

А. В. Семеніхін<sup>1</sup>, В. В. Суховієєв<sup>2</sup>, М. В. Пати́ка<sup>3</sup>, В. С. Лукач<sup>1</sup><sup>1</sup> ВП НУБІП України «Ніжинський агротехнічний інститут», Україна  
16600, м. Ніжин, вул. Шевченка, 10. E-mail: [semenihin1964@ukr.net](mailto:semenihin1964@ukr.net)<sup>2</sup> Ніжинський державний університет імені Миколи Гоголя, Україна<sup>3</sup> Національний університет біоресурсів і природокористування України, Україна

## Вплив екзогенних чинників на поліферментну активність РуБісСО та АТФ-синтази хлоропластів з листя гороху

**Мета.** Виділити й очистити білкові комплекси – АТФ-синтазу й РуБісСО – з хлоропластів листя гороху та дослідити вплив на ферментну активність цих білків мікробіологічного добрива «Екстракон» й інгібіторів сульфаніламідної природи – ацетазоламідну й етоксизоламідну.

**Матеріали і методи.** Хлоропласти виділяли з листя двотижневих паростків гороху, білкові комплекси очищених тилакоїдних мембран солубілізували за допомогою дигітоніну (10 мг дигітоніну на 1 мг білка), концентрацію білка визначали за методом Лоурі. Нативний електрофорез зі зміщенням заряду фракції розчинних білків строми хлоропластів та мембранних білків проводили у модифікованій системі *Андерсон та ін., Колісниченко та ін.* Для електрофорезу білка в поліакриламідному гелі (ПААГ) за наявності натрій додецилсульфату використовували модифіковану систему *Леммлі*. Для визначення АТФазної активності в ПААГ використовували методи *Алена і Хінцика*, а також *Гоморі*; візуалізацію карбоангідразної активності в ПААГ виконували за методом *Едвардса і Петтона*.

**Результати та їх обговорення.** Застосовуючи фізико-хімічні методи потенціометрії та спектрофотометрії дослідили АТФазну, карбоангідразну та естеразну активності АТФ-синтази та РуБісСО. Одержані результати свідчать, що специфічні інгібітори карбоангідрози (ацетазоламід та етоксизоламід) також блокують естеразну та АТФазну активності ферментних комплексів. «Екстракон» (мультифункціональний мікробіологічний препарат) майже в 1,5 раза підвищує активності цих ферментів, що свідчить про комплексний активувальний вплив добрива як на світлові, так і на темнові реакції фотосинтезу.

**Висновки.** Запропоновано метод ідентифікації та виділення РуБісСО й АТФ-синтази на основі двовимірного електрофорезу й електрофоретичної елюції, який надає можливість спершу визначати наявність певної ферментної активності комплексів на пластинах ПААГ (експрес-аналіз), а потім вивчати вплив різноманітних чинників ендегенного та екзогенного походження на ферментні властивості електрофоретично чистих ферментів. Перспективним є застосування методу двовимірного електрофорезу як інструменту для оцінювання впливу різноманітних чинників ендегенного й екзогенного походження на рослину клітину й рослину в цілому через постійний моніторинг роботи й активності ферментних систем рослини клітини.

**Ключові слова:** хлоропласти; РуБісСО; АТФ-синтаза; карбоангідроза; естеразна активність; двовимірний електрофорез

**A. V. Semenikhin<sup>1</sup>, V. V. Sukhovieiev<sup>2</sup>, M. V. Patyka<sup>3</sup>, V. S. Lukach<sup>1</sup>**<sup>1</sup> *Separate Division of the National University of Bioresources and Nature Management of Ukraine "Nizhyn Agricultural Institute", Ukraine*<sup>2</sup> *Nizhyn Mykola Gogol State University, Ukraine*<sup>3</sup> *National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Ukraine*

### The effect of exogenous factors on the polyenzymatic activity of RuBisCO and ATP synthase of chloroplasts from pea leaves

**Aim.** To isolate and purify protein complexes – ATP synthase and RuBisCO – from pea leaf chloroplasts and study the effect of a microbiological fertilizer “Extracon” and sulfonamide inhibitors acetazolamide and ethoxazolamide on the enzymatic activity of these proteins.

**Materials and methods.** Chloroplasts were isolated from the leaves of two-week-old pea sprouts, protein complexes of purified thylakoid membranes were solubilized with digitonin (10 mg of digitonin per 1 mg of protein), the protein concentration was determined according to *Lowry*. Native electrophoresis with displacement of the charge of the soluble protein fraction from the chloroplast stroma, as well as membrane proteins, was carried out in the modified system of *Anderson et al., Kolisnichenko et al.* A modified *Lemmley* system was applied to the protein electrophoresis in the polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate. The methods of *Alain and Hintsik*, as well as *Gomorra* were used to determine the ATPase activity in the polyacrylamide gel. Visualization of the carbonic anhydrase activity in the polyacrylamide gel was performed by the method of *Edwards and Petton*.

**Results and discussion.** Using physicochemical methods of potentiometry, spectrophotometry the ATPase, carbonic anhydrase and esterase activities of the enzymes were studied. The results obtained indicate that specific carbonic anhydrase inhibitors (acetazolamide and ethoxazolamide) also block the esterase and ATPase activity of the enzyme complexes. “Extracon” (a multifunctional microbiological preparation) almost 1.5 times increases the activity of the enzymes, showing a complex activating effect of the fertilizer on both light and dark reactions of photosynthesis.

**Conclusions.** The method of identification and isolation of RuBisCO and ATP synthase on the basis of two-dimensional electrophoresis and electrophoretic elution has been proposed. It allows determining the presence of certain enzyme activity of complexes at first in SDS plates (express analysis) and further to study the effect of various factors of endogenous and exogenous origin on the enzymatic properties of electrophoretically pure enzymes. The use of two-dimensional electrophoresis as a tool for assessing the impact of various factors of endogenous and exogenous origin on the plant cell and the plant as a whole through constant monitoring of the work and activity of enzyme systems of the plant cell is promising.

**Key words:** chloroplasts; RuBisCO; ATP synthase; carbonic anhydrase; esterase activity; two-dimensional electrophoresis

## Вступ

Завдяки своїй молекулярній організації – складній четвертинній структурі, наявності пунктів зв'язування ефекторів і конформаційній лабільності – АТФ-синтаза та рибулзобісфосфаткарбоксилаза/оксигеназа (РуБісКО) є місцем впливу різних регулювальних агентів. На сьогодні підтверджено залежність активності цих ферментів від широкого кола фізико-хімічних чинників внутрішньоклітинного середовища. Однак природа метаболітів, що контролюють їхню активність, залишається до кінця не з'ясованою [1, 2].

У протеоміці (вивченні повного білкового й пептидного складу будь-якої системи, наприклад, системи тилакоїдних мембран) широко застосовують метод електрофорезу, що об'єднує методи нативного та денатурувального (за наявності натрій додецилсульфату (ДСН)) електрофорезів – метод двовимірного електрофорезу білка в поліакриламідному гелі (ПААГ) [3–5]. Після розділення білків і білкових комплексів за допомогою нативного електрофорезу (перший напрямок) смужку гелю вирізають, інкубують у присутності ДСН і меркаптоетанолу та вміщують у систему денатурувального ДСН-електрофорезу, наприклад, систему *Леммлі* (другий напрямок). Такий підхід дозволяє аналізувати специфічну ферментну активність складних білкових комплексів з подальшим вивченням їхнього пептидного складу.

У пропонованій роботі висвітлено результати комплексного дослідження карбоангідразної та естеразної активностей найважливішого ферменту темної стадії фотосинтезу – РуБісКО, а також карбоангідразної, естеразної та АТФазної активностей АТФ-синтази хлоропластів з листя гороху. У процесі дослідження вивчено вплив на активності ферментів інгібіторів сульфаніламідної природи (ацетазоламід, етоксизоламід) та мультифункціонального біологічного препарату на основі природного консорціуму ґрунтових мікроорганізмів «Екстракон».

Рослинні поживні рештки сільськогосподарських культур є середовищем для життєдіяльності ґрунтових мікроорганізмів, а після їх трансформації – органічною матрицею для нових ґрунтових агрегатів, джерелом амінокислот, лігніну й поліфенолів, з яких утворюються гумусові речовини. Органічна біомаса збагачує ґрунт значними запасами сполук карбону та нітрогену. Тому надходження в ґрунт органічної речовини рослинних решток є однією з ключових умов оптимізації властивостей і режимів ґрунту, зниження втрат нітрогену мінеральних добрив, підвищення продуктивності сільськогосподарських культур. «Екстракон» – мультифункціональний біологічний препарат на

основі природного консорціуму ґрунтових мікроорганізмів, які тісно пов'язані трофічними взаємозв'язками й перебувають у функціонально-активному стані. Застосування препарату можливе на всіх стадіях зростання та розвитку рослин: підготування і оздоровлення субстрату й ґрунту, передпосівне обробляння насіння, підживлення рослин під час вегетації, післяжнивне використання для активізації трансформації органічних рештків, компостування органічних целюлозовмісних рештків. Застосування препарату «Екстракон» дозволяє:

- ефективно формувати рослинно-мікробні системи через долучення до чинника ризосфери, взаємодіяти з ними шляхом забезпечення поживного режиму;
- постачати кореневій системі рослин необхідні органічні та мінеральні сполуки, поліпшувати функціональний стан рослин, підживлювати й стимулювати зростання і розвиток надземної (у 1,5 рази) і кореневої (у 2 рази) маси вегетуючих рослин, «ефект ризосфери»;
- відновлювати функціональну структуру ґрунтової мікрофлори (видовий склад) і текстуру біоценозу (розподіл по ґрунтовому профілю) за рахунок іммобілізації речовин полісахаридної природи в процесі трансформації соломи;
- усувати токсичність, оздоровлювати субстрат, поліпшувати фітосанітарний стан ґрунту, знижувати стресові умови, викликані застосуванням пестицидів. У разі внесення препарату безпосередньо в субстрат або в разі змочування насіння, розсади чи саджанців відбувається позитивний вплив (стимуляція) на зростання і розвиток рослин.

Препарат не фітотоксичний, безпечний для живих організмів. Трансформація органічних решток – складний і різноспрямований поступовий біологічний процес, здійснюваний різними мікроорганізмами. Саме на цих біологічних законах заснована розробка діючої речовини «Екстракону» – природного консорціуму ґрунтових мікроорганізмів, що виконує всі етапи трансформації будь-яких органічних речовин у біогумус.

За допомогою методів диференційного центрифугування, нативного електрофорезу в ПААГ, електрофорезу за наявності ДСН, двовимірного електрофорезу в ПААГ, спектрофотометрії та потенціометрії вперше виявлено наявність естеразної активності у складі РуБісКО та АТФ-синтази. Запропоновано модифікований метод нативного електрофорезу для отримання аналітичних кількостей електрофоретично чистих ферментів. За допомогою специфічних кольорових реакцій, методів спектрофотометрії та потенціометрії вперше доведено стимулювання складних ферментних систем фотосинтетичного апарату клітини в умовах

виращування рослин (гороху) за наявності в середовищі «Екстракону» – мультифункціонального біологічного препарату.

Отже, мета роботи – з використанням методу двовимірного електрофорезу в ПААГ ідентифікувати та виділити нативні РуБісКО й АТФ-синтазу з хлоропластів листя гороху та дослідити вплив інгібіторів сульфаніламідної природи й «Екстракону» на карбоангідразну й естеразну активності РуБісКО, а також карбоангідразної, естеразної, АТФ-гідролазної активностей АТФ-синтази хлоропластів з листя гороху.

### Матеріали та методи

Хлоропласти виділяли з листя двотижневих паростків гороху [6–8]; білкові комплекси очищених тилакоїдних мембран солюбілізували за допомогою дигітоніну (10 мг дигітоніну на 1 мг білка), концентрацію білка визначали методом Лоурі [9]; нативний електрофорез зі зміщенням заряду фракції розчинних білків строми хлоропластів проводили у модифікованій системі *Андерсон та ін., Колісниченко та ін.* [10, 11]; для електрофорезу білка в ПААГ за наявності ДСН використовували модифіковану систему *Леммлі*, як описано раніше [6–8]. Для визначення АТФ-гідролазної активності в ПААГ використовували методи *Алена і Хінцика* та *Гоморі*; візуалізацію карбоангідразної активності в ПААГ виконували за методом *Едвардса і Петтона* [12, 13].

Естеразну активність у ПААГ виявляли, інкубуючи гелі у буферній системі: 0,2 М фосфатний буфер; міцний синій *RR* сіль; натрієва сіль 2-нафтилацетату. Білкові смуги, що мають естеразну активність, забарвлюються у чорний колір. Карбоангідразну активність вимірювали за допомогою скляного електрода за 2°C в 14 мМ вероналово-му буфері (рН 8,4), за наявності зразка починали

реакцію додаванням води, насиченої CO<sub>2</sub>, за 0°C та вимірювали зміни рН від 8,3 до 7,8; карбоангідразну активність подавали в мкмоль Н<sup>+</sup> на мг білка за хвилину з урахуванням буферної ємності середовища й зразків і визначали титруванням 0,1 М НС1 [14]; естеразну активність визначали за [15] та подавали в мкмоль *n*-нітрофенолу, що утворювався за хвилину після внесення субстрату, у розрахунок на 1 мг білка. АТФазну активність очищеного АТФ-синтазного комплексу визначали за кількістю утвореного фосфату, вимірюючи зміни його концентрації за методом *Лоурі і Лопеса* [16, 17]. Сульфаніламідні інгібітори етоксизоламід (6-етокси-2-бензотіазолсульфонамід, Sigma) та ацетазоламід (N-[5-(аміноссульфоніл)-1,3,4-тіадіазол-2-іл]ацетамід, Sigma) розчиняли в диметилсульфоксиді. Мультифункціональний мікробіологічний препарат «Екстракон» додавали в середовище вирощування гороху в концентраціях 25, 40 та 50 г/л.

### Результати та їх обговорення

Після ідентифікації РуБісКО за допомогою нативного електрофорезу (рис. 1А) та електрофорезу в другому напрямку (рис. 2) проводили визначення карбоангідразної (рис. 3) та естеразної (дані електрофорезу не наведено) активностей РуБісКО в ПАА-гелях. Результати визначення дозволили дослідити й порівняти вплив інгібіторів сульфаніламідної природи на зазначені ферментні активності (табл. 1 та 2). Розчин очищеного нативного РуБісКО отримували після проведення електрофоретичної елюції білка зі смужки ПАА-гелю, яку вирізали з пластин ПААГ після проведення нативного електрофорезу (рис. 1А та 1В).

Результати дослідження впливу ліпофільного етоксизоламіду та водорозчинного ацетазоламіду на ферментні активності РуБісКО свідчать,

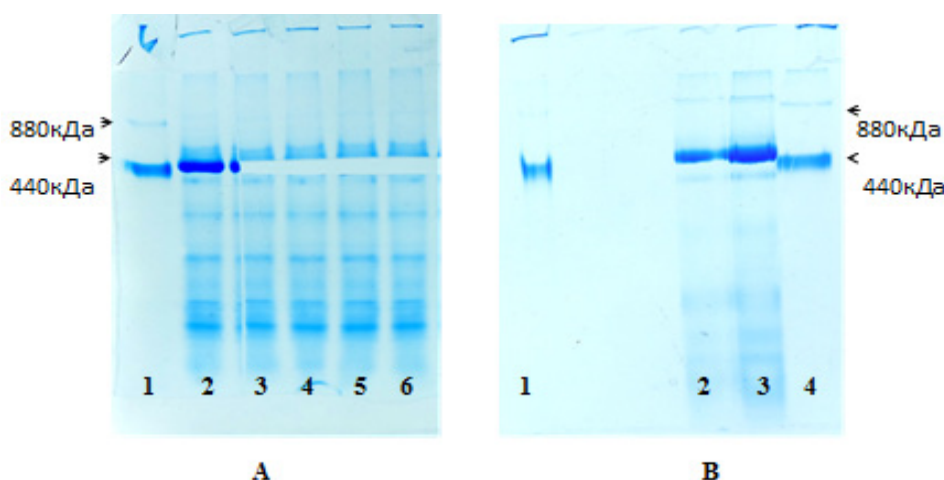


Рис. 1. Схема отримання електрофоретично чистого нативного РуБісКО з хлоропластів гороху: **А** – електрофореграма розчинних нативних білків строми хлоропластів гороху в ПААГ (1 – білки маркери, 2–6 – смужки гелю, що вирізали в зоні розташування РуБісКО для проведення електрофоретичної елюції білка); **В** – електрофореграма розчинних нативних білків строми хлоропластів гороху в ПААГ (1 – хроматографічно чистий РуБісКО, 4 – білки-маркери)



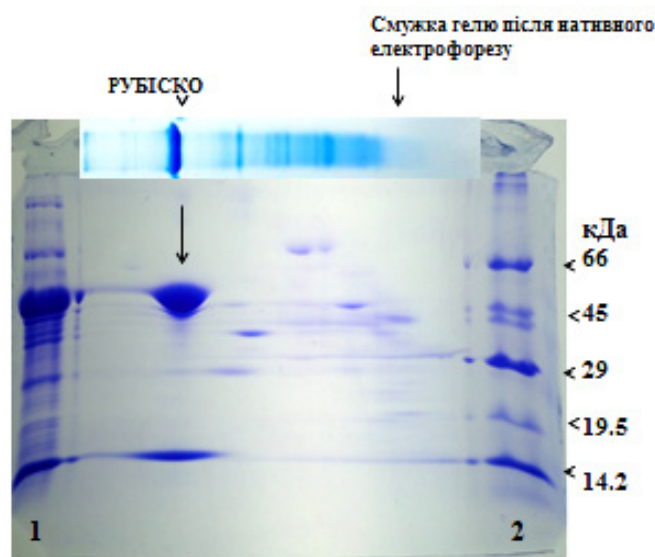


Рис. 2. Електрофорез у другому напрямку (система Леммлі) розчинних нативних білків строми хлоропластів гороху: 1 – пептидний склад стромальних білків хлоропластів; 2 – білки-маркери (66 – альбумін з бичачої сироватки, 45 – альбумін з білка курячого яйця, 29 – карбоангідраза, 19,5 – феритин, 14,2 –  $\alpha$ -лактальбумін)

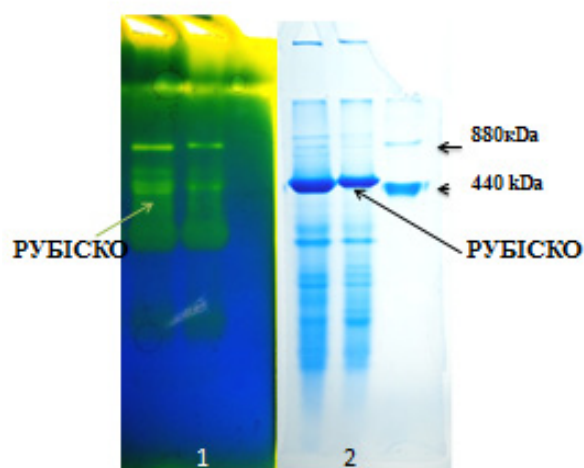


Рис. 3. Електрофореграма розчинних нативних білків строми хлоропластів гороху в ПААГ: 1 – гель, проінкубований у середовищі для визначення карбоангідразної активності; 2 – гель, оброблений барвником кумасі G-250

Таблиця 1

Вплив етоксизоламіду на ферментну активність Рубіско з хлоропластів гороху

Етоксизоламід, мкМ	Карбоангідразна активність, мкмоль $H^+$ /(мг білка $\times$ хв)	Естеразна активність, мкмоль <i>n</i> -нітрофенолу/(мг білка $\times$ хв)
2	130,0 $\pm$ 8,5	20,00 $\pm$ 0,44
5	125,0 $\pm$ 8,0	15,00 $\pm$ 0,37
10	100,0 $\pm$ 7,5	10,00 $\pm$ 0,24
20	30,0 $\pm$ 3,0	4,10 $\pm$ 0,18
50	10,0 $\pm$ 1,4	0
100	0	0
200	0	0
Контроль	140,0 $\pm$ 10,5	20,00 $\pm$ 0,45

Таблиця 2

Вплив ацетазоламіду на ферментну активність Рубіско з хлоропластів гороху

Ацетазоламід, мкМ	Карбоангідразна активність, мкмоль $H^+$ /(мг білка $\times$ хв)	Естеразна активність, мкмоль <i>n</i> -нітрофенолу/(мг білка $\times$ хв)
2	125	15,00 $\pm$ 0,44
5	80,0 $\pm$ 8,0	10,00 $\pm$ 0,37
10	50,0 $\pm$ 7,5	4,30 $\pm$ 0,19
20	30,0 $\pm$ 2,1	2,00 $\pm$ 0,09
50	0	0
100	0	0
200	0	0
Контроль	140,0 $\pm$ 8,5	20,00 $\pm$ 0,45

що сульфаніламідні інгібітори гальмують як карбоангідразну, так і естеразну активності. Але динаміка цих процесів має свої особливості (табл. 1 та 2).

Додавання в середовище вирощування гороху «Екстракону» в концентрації 50 г/л стимулювало підвищення як карбоангідразної, так і естеразної активності Рубіско майже у 1,5 раза проти контрольних рослин (табл. 3).

АТФ-синтазу в дигітоніновому екстракті тилакоїдних мембран відокремлювали від інших пігмент-білкових та білкових комплексів за допомогою методу нативного електрофорезу в ПААГ (рис. 4А). Доказом того, що білкова смуга на електрофореграмі в зоні 850 кДа є саме АТФ-синтазним комплексом, слугувала наявність у цій білковій зоні АТФ-гідролазної активності (рис. 4Б) та субодичної складової цього комплексу, визначеної після проведення електрофорезу в денатурувальних умовах у присутності ДСН (рис. 5).

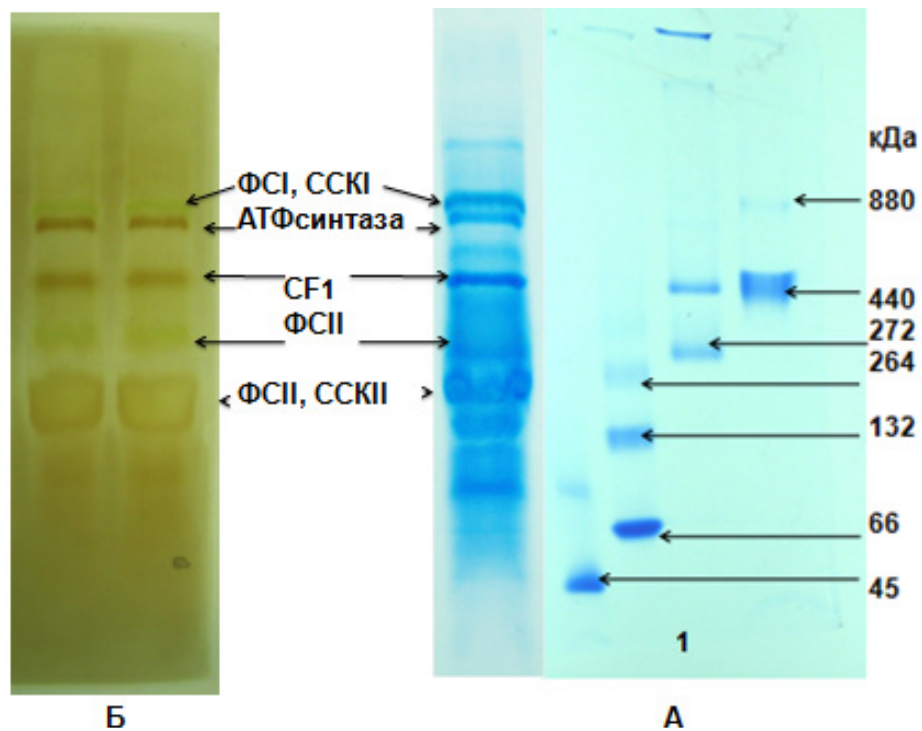


Рис. 4. Електрофореграма солюбілізованих нативних протеїнових комплексів тилакоїдних мембран гороху в ПААГ: **А** – гель, оброблений барвником кумасі G-250 (1 – протеїни-маркери); **Б** – гель, проінкубований у середовищі для визначення АТФ-гідролазної активності

Таблиця 3

Вплив «Екстракону» на ферментну активність Рубіско з хлоропластів гороху

«Екстракон», г/л	Карбоангідразна активність, мкмоль $H^+$ /мг білка $\times$ хв	Естеразна активність, мкмоль <i>p</i> -нітрофенолу/мг білка $\times$ хв
25	150,0 $\pm$ 11,0	22,00 $\pm$ 0,54
40	180,0 $\pm$ 14,0	30,00 $\pm$ 0,72
50	210,0 $\pm$ 15,0	35,00 $\pm$ 0,85
Контроль	140,0 $\pm$ 8,5	20,00 $\pm$ 0,45

Розчин очищеного нативного АТФ-синтазного комплексу отримували після проведення електрофоретичної елюції білка зі смужки ПАА-гелю, яку вирізали з пластин ПААГ після проведення нативного електрофорезу (рис. 6).

Результати дослідження впливу ліпофільного етоксизоламідів та водорозчинного ацетазоламідів на ферментні активності АТФ-синтазного комплексу свідчать про те, що сульфаниламідні інгібітори гальмують як карбоангідразну, так і АТФазну й естеразну активності. Але динаміка цих процесів має свої особливості (табл. 4 та 5).

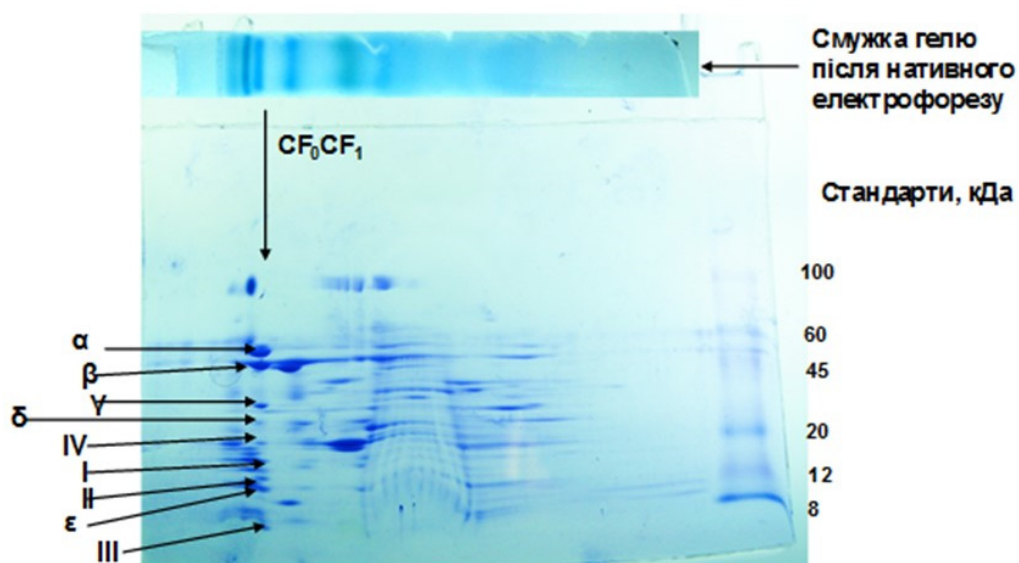


Рис. 5. Електрофорез у другому напрямку (система Лемлі) пігмент-білкових комплексів тилакоїдних мембран

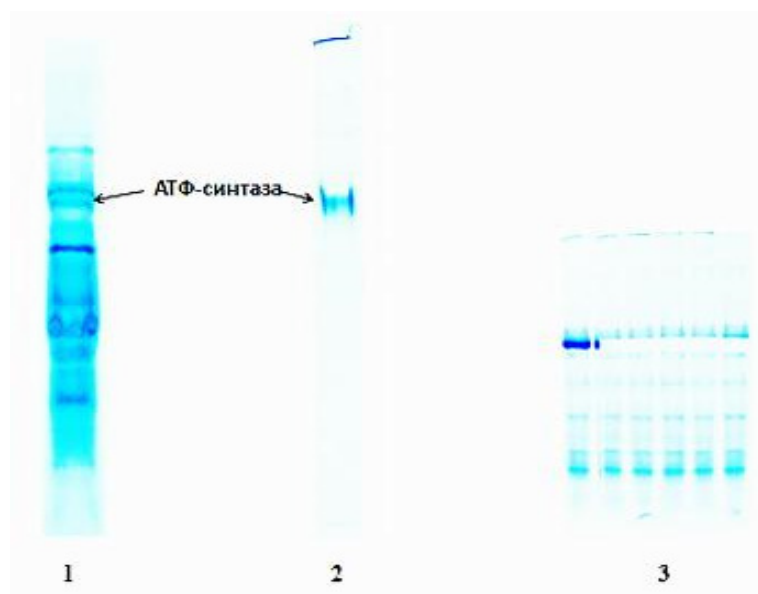


Рис. 6. Схема отримання очищеного АТФ-синтазного комплексу: **1** – електрофореграма дигітонінового екстракту тилакоїдів; **2** – електрофореграма розчину АТФ-синтази, що отримали після електрофоретичної елюції; **3** – пластина ПААГ, з якого вирізано смужку гелю в зоні розташування АТФ-синтазного комплексу

Стимулювальна дія «Екстракону» на ферментну активність АТФ-синтази є доказом ефективності мікробіологічного добрива щодо підвищення врожайності культур сільськогосподарських

рослин, відтворення родючості ґрунтів за рахунок оптимізації ризосферних взаємодій між ґрунтовими бактеріями та кореневою системою рослин (табл. 6).

**Таблиця 4**

Вплив етоксизоламідів на ферментну активність АТФ-синтази

Етоксизоламід, мкМ	АТФазна активність, мкмоль Рн/(мг білка × хв)	Карбоангідразна активність, мкмоль Н <sup>+</sup> /(мг білка × хв)	Естеразна активність, мкмоль <i>p</i> -нітрофенолу/(мг білка × хв)
2	5,20 ± 0,26	85,0 ± 8,5	9,80 ± 0,44
5	5,40 ± 0,27	80,0 ± 8,0	8,20 ± 0,37
10	4,90 ± 0,24	75,0 ± 7,5	5,30 ± 0,24
20	3,40 ± 0,17	37,0 ± 3,7	4,10 ± 0,18
50	2,80 ± 0,14	14,0 ± 1,4	2,50 ± 0,11
100	1,20 ± 0,06	0	0,500 ± 0,023
200	0,40 ± 0,02	0	0
Контроль	5,50 ± 0,26	85,0 ± 8,5	10,00 ± 0,45

**Таблиця 5**

Вплив ацетозоламідів на ферментну активність АТФ-синтази

Ацетозоламід, мкМ	АТФазна активність, мкмоль Рн/(мг білка × хв)	Карбоангідразна активність, мкмоль Н <sup>+</sup> /(мг білка × хв)	Естеразна активність, мкмоль <i>p</i> -нітрофенолу/(мг білка × хв)
2	5,20 ± 0,26	85,0 ± 8,5	9,80 ± 0,44
5	5,40 ± 0,27	80,0 ± 8,0	8,20 ± 0,37
10	4,90 ± 0,24	75,0 ± 7,5	4,30 ± 0,19
20	3,40 ± 0,17	21,0 ± 2,1	4,10 ± 0,18
50	2,80 ± 0,14	5,0 ± 0,5	2,00 ± 0,09
100	0,40 ± 0,02	0	0
200	0	0	0
Контроль	5,50 ± 0,28	85,0 ± 8,5	10,00 ± 0,45

Таблиця 6

## Вплив «Екстракону» на ферментну активність АТФ-синтази

«Екстракон», г/л	АТФазна активність, мкмоль Рн/(мг білка × хв)	Карбоангідразна активність, мкмоль Н <sup>+</sup> /(мг білка × хв)	Естеразна активність, мкмоль п-нітрофенолу/ (мг білка × хв)
25	6,00 ± 0,28	90,0 ± 9,0	12,5 ± 0,5
40	6,80 ± 0,30	100,0 ± 10,0	14,00 ± 0,56
50	7,50 ± 0,32	120,0 ± 12,0	17,5 ± 0,7
Контроль	5,50 ± 0,28	85,0 ± 8,5	10,00 ± 0,45

## Висновки

Запропонований метод ідентифікації та виділення РуБісКО та АТФ-синтази на основі двовимірного електрофорезу й електрофоретичної елюції надає можливість спершу визначити наявність певної ферментної активності комплексів у пластинах ПААГ (експрес-аналіз), а потім вивчати вплив різноманітних чинників ендогенного й екзогенного походження на ферментні властивості електрофоретично чистих ферментів.

На нашу думку, перспективним є застосування методу двовимірного електрофорезу як інструменту оцінювання впливу різноманітних чинників зовнішнього середовища на рослинну клітину та рослину загалом. Контроль роботи та активності ключових ферментних систем метаболізму рослинної клітини дасть можливість оцінювати стан рослини й не тільки прогнозувати врожайність, а й оптимізувати системи удобрення, зрошування тощо.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

## References

- Junge, W.; Nelson, N. ATP Synthase. *Annu. Rev. Biochem.* **2015**, *84* (1), 631-657. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034124>.
- Malyan, A. N. Noncatalytic nucleotide binding sites: properties and mechanism of involvement in ATP synthase activity regulation. *Biochemistry (Moscow)* **2013**, *78* (13), 1512–1523. <https://doi.org/10.1134/s0006297913130099>.
- Schägger, H.; Cramer, W. A.; von Jagow, G. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* **1994**, *217* (2), 220–230. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1112>.
- Srivastava, K.; Chaves, J. M.; Srivastava, O. P.; Kirk, M. Multi-crystallin complexes exist in the water-soluble high molecular weight protein fractions of aging normal and cataractous human lenses. *Experimental eye research* **2008**, *87* (4), 356–66. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.07.001>.
- Wittig, I.; Karas, M.; Schägger, H. High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-gel Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Protein Complexes. *Molecular & Cellular Proteomics* **2007**, *6* (7), 1215–1225. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700076-MCP200>.
- Semenihin, A. V. Karboanhidrazna aktyvnist chynnyka spriazhennia CF<sub>1</sub>, izolovanoho z khloroplastiv shpynatu [Carbonic anhydrase activity of coupling factor CF<sub>1</sub> isolated from spinach chloroplasts, in Ukrainian]. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine* **2014**, *9*, 141–145. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2014.09.141>.
- Semenihin, A. V.; Zolotareva, O. K. Carbonic anhydrase activity of integral-functional complexes of thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *The Ukrainian Biochemical Journal* **2015**, *87* (3), 47–56. <https://doi.org/10.15407/ubj87.03.047>.
- Semenihin, A. V.; Repanka, S. V.; Sukhovieiev, V. V.; Hurbuz, M. F. Metod dvokhvimirnogo elektroforezu u doslidzhenni polifermentnykh vlastyvoitei ATF-syntazy khloroplastiv shpynatu. In *Fundamentalni ta prykladni doslidzhennia v suchasni khimii*, Materialy V Mizhnarodnoi zaochnoi naukovo-praktychnoi konferentsii molodykh uchenykh [Method of two-dimensional electrophoresis in the study of polyenzyme properties of ATP synthase of spinach chloroplasts. In *Basic and applied research in modern chemistry*, Proceedings of the V International Correspondence Scientific and Practical Conference of Young Scientists], Nizhyn, Apr 12, 2018; Sukhovieieva, V. V., Ed.: Nizhyn Mykola Gogol State University: Nizhyn, 2018; 119–123 (in Ukrainian).
- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A. L.; Randall, R. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *J. Biol. Chem.* **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).
- Andersson, L.-O.; Borg, H.; Mikaelsson, M. Molecular weight estimations of proteins by electrophoresis in polyacrylamide gels of graded porosity. *FEBS Lett.* **1972**, *20* (2), 199–202. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(72\)80793-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(72)80793-2).
- Kolesnichenko, A. V.; Ostroumova, E. A.; Zykova, V. V.; Vojnikov, V. K. Belki chetyrehk vidov zlakov, immunohimicheski rodstvennye stressovomu belku 310 kD. *Fiziologiya rastenij* [Proteins of four types of cereals, immunochemically related to the stress protein 310 kD. *Plants physiology*] **2000**, *47* (2), 199–202 (in Russian).
- Allen, J. M.; Hyncik, G. Localization of alkaline phosphatases in gel matrices following electrophoresis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **1963**, *11* (2), 169–175. <https://doi.org/10.1177/11.2.169>.
- Gomori, G. Preparation of buffers for use in enzyme studies. In *Methods Enzymol.*, Academic Press: 1955; Vol. 1, pp 138–146.
- Ignatova, L. K.; Rudenko, N. N.; Mudrik, V. A.; Fedorchuk, T. P.; Ivanov, B. N. Carbonic anhydrase activity in Arabidopsis thaliana thylakoid membrane and fragments enriched with PSI or PSII. *Photosynth Res* **2011**, *110* (2), 89–98. <https://doi.org/10.1007/s11120-011-9699-0>.
- Wynne, D.; Ginsburg, S.; Shalitin, Y. Beef liver esterase: II. Kinetic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **1973**, *154* (1), 204–211. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(73\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(73)90050-7).
- Lowry, O. H.; Lopez, J. A. The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. *J. Biol. Chem.* **1946**, *162* (3), 421–428. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)41386-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)41386-X).
- Nikulina, G. I. *Obzor metodov kolorimetriceskogo opredeleniya fosfora po obrazovaniyu molibdenovoj sini* [Review of methods for the colorimetric determination of phosphorus by the formation of molybdenum blue]; Nauka: Moscow-Leningrad, 1965 (in Russian).

Received: 24. 05. 2021

Revised: 03. 08. 2021

Accepted: 11. 08. 2021