

УДК 577.151: 577.13

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ОСАЖДЕНИЯ БЕЛКА АЦЕТОНОМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

© *Е.Р. Никонова**, *Д.Н. Балеев*

*Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных
и ароматических растений, ул. Грина, 7, Москва, 117216 (Россия),
e-mail: gatiatulinaer@gmail.com*

Фенольные соединения растительного происхождения широко используются во многих областях медицины и сельского хозяйства. Изучение механизмов их образования и накопления представляет собой сложную задачу и включает определение активности ключевых ферментов их синтеза, одним из которых является шикиматдегидрогеназа. При этом выделение белков и ферментов из растительного сырья осложнено присутствием фенольных соединений и пигментов. Целью исследования было изучение применимости метода ацетонового осаждения белка из грубых экстрактов листьев облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) и свидины шелковистой (*Cornus sericea* L.) для определения активности ферментов на примере шикиматдегидрогеназы. Объектом исследования были листья облепихи крушиновидной (*H. rhamnoides*) и свидины шелковистой (*C. sericea*). Выделение белка из грубого экстракта проводили охлажденным ацетоном с различным насыщением и трехкратной отмывкой осадка, после чего он растворялся в буфере. Активность шикиматдегидрогеназы определяли при pH=10.0 и выражали в нкат на мг белка. Были выделены фракции белка с различной активностью шикиматдегидрогеназы из листьев облепихи крушиновидной (*H. rhamnoides*) и свидины шелковистой (*C. sericea*). Показано, что фракция белка, полученная при соотношении 1 : 1.5 (экстракт : ацетон, 60% насыщения), наиболее удобна в работе, имеет высокую активность фермента и не содержит окрашенных примесей. Данный способ выделения и предварительной очистки белка является быстрым, требует малого количества образца и подходит для скрининговых исследований активности различных ферментов в лекарственных растениях.

Ключевые слова: экстракт, растения, шикиматдегидрогеназа, выделение белка, активность, ацетон, облепиха, свидина.

Исследования выполнены в рамках реализации плана научно-исследовательской работы ФГБНУ ВИ-ЛАР по теме НИР «Молекулярно-генетические механизмы регуляции биосинтеза биологически активных вторичных метаболитов лекарственных растений» (FGUU-2022-0013).

Введение

Фенольные соединения растений представляют собой большую по числу и очень разнообразную по структуре группу вторичных метаболитов. В растениях они участвуют в многочисленных жизненно важных процессах, таких как дыхание, фотосинтез, адаптация к стрессам и рост [1]. Биосинтез фенольных соединений в растениях является результатом длинной последовательности разветвленных биохимических реакций, которые принадлежат к серии взаимосвязанных метаболических сегментов: углеводного обмена, шикиматного пути и метаболизма ароматических аминокислот [2]. Ключевым ферментом шикиматного пути является шикиматдегидрогеназа, активность которого связана с накоплением гидролизуемых таннинов [3]. В проведенном нами ранее исследовании содержания различных классов фенольных соединений в листьях 200 видов лекарственных растений мы выделили две группы растений, в которых по-разному накапливались

Никонова Евгения Рамильевна – ведущий научный сотрудник, e-mail: gatiatulinaer@gmail.com
Балеев Дмитрий Николаевич – ведущий научный сотрудник, e-mail: dbaleev@gmail.com

фенольные соединения класса таннинов: некоторые виды характеризовались высоким уровнем накопления гидролизуемых таннинов, другие – конденсированных таннинов [4].

* Автор, с которым следует вести переписку.

Исследования активности и регуляции биосинтеза гидролизуемых и конденсированных танинов в растениях осложняются многообразием фенольных соединений, а также наличием в тканях растений углеводов, липидов и белков, макро- и микроэлементов, которые переходят в экстракт и способны прямо или косвенно влиять на полученные результаты. В связи с этим требуется подбор методов, которые бы позволили исследовать активность ферментов, независимо от химического состава и морфологии растения, а также в отсутствие потенциальных активаторов/ингибиторов реакции.

Часто для изучения активности ферментов используют неочищенный, так называемый грубый экстракт растений, который зачастую ярко окрашен [5]. В виде исключения использование грубого экстракта, полученного из неокрашенных семян, проростков, плодов или корней, может быть оправдано [6]. Выделение белка из данного экстракта и его последующая многократная очистка на колонках с различными сорбентами дает хороший результат, однако этот процесс трудоемкий и не подходит для проведения скрининговых исследований с большим набором изучаемых образцов [7]. Для выделения белков и ферментов также можно использовать только обратимую преципитацию с помощью органических растворителей (ацетон, этанол) и солей (сульфат аммония), которая не приводит к денатурации белков [8].

Таким образом, целью данной работы было 1) изучение применимости метода ацетонового осаждения белка из грубых экстрактов листьев модельных объектов, таких как облепиха крушиновидная (*Hippophae rhamnoides* L.) (syn.: *Elaeagnus rhamnoides* L. A.Nelson), представителя семейства *Elaeagnaceae* и свидина шелковистая (*Cornus sericea* L.) (syn.: *Thelycrania sericea* L. Dandy, syn.: *Swida sericea* L. Holub,) представителя семейства *Cornaceae*, богатых гидролизуемыми танинами; 2) оценка активности ферментов на примере шикиматдегидрогеназы в данных видах растений.

Материалы и методы

Реактивы. Ацетон (Компонент-Реактив, Россия), фенолметилсульфонил фторид (PMSF), Никотинамид- β -аденин динуклеотид фосфата динатриевая соль (НАДФ-Na₂), 97% (Диаэм, Россия), трис(гидроксиметиламинометан) (Диаэм, Россия), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (Диаэм, Россия), поливинилпирролидон 10000 (PVP, Applichem, Германия), бензамидин гидрохлорид гидрат, шикимовая кислота (Sigma-Aldrich, Китай), смола ионообменная Dowex 2x8 (Serva, Германия), дитиотреитол (ДТТ, 99.5%, BioChemical, AppliChem), бычий сывороточный альбумин (Диаэм, Россия), Coomassie Blue G250 (Диаэм, Россия), ортофосфорная кислота (Компонент-реактив, Россия).

Оборудование. Планшетный спектрофотометр (SPECTROstar NANO, BMG LABTECH, Германия), льдогенератор чешуйчатого льда со встроенным баком (KF 145 A, Porkka, Франция), центрифуга лабораторная (5427R, Eppendorf, Германия), система подготовки воды (Direct-Q3, Merck, Германия), низкотемпературная морозильная камера (U-410, Eppendorf, Германия), вортекс (V-1 plus, Biosan, Латвия).

Объект исследования. Объектом исследования были листья облепихи крушиновидной (*H. rhamnoides*) и свидины шелковистой (*C. sericea*), собранные в Ботаническом саду ФГБНУ ВИЛАР (Москва, 55°56'N, 37°59'E) летом 2021 года и хранились при – 80 °С до начала исследования. Навески листьев *H. rhamnoides* и *C. sericea* весом около 10 г каждый гомогенизировали в жидком азоте и проводили экстракцию 0.2 М Tris-HCl буфером (pH 7.4), содержащим 2 мМ ЭДТА, 1 мМ PMSF, 1 мМ бензамидин, 10 мМ дитиотреитола (ДТТ), 3% Dowex 2x8 и 5% PVP в соотношении 1 : 5 в течение 60 мин при 4 °С. Экстракт фильтровали через капрон и центрифугировали при 7800 g в течение 30 мин при 4 °С, после чего аликвотировали по 500 мкл и хранили при –80 °С до дальнейшего этапа работы.

Выделение и очистка белка. Выделение белка проводили охлажденным до –20 °С ацетоном с 1 мМ ДТТ на льду: к 0.5 мл экстракта быстро приливали необходимый объем ацетона до насыщения 30, 40, 50, 60, 70 и 80%, смесь быстро перемешивали на вортексе и центрифугировали при 14000 об./мин. в течение 3 мин при 4 °С. Надосадочную жидкость аккуратно сливали, а осадок белка дважды промывали 100% ацетоном, содержащим 1 мМ ДТТ. Третью отмывку проводили 80% ацетоном с 1 мМ ДТТ. Разбивку и перемешивание осадка в ацетоне проводили при помощи иглы от одноразового шприца. При этом все манипуляции проводили на льду и максимально быстро. Далее остаток ацетона удаляли при помощи автоматического дозатора объемом 20–200 мкл и осадок белка растворяли в буфере 0.2 М Tris-HCl (pH=7.4), 2 мМ ЭДТА и 1 мМ ДТТ. Содержание белка определяли методом Брэдфорд [9] в планшетном спектрофотометре. Количество повторностей было от 4 до 8.

Анализ активности шикиматдегидрогеназы. Реакционная смесь объемом 0.5 мл содержала 20 мкл раствора образца, 4 мМ НАДФ⁺ и 8 мМ шикимовой кислоты и 0.2М Глицин-NaOH буфера при pH=10.0. Активность фермента рассчитывали по скорости увеличения оптической плотности при 340 нм и выражали в нкат (нанокатал) на мг белка.

Статистический анализ. Анализ полученных данных выполнен с использованием RStudio for MacOS и языка программирования R [10, 11]. Данные были представлены в виде максимальных и минимальных значений, медианы и значений 25 и 75 перцентилей. Для оценки достоверности различий между показателями использовали критерий Краскела-Уоллиса с последующим апостериорным тестом Данна на множественность сравнений. Различия считали достоверными при $p \leq 0.05$. Оценка взаимосвязи между активностью фермента и содержанием белка проводилась методом ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

Проведенное исследование показало, что при насыщении ацетоном более 50% было выделено наибольшее количество белка. Однако, как можно видеть из таблицы, выявлено сильное варьирование содержания белка между модельными видами и разными конечными концентрациями ацетона, используемыми при осаждении. По содержанию белка в ацетоновых экстрактах *C. sericea* были выявлены существенные различия между группами 30 и 60% ($p=0.0042$), 30 и 80% ($p=0.0059$), а также между грубым экстрактом и 30% ($p<0.0001$), 40% ($p=0.0013$) и 50% ($p=0.0019$). В экстрактах *H. rhamnoides* были выявлены существенные различия между группой 30 и 70% ($p=0.0018$), 30 и 80% ($p=0.0101$), между грубым экстрактом и 30 ($p=0.0001$), и 60% ($p=0.0075$) (табл.).

Вариабельность содержания белка при различных процентах ацетона может быть объяснена, во-первых, тем, что при использовании концентрации ацетона 70–80% в образце *H. rhamnoides* образовывался липкий осадок, который плохо отмывался ацетоном и не очень хорошо растворялся в буфере. У *C. sericea* при тех же концентрациях ацетона осадок был более твердым и не таким липким, но также сильно окрашивал буфер и плохо растворялся (рис. 1). Во-вторых, при низких концентрациях ацетона (30–60%) осадок *H. rhamnoides* и *C. sericea* был белого или кремового цвета, легко растворялся в буфере, но был рыхлым и легко мог быть потерян при отмывке, что может объяснить вариацию в уровне содержания белка (табл., рис. 1Б).

Как показано на рисунке 2, сравнительный анализ активности шикиматдегидрогеназы в экстрактах *C. sericea* выявил достоверные различия только между группами 30 и 50% ацетона. А в образцах *H. rhamnoides* – группами 60 и 70%, 30 и 60%, а также между 40 и 60%. Были исследованы межвидовые различия в активности фермента: выявлены достоверные различия между активностью фермента при 60% осаждении ацетоном и в грубом экстракте, при осаждении в других концентрациях достоверных различий между образцами выявлено не было.

Следует также сказать, что в образцах с концентрацией ацетона 70, 80 и 0% (грубый экстракт) потребовалось разведение образцов от 3 до 10 раз, вследствие интенсивной окраски экстрактов, осложняющее анализ активности фермента.

Проведенный корреляционный анализ данных не выявил взаимосвязи между содержанием белка и активностью фермента ни у *C. sericea* ($r=0.161$, $p=0.300$), ни у *H. rhamnoides* ($r=0.235$, $p=0.179$).

Осаждение ацетоном – известный метод выделения белков, основанный на снижении диэлектрической константы воды и сил электростатического отталкивания заряженных молекул белка, окруженных гидратной оболочкой, что приводит к агрегации и осаждению [8, 12]. В нашем исследовании мы успешно применили данный метод для выделения и предварительной очистки белков и последующим определением активности шикиматдегидрогеназы из малых объемов (0.5 мл) экстракта растений. Нами было выявлено, что соотношение экстракт : ацетон равное 1 : 1.5 (60% насыщение) является наиболее удобным в работе и позволяет получить препарат с максимальной активностью исследуемого фермента и отсутствием окраски. При этом несмотря на то, что достоверные отличия в активности шикиматдегидрогеназы между *C. sericea* и *H. rhamnoides* были выявлены и в грубом экстракте, и при осаждении ацетоном с 60% насыщением, при использовании ацетона разница в активности фермента была более выражена, что может быть следствием отсутствия в реакционной смеси фенольных соединений. Так, в исследовании Нýsková' и соавт. было показано, что различные фенольные соединения могут по-разному влиять на активность шикиматдегидрогеназы: потенциальный продукт шикиматного пути, хинная кислота, также как умбеллиферон (7-гидроксикумарин)

и ресвератрол (*транс*-3,4',5-тригидроксистильбен) не влияли на активность фермента. При этом салициловая, *p*-кумаровая, *t*-феруловая, синаповая, сиреневая, кофейная, хлорогеновая кислоты и танниновая кислота являлись ингибиторами, причем концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}) для танниновой кислоты была минимальной [13]. Также, осаждение ацетоном не требует последующего обессоливания, что существенно экономит время и уменьшает погрешность пробподготовки. Другим преимуществом использования является возможность повторного промывания осадка белка для максимального удаления липидов и пигментов.

Содержание белка (мг/мл) в исследуемых образцах растений

Процент ацетона (%)	<i>H. rhamnoides</i>			<i>C. sericea</i>		
	Мин.	Макс.	Медиана (25–75)	Мин.	Макс.	Медиана (25–75)
30	0.14	0.21	0.17 (0.15–0.19)	0.49	0.76	0.63 (0.60–0.68)
40	0.60	0.80	0.76 (0.72–0.78)	0.56	1.45	0.95 (0.84–1.18)
50	0.64	1.38	1.02 (0.87–1.38)	0.67	1.24	1.06 (0.86–1.20)
60	0.48	0.66	0.60 (0.57–0.65)	1.14	2.51	2.12 (1.6–2.58)
70	1.80	2.10	1.92 (1.91–1.92)	1.20	1.89	1.54 (1.45–1.76)
80	1.69	1.99	1.87 (1.84–1.92)	1.97	2.31	2.10 (2.04–2.14)
0 (грубый экстракт)	2.22	2.36	2.26 (2.25–2.29)	4.29	4.53	4.35 (4.31–4.39)

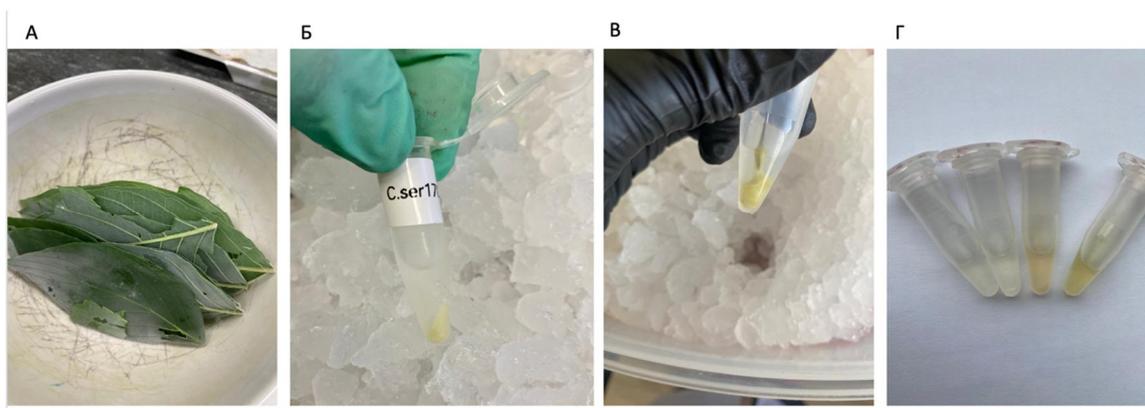


Рис. 1. Процесс выделения белка ацетоном на примере *C. sericea*: замороженные листья *C. sericea*, используемые для исследования (А); молочного цвета осадок, образующийся при 60% насыщения ацетоном (Б); осадок, образующийся при 70% насыщения ацетоном (В); образцы после растворения осадка белка при 50, 60, 70 и 80% насыщения ацетоном (слева направо) (Г)

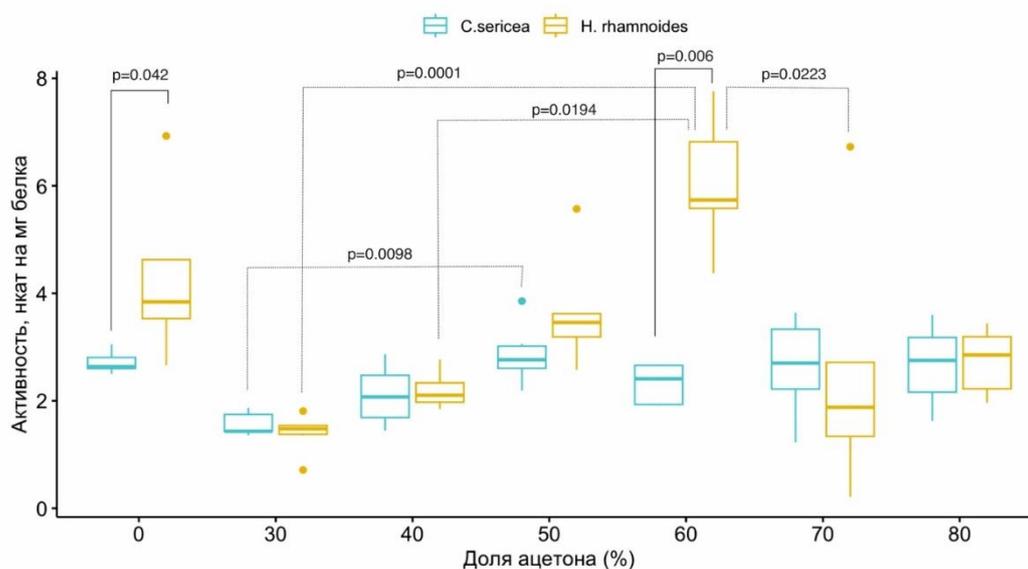


Рис. 2. Специфическая активность шикиматдегидрогеназы в исследуемых образцах (нкат на мг белка)

В исследованиях ферментов часто применяется метод осаждения белка при помощи сульфата аммония (высаливание) с последующей доочисткой на колонках и обессоливанием [13, 14]. Преимуществами данного метода является стабилизация белков и ферментов – они могут храниться в виде суспензии долгое время даже при 4 °С. Также соль блокирует рост бактерий и может использоваться для фракционирования. Недостатками данного метода являются зависимость осаждения от температуры (при ее изменении меняется растворимость сульфата аммония и процент насыщения), необходимость инкубации при 4 °С для достижения равновесия раствора, образование микропузырьков при растворении соли, что может вызвать денатурацию белка и всплытие осадка, а также большой объем экстракта для перемешивания раствора [15]. Из-за длительности выделения метод малоприменим для исследования большого количества образцов разных видов растений [15]. Также обязательным этапом является удаление избыточного количества соли при помощи диализа или колонок с сорбентом для гель-фильтрации (например, Bio-Gel P-6DG или Sephadex) [3]. В связи с этим при проведении скрининговых исследований активности ферментов различных видов растений, с нашей точки зрения, целесообразно отказаться от выделения белка методом осаждения сульфатом аммония.

При использовании метода осаждения ацетоном есть свои особенности, которые следует учитывать. Так, необходимо использовать охлажденный до –20 °С ацетон и проводить все манипуляции с образцами на льду. Так как ацетон не обладает стабилизирующими свойствами в отношении белка, потенциально он может вызывать денатурацию и окисление белка: в исследовании Magsumov и соавт. [16] было показано, что органические растворители, в том числе и ацетон, снижают температуру денатурации лизозима в водно-органической смеси. Чаще всего осаждение ацетоном или смесью трихлоруксусная кислота/ацетон применяются в исследованиях протеома, где неважно, денатурирует белок при осаждении, или нет [17]. В нашем исследовании мы сократили время контакта экстракта, а потом и белкового осадка с ацетоном. Следует отметить, что образующийся осадок при 60% насыщении ацетоном был довольно мягким и может быть потерян при отмывке, поэтому рекомендуется использование конических, а не круглодонных пробирок типа «Эппендорф» для лучшего сцепления осадка белка с дном, центрифугирование со скоростью более 10000 g и аккуратный отбор остатка ацетона при помощи пипетки.

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования из образцов облепихи крушиновидной и свидины шелковистой были выделены фракции белка с высокой активностью шикиматдегидрогеназы. Показано, что фракция белка, полученная при соотношении 1 : 1.5 (экстракт : ацетон, 60% насыщения), наиболее удобна в работе, имеет высокую активность фермента и не содержит окрашенных примесей. Данный способ выделения и первичной очистки белков является быстрым, требует не большого количества образца и подходит для скрининговых исследований активности различных ферментов в лекарственных растениях.

Список литературы

1. Chalker-Scott L., Fuchigami L.H. The role of phenolic compounds in plant stress response // *Low temperature stress physiology in crops*. CRC press, 2018. Pp. 67–80. DOI: 10.1201/9781351074186.
2. Tzin V., Galili G., Aharoni A. Shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis // eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2012. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001315.pub2.
3. Ossipov V., Salminen J.P., Ossipova S., Haukioja E., Pihlaja K. Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway // *Biochemical Systematics and Ecology*. 2003. Vol. 31(1). Pp. 3–16. DOI: 10.1016/S0305-1978(02)00081-9.
4. Аксёнов А.А., Кроль Т.А., Балеев Д.Н., Осипов В.И. Содержание основных групп фенольных соединений в листьях 200 видов лекарственных растений // XI международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты». М., 2022.
5. Tahmasebi E.S., Rabiei Z., Vannozzi G.P., Akbari G.A. Shikimate dehydrogenase expression and activity in sunflower genotypes susceptible and resistant to *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary // *J. Agr. Sci. Tech.* 2011. Vol. 13. Pp. 943–952.
6. Sairam R.K., Srivastava G.C. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress // *Plant Science*. 2002. Vol. 162(6). Pp. 897–904. DOI: 10.1016/S0168-9452(02)00037-7.
7. Ossipov V., Bonner C., Ossipova S., Jensen R. Broad-specificity quinate (shikimate) dehydrogenase from *Pinus taeda* needles // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2000. Vol. 38(12). Pp. 923–928. DOI: 10.1016/S0981-9428(00)01203-1.

8. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. М., 1975. 392 с.
9. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical biochemistry*. 1976. Vol. 72(1-2). Pp. 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
10. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing // R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2013. URL: <http://www.R-project.org/>.
11. RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R // RStudio. PBC, Boston, MA, 2020. URL: <http://www.rstudio.com/>.
12. Doucette A., Crowell A. Precipitation of Detergent-Containing Samples for Top-Down and Bottom-Up Proteomics // *Proteomics Technologies and Applications*. IntechOpen, 2019. Pp. 23–39. DOI: 10.5772/intechopen.85547.
13. Hýšková V., Bělonožníková K., Šmeringaiová I., Kavan D., Ingr M., Ryšlavá H. How is the activity of shikimate dehydrogenase from the root of *Petroselinum crispum* (parsley) regulated and which side reactions are catalyzed? // *Phytochemistr*. 2021. Vol. 190. 112881. DOI: 10.1016/j.phytochem.2021.112881.
14. Ryšlavá H., Doubnerová V., Muller K., Baťková P., Schnablová R., Liberda J., Čeřovská N. The enzyme kinetics of the NADP-malic enzyme from tobacco leaves // *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 2007. Vol. 72(10). Pp. 1420–1434. DOI: 10.1135/cccc20071420.
15. Dixon M., Webb E.C. Enzyme fractionation by salting-out: a theoretical note // *Advances in Protein chemistry*. 1962. Vol. 16. Pp. 197–219. DOI: 10.1016/S0065-3233(08)60030-3.
16. Magsumov T., Ziyang L., Sedov I. Comparative study of the protein denaturing ability of different organic cosolvents // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. Vol. 160. Pp. 880–888. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.260.
17. Fernandes V.N.A., Mangolin C.A., Neves A.F., Sousa Nogueira F.C., Zeni Neto H., Machado M.F.P.S. Extraction of total protein from shoots of *Cereus* morphological variants (Cactaceae) for proteomic analysis // *Advances in Horticultural Science*. 2020. Vol. 34(2). Pp. 233–241.

Поступила в редакцию 8 февраля 2023 г.

После переработки 16 марта 2023 г.

Принята к публикации 22 июня 2023 г.

Для цитирования: Никонорова Е.Р., Балеев Д.Н. Применение метода осаждения белка ацетоном для определения активности ферментов лекарственных растений // *Химия растительного сырья*. 2023. №4. С. 111–117. DOI: 10.14258/jcrpm.20230412549.

*Nikonorova Ye.R.**, *Baleyev D.N.* ACETONE PRECIPITATION OF PROTEINS FOR DETERMINATION OF THE OF ENZYMES ACTIVITY IN MEDICINAL PLANTS

All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Grina st., 7, Moscow, 117216 (Russia), e-mail: gatiatulinaer@gmail.com

Plant phenolic compounds are widely used in medicine and agriculture. The study of the mechanisms of their biosynthesis and accumulation is a complex task. It is also true for the determination of the activity of the key plant enzymes such as shikimate dehydrogenase. At the same time, the isolation of proteins and enzymes from plant is complicated by the presence of phenolic compounds and pigments. The aim of the research was to evaluate the feasibility of the acetone precipitation of proteins of leaf extracts of plants to determine the activity of shikimate dehydrogenase. The object of the study was the leaves of sea buckthorn (*H. rhamnoides*) and silky dogwood (*C. sericea*). The proteins were precipitated from the crude extract with cold (–20 °C) acetone in varying ratio followed by washing three times with acetone and final dissolution in buffer. The activity of shikimate dehydrogenase was determined at pH=10.0 and expressed in ncat per mg of protein. Protein fractions with different activity of shikimate dehydrogenase were isolated from the leaves of sea buckthorn (*H. rhamnoides*) and silky dogwood (*C. sericea*). It was shown that the protein fraction with a ratio of 1 : 1.5 of extract : acetone (60% saturation) is most convenient to work with, has a high enzyme activity and does not contain colored impurities. This method of protein isolation and pre-purification is fast, requires a small amount of sample, and suitable for screening studies of the activity of various enzymes in medicinal plants.

Keywords: extract, plants, shikimate dehydrogenase, protein isolation, activity, acetone, sea buckthorn, dogwood.

* Corresponding author.

References

1. Chalker-Scott L., Fuchigami L.H. *Low temperature stress physiology in crops*. CRC press, 2018, pp. 67–80. DOI: 10.1201/9781351074186.
2. Tzin V., Galili G., Aharoni A. *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2012. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001315.pub2.
3. Ossipov V., Salminen J.P., Ossipova S., Haukioja E., Pihlaja K. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2003, vol. 31(1), pp. 3–16. DOI: 10.1016/S0305-1978(02)00081-9.
4. Aksonov A.A., Krol' T.A., Balejev D.N., Osipov V.I. *XI mezhdunarodnogo simpoziuma «Fenol'nyye soyedineniya: fun-damental'nyye i prikladnyye aspekty»*. [XI International Symposium “Phenolic Compounds: Fundamental and Applied Aspects”]. Moscow, 2022. (in Russ.).
5. Tahmasebi E.S., Rabiei Z., Vannozzi G.P., Akbari G.A. *J. Agr. Sci. Tech.*, 2011, vol. 13, pp. 943–952.
6. Sairam R.K., Srivastava G.C. *Plant Science*, 2002, vol. 162(6), pp. 897–904. DOI: 10.1016/S0168-9452(02)00037-7.
7. Ossipov V., Bonner C., Ossipova S., Jensen R. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2000, vol. 38(12), pp. 923–928. DOI: 10.1016/S0981-9428(00)01203-1.
8. Gavrilenko V.F., Ladygina M.Ye., Khandobina L.M. *Bol'shoy praktikum po fiziologii rasteniy*. [Large workshop on plant physiology]. Moscow, 1975, 392 p. (in Russ.).
9. Bradford M.M. *Analytical biochemistry*, 1976, vol. 72(1-2), pp. 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
10. R Core Team. *R Foundation for Statistical Computing*. Vienna, Austria, 2013. URL: <http://www.R-project.org/>.
11. RStudio Team. *RStudio*. PBC, Boston, MA, 2020. URL: <http://www.rstudio.com/>.
12. Doucette A., Crowell A. *Proteomics Technologies and Applications*. IntechOpen, 2019, pp. 23–39. DOI: 10.5772/intechopen.85547.
13. Hýsková V., Bělonožníková K., Šmeringaiová I., Kavan D., Ingr M., Ryšlavá H. *Phytochemistr*, 2021, vol. 190, 112881. DOI: 10.1016/j.phytochem.2021.112881.
14. Ryšlavá H., Doubnerová V., Müller K., Bařková P., Schnablová R., Liberda J., Čeřovská N. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 2007, vol. 72(10), pp. 1420–1434. DOI: 10.1135/cccc20071420.
15. Dixon M., Webb E.C. *Advances in Protein chemistry*, 1962, vol. 16, pp. 197–219. DOI: 10.1016/S0065-3233(08)60030-3.
16. Magsumov T., Ziyang L., Sedov I. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, vol. 160, pp. 880–888. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.260.
17. Fernandes V.N.A., Mangolin C.A., Neves A.F., Sousa Nogueira F.C., Zeni Neto H., Machado M.F.P.S. *Advances in Horticultural Science*, 2020, vol. 34(2), pp. 233–241.

Received February 8, 2023

Revised March 16, 2023

Accepted June 22, 2023

For citing: Nikonorova Ye.R., Balejev D.N. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2023, no. 4, pp. 111–117. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20230412549.

