

NUT BİTKİSİNİN YARPAQLARINDA KARBOANHİDRAZA FERMENTİNİN SUBHÜCEYRƏ LOKALİZASİYASININ TƏYİNİ

Zəminə Məmmədova^{1,2}

¹*Bakı Dövlət Universiteti*

²*AR ETN Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutu, Bakı
zamina4692@gmail.com*

Giriş. Dənli-paxlalı bitkilər arasında əkin sahəsinə görə 3-cü yeri tutan nutun payına təxminən 12 mln ha düşür. Nut dünyanın bir çox bölgələrində Orta Asiya respublikaları, Zaqafqaziya, Ukrayna, Rusiya və digər ölkələrdə becərilir. Tədqiqat işinin obyekti olaraq seçilmiş və C₃ növünə aid olan nut bitkisinə karboanhidraza fermentinin rolu və subhüceyrə paylanması öyrənilmişdir.

Ekspperimental hissə. Əkin materialı kimi nutun Sultan sortundan istifadə edilmişdir. Toxumlar AR KTN Əkinçilik Elmi-Tədqiqat İnstitutunun genbankından əldə edilmişdir. Toxumlar əkildikdən sonra bitkilər 3 həftə ərzində mütəmadi olaraq suvarılmış və bitkilərdən ayrılmış yetkin yarpaqlar təcrübə üçün istifadə edilmişdir. Nut yarpaqlarından sitoplazmanın, mitoxondrilərin, stromanın və tilakoidlərin preparatları təcrid edilmişdir.

Yarpaqlar 50 mM MES-Tris buferi (pH 7,2), 0,3 M saxaroza, 5 mM MgSO₄, 1.5% Polyclar AT (v), 5 mM EDTA, 1 mM ditiotreitol (DTT) olan məhlulda homogenizasiya edilmişdir. Homogenat neylon parçadan süzülüb, yarpaqların böyük hissəciklərinin çökməsi üçün 150x g-də 1,5 dəqiqə sentrifuga edilmişdir. Daha sonra Supernatant 2500x g-də 5 dəqiqə sentrifuga edilmiş, xloroplastların çöküntüsü və supernatant "a" əldə edilmişdir. Supernatant "a" 10 dəqiqə 8000x g-də sentrifuga edildikdən sonra sitoplazmanın zülalları ilə zəngin supernatant "a0" və çöküntü (mitoxondri preparatı) əldə edilmişdir. Xloroplast membranının dağıdılması məqsədilə xloroplastlar 0,4 M saxaroza, 35 mM K₂HPO₄, 15 mM NaH₂PO₄, 3 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 20 mM natrium askorbat, 1 mM KHCO₃, 0,5 mM EDTA-Na, 1 mM DTT, 1 mM benzamidin, 1mM α-aminokaproik turşu və 1 mM PMSF-dən ibarət məhlulda homogenizasiya edilmişdir. Alınmış qarışıq 2500x g-də 5 dəqiqə sentrifuga edilmiş, nəticədə xloroplast stromasının zülalları ilə zəngin supernatant "b" və tilakoidlərin çöküntüsü əldə edilmişdir.

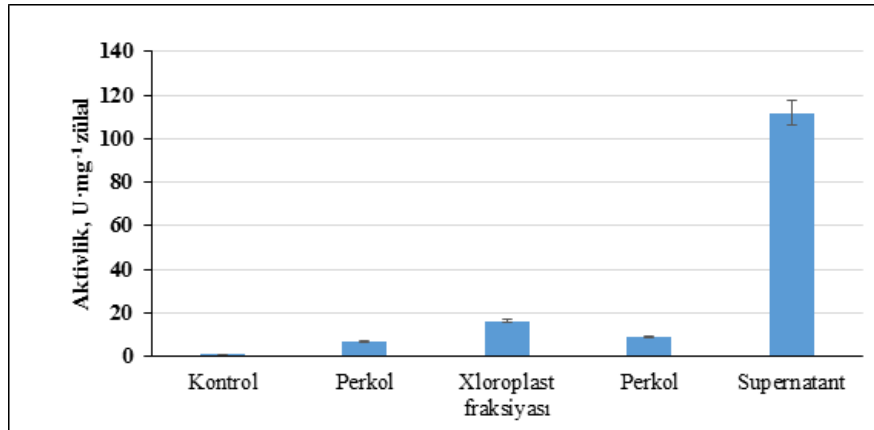
Aktivlik buferinin tərkibi 0,025 M fosfat buferindən (pH 7,4) ibarət olmuşdur. Fermentativ reaksiyanın başlanması üçün mühitə sabit temperaturda (4°C) 10-200 µl ferment preparatı və CO₂ qazının 3 ml doymuş məhlulu əlavə edilmişdir. CO₂ qazının doymuş məhlulunu hazırlamaq üçün CO₂ qazı 25°C temperaturunda, 1 atm təzyiqində bidistillə suyunda həll edilmişdir. CO₂ qazı əlavə edildikdən sonra reaksiya qarışığının son həcmi 20 ml olmuşdur. KA fermentinin aktivliyi CO₂+H₂O→H⁺+HCO₃⁻ reaksiyası zamanı H⁺ ionlarının fəallığının ilkin dəyişməsinə əsaslanan elektrometrik metoddla təyin edilmişdir.

Fermentin aktivliyi şərti vahidlərlə aşağıdakı formula vasitəsilə hesablanmışdır:

$$U=10(T_0/T-1)$$

burada T_0 – kontrollə aparılan (fermentsiz) reaksiyada pH-ın dəyişməsinə sərf olunan zamanı, T – fermentativ reaksiyada pH-ın dəyişməsinə sərf olunan zamanı ifadə edir.

Nəticələr və onların müzakirəsi. Əldə edilən nəticələr göstərmişdir ki, tilakoid membranlarında karboanhidraza fermentinin aktivliyi çox aşağı olmuşdur. İlk sentrifüqələşdirmədən sonra nut yarpaqlarının sitoplazma fraksiyasında ümumi karboanhidraza aktivliyinin 10-15%-inin yerləşdiyi müşahidə olunmuşdur.



Şəkil. Nut bitkisinin yarpaqlarından ayrılmış müxtəlif fraksiyalarda karboanhidraza fermentinin aktivliyi

Fermentin aktivliyinin əsas hissəsi isə (75-80%) onun xloroplastlarının stromasında aşkar edilmişdir. Alınan nəticələr ikiləpəli C_3 bitkilərə aid olan kartof və Arabidopsis bitkisinin yarpaqlarında aparılan tədqiqat işlərinin nəticələri ilə uyğunluq təşkil edir. Bu isə bir daha sübut edir ki, ikiləpəli C_3 bitkilərdə karboanhidraza fermentinin subhüceyrə paylanması bir-birinə yaxındır.