



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.151

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12241

Определение молекулярной массы нативных молекул изоформ γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы, полученных из проростков кукурузы (*Zea mays* L.), методом гель-хроматографии

Галина Борисовна Анохина, Екатерина Валерьевна Плотникова,
Александр Трофимович Епринцев[✉]

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, bc366@bio.vsu.ru[✉]

Аннотация. Известно, что при недостатке кислорода нарушается функционирование цикла трикарбоновых кислот, в результате чего происходит активация альтернативного пути – ГАМК-шунта, который обеспечивает поддержание функционирования цикла лимонной кислоты за счёт поставки янтарной кислоты. Ключевым этапом данного обходного пути является реакция, которую катализирует сукцинатсемиальдегиддегидрогеназа (ССАДГ, КФ 1.1.1.16). При недостатке кислорода ССАДГ перестает эффективно функционировать. Это приводит к накоплению полуальдегида янтарной кислоты в матриксе митохондрий, высокий уровень которого неблагоприятно действует на метаболизм растительной клетки. γ -гидроксibuтиратдегидрогеназа (ГБДГ, КФ 1.1.1.61) – энзим, относящийся к классу оксидоредуктаз, который превращает γ -гидроксibuтират в полуальдегид янтарной кислоты, участвуя в процессе его детоксикации, что имеет важное значение в поддержании метаболизма растений при дефиците кислорода.

На сегодняшний день, к сожалению, данные о биохимических и кинетических особенностях γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы отсутствуют. В связи с этим в нашей лаборатории был разработан метод очистки ГБДГ из зеленых листьев кукурузы, который позволяет изучить физико-химические свойства данного энзима.

В ходе исследования проводилась пятистадийная очистка γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы из 7-дневных проростков *Zea mays* L. Гомогенизированный растительный материал с экстрагированными белками, подвергали двухстадийному фракционированию сульфатом аммония. Каталитическая активность определялась спектрофотометрически при $\lambda=340$ нм по количеству восстановленного НАД⁺. Для удаления солей аммония осуществляли гель-фильтрацию на Sephadex G-25. Разделение белков по заряду осуществляли с помощью ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-Sephacel. Энзим десорбировали линейным градиентом хлорида натрия (100-300 мМ). Использование гель-хроматографии через Sephadex G-200 позволило определить молекулярную массу очищенных изоформ фермента. Гомогенность ферментных препаратов подтверждена проведенным электрофорезом в полиакриламидном геле с универсальным окрашиванием AgNO₃. Принадлежность полученных белковых препаратов к γ -гидроксibuтиратдегидрогеназе была определена с помощью тетразолиевого метода.

В результате были получены гомогенные препараты двух изоформ фермента (ГБДГ1 и ГБДГ2). Первая изоформа γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы очищена в 185.7 раза с выходом 10% и имела удельную активность 343.6 Е/мг белка. Степень очистки второй изоформы составила 209 раз, выход 7.74%. Удельная активность полученного препарата – 386.7 Е/мг белка.

Использование гель-хроматографии на Sephadex G-200 позволило определить молекулярную массу нативных молекул гидроксibuтиратдегидрогеназы. Установлено, что в семидневных проростках кукурузы исследуемый фермент представлен в низкомолекулярной и высокомолекулярной формах: для ГБДГ1 значение M_r составляло ~60.3 кДа, в то время как для ГБДГ2 молекулярная масса энзима равнялась 286 кДа.

Ключевые слова: γ -гидроксibuтиратдегидрогеназа, кукуруза, очистка, молекулярная масса, гель-хроматография.

Благодарности: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.



Для цитирования: Анохина Г.Б., Плотникова Е.В., Епринцев А.Т. Определение молекулярной массы нативных молекул изоформ γ -гидроксибутиратдегидрогеназы, полученных из проростков кукурузы (*Zea mays* L.), методом гель-хроматографии // Сорбционные и хроматографические процессы. 2024. Т. 24, № 3. С. 395-402. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12241>

Original article

Determination of the molecular weight of native molecules of γ -hydroxybutyrate dehydrogenase isoforms obtained from maize (*Zea mays* L.) seedlings by gel chromatography

Galina B. Anokhina, Ekaterina V. Plotnikova, Alexander T. Eprintsev[✉]

Voronezh State University, Voronezh, Russia, bc366@bio.vsu.ru[✉]

Abstract. It is known that under oxygen deficiency the functioning of the tricarboxylic acid cycle is impaired, resulting in the activation of an alternative pathway, the GABA shunt. It maintains the functioning of the citric acid cycle by providing succinic acid. The key phase of this bypass is a reaction catalysed by succinate semi-aldehyde dehydrogenase (SSADH, EC 1.1.1.16). Under oxygen deficiency, SSADH ceases to function efficiently. This leads to the accumulation of succinic acid semialdehyde in the mitochondrial matrix and its high level adversely affects the plant cell metabolism. γ -hydroxybutyrate dehydrogenase (HBDH, EC 1.1.1.61) is an enzyme belonging to the group of oxidoreductases. It transforms γ -hydroxybutyrate into succinic acid semialdehyde, participating in the process of its detoxification, which is important in the maintenance of plant metabolism under oxygen deficiency.

To date, unfortunately, there are no data on the biochemical and kinetic features of γ -hydroxybutyrate dehydrogenase. In this regard, our laboratory developed a method for purification of HBDH from green maize leaves, which makes it possible to study the physicochemical properties of this enzyme.

During the study, we obtained γ -hydroxybutyrate dehydrogenase from 7-day-old seedlings of *Zea mays* L. by a five-stage purification. Homogenised plant material with extracted proteins was subjected to two-stage ammonium sulphate fractionation. The catalytic activity was determined spectrophotometrically at $\lambda=340$ nm by the amount of reduced NAD^+ . To remove ammonium salts, we used gel filtration through Sephadex G-25. Proteins were separated according to their charge by DEAE-Sephacel ion exchange chromatography. The enzyme was desorbed using a linear sodium chloride gradient (100-300 mM). The use of gel chromatography through Sephadex G-200 made it possible to determine the molecular mass of the purified enzyme isoforms. The homogeneity of enzyme preparations was confirmed by electrophoresis in polyacrylamide gel with universal AgNO_3 staining. We used the tetrazolium method to confirm that the obtained protein preparations were γ -hydroxybutyrate dehydrogenase.

As a result, homogeneous preparations of two isoforms of the enzyme (HBDH1 and HBDH2) were obtained. The first isoform of γ -hydroxybutyrate dehydrogenase was 185.7 times purified with a yield of 10% and had a specific activity of 343.6 U/mg of protein. The purification rate of the second isoform was 209 times with a yield of 7.74%. The specific activity of the obtained preparation was 386.7 U/mg of protein.

Using gel chromatography through Sephadex G-200, we determined the molecular mass of native molecules of hydroxybutyrate dehydrogenase. We found that in 7-day-old maize seedlings the investigated enzyme was presented in low-molecular and high-molecular forms: for HBDH1 the M_r value was ~ 60.3 kDa, while for HBDH2 the molecular mass of the enzyme was 286 kDa.

Keywords: γ -hydroxybutyrate dehydrogenase, maize, purification, molecular weight, gel chromatography.

Acknowledgments: the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of the state assignment to universities in the field of scientific activity for 2023-2025, project FZGU-2023-0009.

For citation: Anokhina G.B., Plotnikova E.V., Eprintsev A.T. Determination of the molecular weight of native molecules of γ -hydroxybutyrate dehydrogenase isoforms obtained from maize (*Zea mays* L.) seedlings by gel chromatography. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(3): 395-402. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12241>

Введение

Шунт γ -аминомасляной кислоты (ГАМК-шунт) – это биохимический путь,

который растительная клетка использует не только для катаболизма γ -аминомасляной кислоты, но также для обхода



двух реакций ЦТК в случае невозможности их протекания как в виду специфических клеточных сигналов в ответ на действие различных внешних факторов, так и в случае инактивации одного или нескольких ферментов. ГАМК является важным метаболитом, который участвует в регуляции многих биологических процессов, таких как адаптация к абиотическим стрессам, фотосинтез, рост и развитие. ГАМК-шунт может быть активирован при стрессе, таком как засоление или дефицит кислорода, что является адаптивным механизмом растительных организмов к изменившимся условиям внешней среды [1].

Янтарная полуальдегиддегидрогеназа (ССАДГ, 1.2.2.16) – важный фермент, принимающий участие в функционировании шунтирующего пути ЦТК. Известно, что при длительном недостатке кислорода этот фермент либо полностью инактивируется, либо функционирует с малой эффективностью, что вызывает ряд метаболических перестроек и накоплению токсичного для клетки полуальдегида янтарной кислоты [2].

Механизм детоксикации полуальдегида янтарной кислоты (ССА), который оказывает ряд негативных эффектов на процессы клеточного гомеостаза, эволюционно сформировался в виде дополнительного пути, который в митохондриях обеспечивается, главным образом, каталитической активностью НАД⁺-зависимой γ -гидроксибутиратдегидрогеназы (ГБДГ, КФ 1.1.1.61). Этот энзим катализирует превращение γ -гидроксимасляной кислоты (γ -гидроксибутирата, ГОМК) в полуальдегид янтарной кислоты (рис. 1) [2].

Дефицит кислорода в растительных клетках вызывает увеличение концентрации ГОМК с 10 до 155 нмоль г⁻¹ сырой массы в ростках сои и с 273 до 739 нмоль г⁻¹ сухой массы в листьях зеленого чая [3]. Более того, концентрации ГОМК и ГАМК увеличиваются в растениях *Arabidopsis* в условиях воздействия различных стрессовых факторов, что должно

увеличивать клеточное соотношение НАДН/НАД⁺ и уменьшать энергетический заряд аденилата, тем самым ингибируя активность ССАДГ, препятствуя образованию полуальдегида янтарной кислоты [4]. Имеются экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что растения *A. thaliana* с мутацией гена ССАДГ, выращенные в условиях воздействия сильного ультрафиолетового излучения, демонстрировали в 5 раз более высокий уровень γ -гидроксимасляной кислоты и существенно более высокие уровни активных форм кислорода [5]. Каплан с соавт. показали, что колебания уровня γ -гидроксибутирата у растений *A. thaliana*, устойчивых к действию низких температур сопряжены с увеличением и падением уровня ГАМК [6]. В совокупности эти данные указывают на то, что накопление ГОМК в растениях, как и ГАМК, является общей реакцией на абиотический стресс [4].

В связи с тем, что ГАМК-шунт участвует в предотвращении накопления АФК, что, вероятно связано с предоставлением восстановительных эквивалентов для поддержания пулов антиоксидантов и детоксикации полуальдегида янтарной кислоты [7]. Эти результаты могут свидетельствовать о том, что активность ГБДГ и ССАДГ в растениях регулируется взаимодополняющим образом с помощью окислительно-восстановительного баланса, и ГОМК выступает в качестве регулятора толерантности растительного организма к окислительному стрессу. К сожалению, очень мало данных, посвященных структурным и биохимическим особенностям функционирования ГБДГ в клетках животных, и еще меньше известно об особенностях данного фермента в растительных организмах.

В связи с этим, целью работы являлась очистка фермента γ -гидроксибутиратдегидрогеназы из семидневных проростков *Zea mays L.* и определение молекулярной массы нативных молекул изоформ ГБДГ

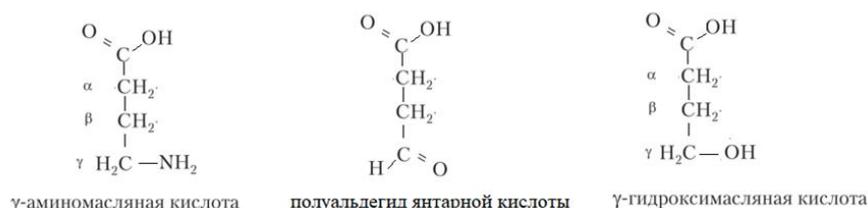


Рис. 1. Структурные формулы γ -аминомасляной кислоты, полуальдегида янтарной кислоты и γ -гидроксимасляной кислоты

Fig. 1. Structural formulae of γ -aminobutyric acid, succinic acid semialdehyde, and γ -hydroxybutyric acid

с помощью гель-хроматографии через Sephadex G-200.

Экспериментальная часть

Очистка γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы осуществлялась из семидневных проростков кукурузы (*Zea mays L.*) сорта Воронежская-76, выращенные гидропонно без добавления питательных растворов при десятичасовом световом дне в климатической камере «LabTech» (Корея) при интенсивности света $90 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и температуре окружающей среды 25°C .

Каталитическая активность γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы в проростках *Zea mays L.* определяли при 25°C (спектрофотометр Evolution 260 Bio, Thermo Fisher Scientific, США) по скорости восстановления НАД^+ до НАДН при длине волны 340 нм в реакционной среде, содержащей: 16 мМ натриевой соли оксимасляной кислоты (Sigma Aldrich, США), 1 мМ НАД^+ , 100 мМ Tris-HCl буфер (pH 9.0). Запуск реакции осуществляли путём добавления ферментного препарата. В качестве контроля использовали среду спектрофотометрирования без добавления энзима [9].

Очистку ГБДГ проводили в несколько этапов при $+4^\circ\text{C}$. Навеску листьев кукурузы гомогенизировали в объемном соотношении 1:10 в среде выделения следующего состава: 0,3 мМ дитиотриетол, 3 мМ динатриевая соль ЭДТА, 0,1 мМ хлорид кальция, 0,05% Tween-80, 0,1 М Tris-HCl буфер (pH 9.0) [8]. Полученный гомогенат центрифугировали 3 мин. при

5000 об/мин, после чего фракционировали с помощью $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ в две стадии. В результате добавления $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ от 0 до 40% насыщения с последующим центрифугированием в течении 30 минут при 12000 об/мин, был получен надосадок, демонстрирующий ГБДГ-активность. В осадке активность исследуемой ферментной системы обнаружена не была. Добавление сульфата аммония к ферментному препарату от 40 до 80% насыщения приводило к выпадению осадка, обладающего ГБДГ-активностью. В надосадочной жидкости не активности ГБДГ обнаружено не было. Полученный осадок ресуспендировали в 50 мМ Tris-HCl буфере (pH 9.0) объемом 2 мл. Удаление солей аммония осуществляли путем гель-фильтрации через сефадекс G-25 (Pharmacia Uppsala, Швеция). Элюция белка осуществлялась с помощью 50 мМ Tris-HCl буфера (pH 9.0). Полученный препарат подвергали ионообменной хроматографии на колонке, заполненной ДЭАЭ-Sephacel (Pharmacia Uppsala, Швеция) [9]. Десорбцию ГБДГ производили путем проведения линейного градиента NaCl от 0,05 до 0,3 М. Регистрировали два пика активности ГБДГ.

Для определения молекулярной массы нативной молекулы ГБДГ дополнительно вводили стадию гель-хроматографии через колонку (1,5x45 см), заполненную сефадексом G-200 (сверхтонкий, GE Healthcare, Швеция).

Молекулярную массу нативной молекулы очищенной ГБДГ определяли путем

регистрации объема выхода ($V_{\text{вых}}$) фермента при прохождении его через колонку, заполненную Sephadex G-200. Расчет молекулярной массы (M_r) γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы осуществляли по формуле [10]:

$$\lg M_r = 6.698 - 0.987 \frac{V_a}{V_b}, \quad (1)$$

где V_a – объем выхода фермента, см^3 ; V_b – свободный объем колонки, см^3 , который определяли с использованием голубого декстрана.

Чистоту полученных ферментных препаратов ГБДГ определяли методом гель-электрофореза в ПААГ по Дэвису при 2-4°C с последующим окрашиванием геля с помощью AgNO_3 [9, 11-13].

Проведение специфического окрашивания электрофореграмм тетразолиевым методом в присутствии в среде проявления натриевой соли γ -гидроксимасляной кислоты позволило подтвердить принадлежность полученных ферментных препаратов к γ -гидроксibuтиратдегидрогеназам [14].

Определение общего количества белка проводили по методу Лоури [15]. Попыты были проведены в трехкратной повторности, каждая проба была проанализирована трижды. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программы STATISTICA 12.0. Представленные в работе различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$) [16].

Обсуждение результатов

В рамках исследования была проведена очистка фермента из 7-дневных зеленых листьев кукурузы и обнаружено две изоформы фермента (табл. 1). Проведение экстракции ферментов с последующей многоступенчатой очисткой позволило получить гомогенные препараты изоформ γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы из проростков *Zea mays* L.

Гомогенный препарат, подверженный центрифугированию обладал ГБДГ-активностью (величина общей активности

составляла 74.9 Е). Удельная активность экстракта составляла 1.85 Е/мг белка. Фракционирование сульфатом аммония (до 80% насыщения) и гель-фильтрация на Sephadex G-25 позволили получить ферментную вытяжку с величиной общей активности 56.57 Е, при этом, значение удельной активности составляло 5.3 Е/мг белка. Проведение ионообменной хроматографии с использованием ДЭАЭ-Sephacel позволило обнаружить два пика активности ГБДГ, которые были десорбированы NaCl линейным градиентом в интервале от 100 до 300 мМ. По итогам этой стадии первая изоформа была очищена до удельной активности 311.48 Е/мг белка, при этом степень очистки составила 168.37 раза, выход составлял 11.22%. Вторая форма (ГБДГ2) получена с удельной активностью 326.84 Е/мг белка, степенью очистки 176.7 раза и выходом 7.74%.

Для определения молекулярной массы нативных молекул полученных препаратов ГБДГ была проведена стадия гель-хроматографии через Sephadex G-200. Очищенный препарат ГБДГ1 имеет молекулярную массу около 60.3 кДа. Вторая изоформа γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы характеризуется молекулярной массой порядка 286 кДа.

Применение метода ПААГ-электрофореза с проявлением электрофореграммы на белок AgNO_3 позволило установить, что оба ферментных препарата были очищены до гомогенного состояния, о чем свидетельствует наличие одной белковой полосы на электрофореграмме каждого ферментного препарата (рис. 2-3).

При помощи тетразолиевого метода проявления была определена принадлежность полученных белковых препаратов к γ -гидроксibuтиратдегидрогеназам (рис. 2-3). Значения электрофоретической подвижности для двух форм фермента составили следующие величины: для ГБДГ1 – 0.44 и ГБДГ2 – 0.13, соответственно.

Таблица 1. Стадии очистки изоформ γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы из листьев кукурузы (n=3, p \leq 0.05)

Table 1. Purification stages of γ -hydroxybutyrate dehydrogenase isoforms from maize leaves (n=3, p \leq 0.05)

Стадия	V, см ³	Количество белка	E	E/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	20	40.5	74.93	1.85	100	1
Гель-хроматография через сефадекс G-200	1	2	0.022	7.56	343.6	10.09
	2	2	0.015	5.8	386.7	7.74

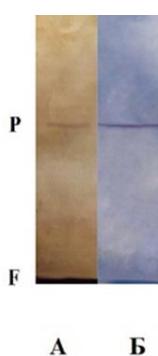


Рис. 2. Электрофореграмма очищенного препарата ГБДГ1 из проростков кукурузы. А – окрашивание ГБДГ1 с использованием AgNO₃, Б – специфическое проявление ГБДГ1, Р – белковая полоса, F – фронт красителя.

Fig. 2. Electrophoregram of purified HBDH1 preparation from maize seedlings. A: staining of HBDH1 using AgNO₃, B: specific manifestation of HBDH1, P: protein band, F: dye front.

Заклучение

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что гидроксibuтиратдегидрогеназы в семидневных проростках кукурузы представлена двумя изоформами. Разработан метод очистки ГБДГ из листьев кукурузы, позволяющий получить фермент в гомогенном состоянии без потери каталитической активности. Удельная активность препаратов по итогам исследования составляла 343.6 и 386.7 Е/мг белка, соответственно.



Рис. 3. Электрофореграмма очищенного препарата ГБДГ2 из проростков кукурузы. А – окрашивание ГБДГ2 с использованием AgNO₃, Б – специфическое проявление ГБДГ2, Р – белковая полоса, F – фронт красителя.

Fig. 3. Electrophoregram of purified HBDH2 preparation from maize seedlings. A: staining of HBDH2 using AgNO₃, B: specific manifestation of HBDH2, P: protein band, F: dye front.

При этом, степень очистки для ГБДГ1 составила 10.1%, для ГБДГ2 – 7.74%.

Использование геля-хроматографии на Sephadex G-200 позволило определить молекулярную массу нативных молекул гидроксibuтиратдегидрогеназы. Установлено, что в семидневных проростках кукурузы исследуемый фермент представлен в низкомолекулярной и высокомолекулярной формах: для ГБДГ1 значение M_r составляло ~60.3 кДа, в то время как для ГБДГ2 молекулярная масса фермента равнялась 286 кДа.



Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые

Список литературы/References

1. Fait A., Fromm H., Walter D., Galili G., Fernie A.R. Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends in plant science*. 2008; 13(1): 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.10.005>
2. Busch K.B., Fromm H. Plant succinic semialdehyde dehydrogenase. Cloning, purification, localization in mitochondria, and regulation by adenine nucleotides. *Plant physiology*. 1999; 121(2): 589-598. <https://doi.org/10.1104/pp.121.2.589>
3. Allan W.L., Peiris C., Bown A.W., Shelp B.J. Gamma-hydroxybutyrate accumulates in green tea and soybean sprouts in response to oxygen deficiency. *Canadian Journal of Plant Science*. 2003; 83(4): 951-953. <https://doi.org/10.4141/P03-085>
4. Shelp B.J., Allan W.L., Faure D. Role of γ -Aminobutyrate and γ -Hydroxybutyrate in Plant Communication. *Plant-Environment Interactions. Signaling and Communication in Plants*. 2009; 1(1): 73-84. https://doi.org/10.1007/978-3-540-89230-4_4
5. Fait A., Yellin A., Fromm H. GABA shunt deficiencies and accumulation of reactive oxygen intermediates: insight from Arabidopsis mutants. *FEBS letters*. 2005; 579(2): 415-420. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.12.004>
6. Kaplan F., Kopka J., Sung D.Y., Zhao W., Popp W., Porat R., Guy C.L. Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of Arabidopsis reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *The Plant Journal*. 2007; 50(6): 967-981. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03100.x>
7. Coleman S.T., Fang T.K., Rovinsky S.A., Turano F.J., Moye-Rowley W.S. Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative

могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(1): 244-250. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007103200>

8. Taxon E.S., Halbers L.P., Parsons S.M. Kinetics aspects of Gamma-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2020; 1868(5): 140376. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140376>

9. Selemenev V.F., SHkutina I.V., Mironenko N.V., Belanova N.A., Sinyayeva L.A., Belanova A.A., Kolomic L.N. Ob osobennostyah stroeniya aktivnogo centra i chetvertichnoj struktury inulinaz. Sorbtsionnyye i khromatograficheskie protsessy. 2023; 23(5): 741-752. <https://doi.org/10.17308/sorp-chrom.2023.23/11692> (In Russ.)

10. Determan G. Gel'-hromatografiya: Gel'-fil'traciya. Gel'-pronikayushchaya hromatografiya. Molekulyarnye sita. Moskva, Mir. 1970. 252 p. (In Russ.)

11. Tulchin N., Ornstein L., Davis B.J. A microgel system for disc electrophoresis. *Analytical biochemistry*. 1976; 72(1-2): 485-490. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90558-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90558-3)

12. Maurer G. Disk-elektroforez: Teoriya i praktika elektroforeza v poliak-rilamidnom gele: Per. s nem. Moskva, Mir, 1971. 247 p. (In Russ.)

13. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry*. 1996; 68(5): 850-858. <https://doi.org/10.1021/ac950914h>

14. Magalhaes J.R., Ju G.C., Rich P.J., Rhodes D. Kinetics of $^{15}\text{NH}_4^+$ assimilation in *Zea mays*: preliminary studies with a glutamate dehydrogenase (GDH1) null mutant. *Plant Physiology*. 1990; 94(2): 647-656. <https://doi.org/10.1104/pp.94.2.647>



15. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Lewis Farr A., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*. 1951; 193(1): 265-275.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)

16. Lakin G.F. *Biometriya*. Moskva, Vysshaya shkola, 1990. 351 p. (in Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

Г.Б. Анохина – ассистент кафедры биохимии и физиологии клетки, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

G.B. Anokhina – assistant, Ph.D (biology) department of biochemistry and cell physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: dowi2009@mail.ru

Е.В. Плотникова – магистр кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

E.V. Plotnikova – master's degree student department of biochemistry and cell physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: kate_plotnikova36@mail.ru

А.Т. Епринцев – профессор кафедры биохимии и физиологии клетки, заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки, д.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

A.T. Eprintsev – prof., grand Ph.D (biology), head of the department of biochemistry and cell physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Статья поступила в редакцию 22.02.2024; одобрена после рецензирования 10.04.2024; принята к публикации 17.04.2024.

The article was submitted 22.02.2024; approved after reviewing 10.04.2024; accepted for publication 17.04.2024.