

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений

ЗЕМКО
Дарья Викторовна

**ПРИМЕНЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ
ОБНАРУЖЕНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В
ТКАНЯХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ**

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель:
биолог компании АртБиоТех,
М.А. Войтехович

Минск, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

Перечень условных обозначений.....	4
Реферат.....	5
Введение.....	8
Глава 1 Обзор литературы.....	10
1.1 Понятие об окислительном стрессе, АФК и свободных радикалов.....	10
1.2 Генерация АФК в растениях.....	11
1.3 Разновидности АФК в биологических системах.....	11
1.3.1 Синглетный кислород.....	12
1.3.2 Супероксидный радикал.....	13
1.3.3 Гидроксильный радикал.....	14
1.3.4 Перекись водорода.....	16
1.4 Физиологическая роль АФК в растениях.....	17
1.5 Люминесценция и ее разновидности.....	19
1.6 Ca^{2+} -зависимая целентеразин-эквириновой хемилюминометрии..	21
1.7 Хемилюминометрические зонды для обнаружения АФК в живых системах.....	23
1.7.1 Обнаружение супероксидного-анионного радикала.....	23
1.7.2 Хемилюминометрические зонды для детекции перекиси водорода.....	24
1.7.3 Применение хемилуминофора для обнаружения гидроксильного радикала.....	25
1.8 Применение люминола и люцигенина для тестирования генерации АФК.....	26
Глава 2 Объект и методы исследований.....	28
2.1 Объект исследований.....	28
2.1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.....	28
2.1.2 <i>Pisum sativum</i> L.....	29
2.2 Люминометрия.....	31
2.2.1 Измерение люминесценции люцигенина.....	32
2.2.2 Ca^{2+} -зависимая целентеразин-эквириновая хемилюминесценция.....	32
2.3 Статистическая обработка данных.....	33
Глава 3 Результаты исследований и их обсуждение.....	35
3.1 Свечение люцигенина в видимом свете и под ультрафиолетом..	35

3.2 Тестирование собственного свечения люцигенина (автоокисления) на люминометре.....	36
3.3 Взаимодействие люцигенина с различными тест-растворами....	38
3.4 Обнаружение АФК в клетках растений при помощи люцигенина.....	39
3.5 Обнаружение АФК в клетках растений при помощи Са ²⁺ -зависимой целентеразин-эквириновой хемилюминетрии	40
Заключение.....	46
Список использованных источников.....	48

РЕФЕРАТ

Дипломная работа: 51 страница, 15 рисунков, 3 таблицы, 50 источников.

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА, ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, ЛЮЦИГЕНИН, ЦЕЛЕНТЕРАЗИН, ЭКВОРИН, ЛЮМИНОМЕТР, ВЫСШИЕ РАСТЕНИЯ.

Цель работы: протестировать возможность применения хемилюминесцентного зонда люцигенина и Ca^{2+} -зависимой целентеразин-эквириновой хемилюминесценции для обнаружения АФК в тканях высших растений.

Объектом исследования служили 7-10-дневные проростки эквиринового *Arabidopsis thaliana* L. и 5-дневные проростки *Pisum sativum* L.. Хемилюминесценция измерялась в корнях растений с применением хемилюминесцентных зондов на высокоточном компьютеризованном люминометре.

При исследовании люцигенина на собственное свечение было показано, что в пределах от 10 мкМ до 1 мМ, собственное свечение наблюдалось при 150 мкМ и рН 9. Добавление H_2O_2 к люцигенину приводило к резкому увеличению свечения: 10 мкМ люцигенина на 50 отн.ед., 50 мкМ на 225 отн.ед., 1 мМ на 8800 отн.ед.. При добавлении фентоноподобной смеси к 10 мкМ люцигенина интенсивность свечения была примерно в 50 раз меньше, чем в реакции с H_2O_2 . Взаимодействие люцигенина с корнями гороха вызывало небольшое по интенсивности (около 2 отн.ед.) свечение протяженностью 17 мин. Добавление NaCl к раствору 10 мкМ люцигенина с корнями приводило к резкому увеличению свечения образца и такому же быстрому его затуханию. Интенсивность люминесценции на пике составляла 120 отн.ед. При тестировании целентеразин-эквириновой хемилюминесценции, кальций-зависимой системы, введение 200 мМ NaCl , 1 мМ H_2O_2 и фентоноподобной смеси в наружный раствор к корням приводило к хемилюминесценции и увеличению уровня $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$, тогда как добавление различных антиоксидантов, таких как тиомочевина и каталаза, ингибировали такое повышение. Таким образом, протестированные растворы были способны вызывать резкий ответ растительной клетки в виде генерации АФК и принимать участие в запуске кальциевой сигнализации.

Полученные результаты показали возможность применения хемилюминесцентных подходов для обнаружения АФК в тканях высших растений.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа: 51 старонка, 15 ілюстрацый, 3 табліцы, 50 выкарыстаных крыніц.

АКТЫЎНЫЯ ФОРМЫ КІСЛАРОДУ, ХЕМІЛЮМІНЕСЦЭНЦЫЯ, ЛЮЦЫГЕНІН, ЦЭЛЕНТЭРАЗІН, ЭКВАРЫН, ЛЮМІНАМЕТР, ВЫШЭЙШЫЯ РАСЛІНЫ

Мэта работы: пратэставаць магчымасць прымянення хемілюмінесцэнтнага зонда люцыгеніна і Ca^{2+} -залежнай цэлентэразін-экварынавай хемілюмінесцэнцыі для выяўлення АФК ў тканінах вышэйшых раслін.

Аб'ектам даследавання служылі 7-10-дзённыя праросткі экварынавага *Arabidopsis thaliana* L. і 5-дзённыя праросткі *Pisum sativum* L.. Хемілюмінесцэнцыя вымяралася ў каранях раслін з ужываннем хемілюмінесцэнтных зондаў на высокадакладным камп'ютэраваным люмінаметры.

Пры даследаванні люцыгеніна на ўласнае свячэнне было паказана, што ў межах ад 10 мкМ да 1 мМ, уласнае свячэнне назіралася пры 150 мкМ і рН 9. Даданне H_2O_2 да люцыгеніна прыводзіла да рэзкага павелічэння свячэння: 10 мкМ люцыгеніну на 50 адн. ад., 50 мкМ на 225 адн. ад., 1 мМ на 8800 адн. ад.. Пры даданні фентанападобнай сумесі да 10 мкМ люцыгеніна інтэнсіўнасць свячэння была прыкладна ў 50 разоў менш, чым у рэакцыі з H_2O_2 . Узаемадзеянне люцыгеніна з каранямі гароху выклікала невялікае па інтэнсіўнасці (каля 2 адн. ад.) свячэнне працягласцю 17 хв. Даданне NaCl да раствора 10 мкМ люцыгеніна з каранямі прыводзіла да рэзкага павелічэння свячэння ўзору і такому ж хуткаму яго згасанню. Інтэнсіўнасць люмінесцэнцыі на піку складала 120 адн. ад. Пры тэставанні цэлентэразін-экварынавай хемілюмінесцэнцыі, кальцый-залежнай сістэмы, увядзенне 200 мМ NaCl, 1 мМ H_2O_2 і фентанападобнай сумесі ў вонкавы раствор да каранёў прыводзіла да хемілюмінесцэнцыі і павелічэнню ўзроўню $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цыт.}}$, тады як даданне розных антыаксідантаў, такіх як тыямачавіна і каталаза, інгібіравалі такое павышэнне. Такім чынам, пратэставаныя растворы былі здольныя выклікаць рэзкі адказ расліннай клеткі ў выглядзе генерацыі АФК і прымаць удзел у запуску кальцыевай сігналазацыі.

Атрыманыя вынікі паказалі магчымасць прымянення хемілюмінесцэнтных падыходаў для выяўлення АФК у тканінах вышэйшых раслін.

ABSTRACT

Thesis contents: 51 pages, 15 illustrations, 3 tables, 50 sources.

REACTIVE OXYGEN SPECIES, CHEMILUMINESCENCE, LUCIGENIN, CELENTERAZINE, AEQUORIN, LUMINOMETER, HIGHER PLANTS

The aim of the work: to test the possibility of using the lucigenin chemiluminescent probe and Ca^{2+} -dependent coelenterazine-aequorin chemiluminescence to detect ROS in higher plant tissues.

The objects of the study were 7-10-days seedlings of aequorin *Arabidopsis thaliana* L. and 5-day-old seedlings of *Pisum sativum* L.. Chemiluminescence was measured in plant roots using chemiluminescent probes on a high-precision computerized luminometer.

In the study of lucigenin for intrinsic luminescence, it was shown that in the range from 10 μM to 1 mM, intrinsic luminescence was observed at 150 μM and pH 9. The addition of H_2O_2 to lucigenin led to a sharp increase in luminescence: 10 μM lucigenin by 50 rel. units, 50 μM by 225 rel. units, 1 mM by 8800 rel. units. When a Fenton-like reaction was added to 10 μM lucigenin, the luminescence intensity was about 50 times less than in the reaction with H_2O_2 . The interaction of lucigenin with pea roots caused a low intensity (about 2 rel. units) luminescence lasting 17 min. The addition of NaCl to a solution of 10 μM lucigenin with roots led to a sharp increase in the luminescence of the sample and its rapid decay. The luminescence intensity at the peak was 120 rel. units. When testing coelenterazine-aequorin chemiluminescence, a calcium-dependent system, the addition of 200 mM NaCl, 1 mM H_2O_2 , and a Fenton-like reaction to the external solution to the roots resulted in chemiluminescence and an increase in the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt.}}$ level, while the addition of various antioxidants such as thiourea and catalase inhibited this increase. Thus, the tested solutions were able to induce a sharp response of the plant cell in the form of ROS generation and take part in the triggering of calcium signaling.

The results obtained showed the possibility of using chemiluminescent approaches to detect ROS in tissues of higher plants.