaOH. Образец экстрагировали этим раствором в течение 10 мин. Затем гомогенат центрифугировали 10 мин при 3000 g. Осадок отбрасывали, надосадочную жидкость сливали в бюксы с притертыми пробками, маркировали и хранили при комнатной температуре. Непосред- ственно перед определением концентрации АТФ препараты нейтрализовали 1,5 N рас- твором HCl до pH 7,0. Приготовление люциферин-люциферазного экстракта и методика непосредственного измерения не отличались от методики, изложенной Опритовым с сотр. [3]. Раствор NaOH готовили на основе бидистиллята и хранили при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$ . В качестве стандарта во всех исследованиях применяли свежеприготовленный  $10^{-6}$  M раствор АТФ в бидистилляте.

С целью микробиологического контроля препаратов в конце срока хранения был произведен посев щелочных образцов на среды с мясо-пептонным агаром и Эшби с азотом. На всех средах в течение семи дней инкубирования роста микрофлоры не обнаружено.

Результаты исследований по оценке возможности применения ме- тода фиксации растительного материала концентрированной щелочью с последующим определением в нем АТФ биолуминесцентным мето- дом представлены в табл. 1, 2. Показано, что содержание АТФ в по- ловинках листа одуванчика, фиксированного кипящим бидистиллятом и 1,5 N раствором NaOH, фактически одинаково (см. табл. 1). Лишь в листе № 2 фиксация 1,5 N NaOH выявляет содержание АТФ на 24 % больше, чем при фиксации кипящим бидистиллятом. Хорошо вид- на биологическая вариабельность содержания АТФ в исследованных листьях при фиксации обоими способами. Таким образом, фиксация листа одуванчика 1,5 NaOH не приводит к разрушению АТФ, а в не- которых случаях даже повышает экстрагируемость.

ТАБЛИЦА 1. Содержание АТФ в половинках листьев одуванчика, разрезанных по срединной жилке, при параллельном определении в образцах, фиксированных кипящим бидистиллятом и 1,5 N раствором NaOH

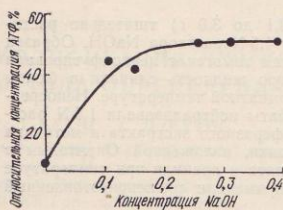
Номер листа	Содержание АТФ, нМ на 1 г сырой массы		P
	фиксация биди- стиллятом	фиксация 1,5 N NaOH	
1	23,2±0,7	23,6±0,7	>0,1
2	17,1±1,2	21,6±0,9	<0,05
3	13,1±0,5	14,5±0,6	>0,1

В качестве иллюстрации возможностей метода интересны данные табл. 2 по содержанию АТФ в эксплантатах из первичных семядоль- ных листьев проростков тыквы. Низкая биологическая вариабельность данного объекта исследования в сочетании с оптимальными условия- ми фиксации позволяет практически реализовать точность определе- ния ( $\pm 3\%$ ) стандартных образцов АТФ в бидистилляте, и разница между контрольным и опытным вариантами (24 %) статистически значимо выявляется при малом числе объектов выборки ( $n=8$ ).

Проведена проверка сохранности во времени АТФ в образцах, фиксированных 1,5 N NaOH. Определено содержание АТФ в 7-суточ- ных проростках тыквы, фиксированных 1,5 N NaOH (пять образцов) в день фиксации и 41 сутки спустя. Мы не обнаружили деструкции АТФ в образцах за указанный срок их хранения. Измерения концент-

рации АТФ в образцах со сроком хранения более трех месяцев также показали высокую стабильность исходной концентрации.

Попытки применить NaOH в качестве фиксатора стандартных растворов АТФ оказались безрезультатными. Раствор АТФ, хранившийся



Изменение концентрации  $1 \times 10^{-6}$  М раствора АТФ через двое суток после фиксации образцов растворами NaOH различной концентрации.

ТАБЛИЦА 2. Содержание АТФ в эксплантатах из первичных семядольных листьев проростков тыквы, выращенных до 8-суточного возраста в искусственной газовой атмосфере ( $Ar-67$  об. %,  $He-12$  об. %,  $O_2-21$  об. %) (опыт) и в воздухе (контроль), с последующим 6-суточным экспонированием в воздухе

Номер эксплантата	Содержание АТФ, нМ на 1 г сырой массы	
	контроль	опыт
1	15,5	11,0
2	13,9	10,9
3	16,0	11,9
4	15,8	13,2
Среднее по вариантам	$15,3 \pm 0,5$	$11,8 \pm 0,5$
P < 0,01		

ся двое суток при комнатной температуре, в значительной мере разложился и содержал лишь 9 % от исходной концентрации, в присутствии же NaOH сохранность увеличилась, но поднять ее выше 52 % в пределах исследованных нами концентраций не удалось (рисунок).

Приведенные нами данные показывают возможность применения метода фиксации растительного материала щелочью по Фришкнехту и Шнайдеру для исследования содержания АТФ в высших растениях.

#### SUMMARY

Modification of Luciferin-Luciferase Method of ATP Determination in Higher Plants. Kutis T. L., Kutis S. D. A variant of the luciferin-luciferase method of ATP determination in higher plants was used with the application of 1.5 N solution of NaOH as a fixer and extragent. Lot of Fresh plant material (from 0.1 up to 3.0 g) was thoroughly stirred in the porcelain mortar with 3-50-fold (of the lot mass) amount of NaOH 1.5 N solution. The sample was extracted by this solution for 10 min, then it was centrifuged at  $3000 \times g$  for 10 min, the supernatant liquid was drained into weighting bottles with ground stopper. Directly before ATP determination the preparations were neutralized by HCl 1.5 N solution to pH 7.0. Samples kept for 41 days at room temperature retained the initial content of ATP. The method may be recommended for carrying out serial analysis especially samples selected under conditions of expedition.

1. Мичурин С. В., Швец И. М. Выбор оптимальных условий для определения АТФ люциферин-люциферазным методом. — В кн.: Биохимические и биофизические механизмы транспорта веществ у растений и его регуляция. (Тез. докл. 2-й Всесоюзной конф.). Горький, 6—8 июля, 1978, с. 91—92.
2. Никулина Н. Г. Методы определения нуклеотидов в растениях. — Л.: Наука, 1980.— 88 с.
3. Оприлов В. А., Калинин В. А., Ретивин В. Г. Теоретические основы и методы изучения биофизических процессов у растений. (Учебное пособие). Горький: Изд-во Горьковск. ун-та, 1979.— 53 с.
4. De Luca M., Wannlund J., McElroy W. D. Factors affecting the kinetics of light emission from crude and purified firefly luciferase. — *Analyt. Biochem.*, 1979, 95, N 1, p. 194—198.
5. Frischknecht Kurt, Schneider Kurt. — *Arch. Hydrobiol.*, 1979, 87, N 1, p. 19—31.
6. Pell E. J., Brennan E. — *Plant Physiol.*, 1973, 51, N 2, p. 378—381.
7. Sobczyk E., Kasperska-Palacz A. — *Ibid.*, 1978, 62, N 6, p. 875—878.
8. Thore A. — *Sci. Tools*, 1979, 26, N 2, p. 30—34.

Поступила 19.08.83