

АНАЛИЗ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ИЗУЧЕНИЯ ЛИПИДОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Тюркина Е.П., Демидчик В.В.

Кафедра физиологии и биохимии растений, биологических факультет, Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Липиды – органические соединения, играющие ключевую роль в построении структур растительной клетки, энергетическом балансе и обмене веществ. Несмотря на то, что данный класс соединений довольно хорошо изучен биохимически, остается не до конца понятной их роль в регуляции физиологических процессов, развитии стрессовых реакций и передаче сигналов. Особый интерес представляет анализ быстрых стимул-специфических изменений липидного состава плазматической мембраны (ПМ), выступающей первичным акцептором внешних воздействий и триггером сигнально-регуляторных каскадов клетки. В настоящем исследовании проанализированы методы исследования липидов ПМ высших растений. Данный анализ показал, что в последние годы наблюдается тенденция отказа от трудоёмких и затратных по времени хроматографических методов, которые включают предшествующие анализу этапы разделения и дериватизации. Идет бурное развитие техники “мягкой ионизации”, а именно ESI (электроспрей-ионизация), MALDI-TOF (масс-спектрометрия с лазерной десорбцией и ионизацией) и MS-MS (тандемная масс-спектрометрия). Внедрение этих подходов повысило эффективность и скорость анализа, позволило изучать изменения одновременно всех липидов клетки (липидома). Тем не менее, для ПМ пока существуют лишь единичные работы с их использованием. Это связано со сложностью этапа выделения и очистки липидной ПМ-фракции от примесей других мембран. Для получения чистой ПМ-фракции часто используются следующие методы: (i) ультрацентрифугирование в градиенте плотности (однако при этом вместе с ПМ частично осаждаются мембраны тонопласта), электрофорез (однако показана невысокая чистота мембран), методов препаративной изоляции ПМ-фракций от микросомальных с использованием двухфазных полимерных систем водных растворов полиэтиленгликоля и декстрана. Последний метод быстр, для него необходимо только лабораторное оборудование. Он основывается на различии мембран не по массе или плотности, а по заряду (ПМ заряжены более отрицательно и при разделении оказываются в верхней фазе), что позволяет достигнуть 98% чистоты фракции ПМ. Масс-спектрометрические методы могут быть дополнены различными методами хроматографии, а именно тонкослойной хроматографией (TLC), газовой хроматографией (GC), высокоэффективной жидкостной хроматографией (HPLC) и GC/HPLC в комбинации с масс-спектрометрией. TLC подходит для большинства растворимых липидов, не требует сложного оборудования и больших затрат времени, однако имеет низкое разрешение и чувствительность. HPLC является хорошо отработанным методом, возможны варианты с обратной и нормальной фазой, доступна автоматизация, он наиболее точен в количественном отношении. GC используется для детекции неполярных липидов, определения состава жирных кислот, но липиды должны быть летучими, необходима дериватизация полярных липидов. Метод ESI обеспечивает прямое обнаружение соотношения m/z (масса/заряд), высокую чувствительность, прямое разделение сложных смесей липидов, легкость автоматизации, совместим с жидкостной хроматографией. Однако наблюдается подавление ионизации в случае малого количества образца, абсолютное определение количества требует значительных усилий.