



УДК 577.151.32

## Выделение изоформ сукцинатдегидрогеназы из зеленых листьев кукурузы методом ионообменной хроматографии

Федорин Д.Н., Карабутова Л.А., Покусина Т.А., Епринцев А.Т.

*ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж*

Поступила в редакцию 18.05.2016 г.

С помощью метода ионообменной хроматографии на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой получены электрофоретически гомогенные препараты сукцинатдегидрогеназы (СДГ, КФ 1.3.99.1) из зеленых листьев кукурузы с удельной активностью 0.768 Е/мг белка (для первой изоформы) и 0.492 Е/мг белка (для второй изоформы); выходом 0.91 и 0.94%; степенью очистки 64 раз и 41 раз соответственно. Показано, что изоформа СДГ<sub>2</sub> ингибируется при более низких концентрациях АТФ, чем форма СДГ<sub>1</sub>.

**Ключевые слова:** сукцинатдегидрогеназа, изоформы, ионообменная хроматография, электрофорез, кукуруза.

## Isolation of succinate dehydrogenase isoform from green leaves of maize by ion exchange chromatography

Fedorin D.N., Karabutova L.A., Pokusina T.A., Eprintsev A.T.

*Voronezh State University, Voronezh*

Succinate dehydrogenase is an enzyme complex that participates in the course of the catabolic anaerobic metabolism and in particular in the tricarboxylic acid cycle, electron transport chain, gluconeogenesis. It is known that plant organisms encountered several forms of the enzyme, particularly in maize and Arabidopsis seeds 4 forms SDH detected. Succinate dehydrogenase structure study is an important task, since the change in the spatial organization of the configuration of the protein molecule ultimately determines its functional properties required of the metabolic fluxes. Poorly understood is the question of the mechanisms of regulation at the level of SDH cell metabolites.

Succinate dehydrogenase isoenzyme spectrum research in green leaves of maize by polyacrylamide gel electrophoresis followed by specific staining for SDH activity showed the presence of two forms with different electrophoretic mobility, probably with different functions in the cell. 5-step purification was carried out to obtain a highly purified preparation of SDH from green leaves of corn. As defining purification steps were carried out ion exchange chromatography, will highlight some of the test forms of the enzyme in a homogeneous state.

Homogeneous preparations of succinate dehydrogenase was used to study their regulatory characteristics. Investigation of the effect of ATP concentration on the activity SDH<sub>1</sub> and SDH<sub>2</sub> showed difference in their functioning. Both isoforms are inhibited by high ATP concentrations, however, to form SDH<sub>1</sub> significant decrease in activity observed at concentrations higher than 50 microM and for form SDH<sub>2</sub> - at more than 20 mM. Consequently, we can assume that it is capable of being ATP regulatory component of cells, controlling the rate of oxidative metabolism in the succinate dehydrogenase level in terms of an active photosynthesis.

**Keywords:** succinate dehydrogenase, isoforms, ion exchange chromatography, electrophoresis, maize.

## Введение

Растительная клетка характеризуется наличием фотосинтетической ЭТЦ, синтезирующей АТФ на свету. Взаимосвязь фотосинтеза и дыхания является необходимой для координации энергетического метаболизма в фотосинтезирующих тканях растений. Несомненный интерес представляют исследования механизмов регуляции ферментов цикла Кребса путем прямого действия факторов на белковую молекулу энзимов, в частности сукцинатдегидрогеназу, участвующую в функционировании ЦТК и ЭТЦ.

Сукцинатдегидрогеназа является полифункциональным ферментным комплексом и участвует в протекании катаболического и анаболического метаболизма [1]. Известно, что в растительных организмах встречаются несколько форм фермента, в частности в щитке кукурузы и семенах арабидопсиса обнаружено 4 формы СДГ [2]. Основной функцией СДГ является участие в дыхательном метаболизме. СДГ единственный фермент ЦТК, встроенный во внутреннюю мембрану митохондрий, при этом он компонент не только цикла Кребса, но и электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), поэтому его регуляция связана с функционированием сразу двух процессов окислительного метаболизма клетки [3].

Исследование структуры сукцинатдегидрогеназы является важной задачей, так как изменение пространственной организации конфигурации белковой молекулы в конечном итоге определяет ее функциональные свойства, которые реализуются на уровне организма (рис. 1). Слабо изученным остается вопрос о механизмах регуляции СДГ на уровне метаболитов клетки.

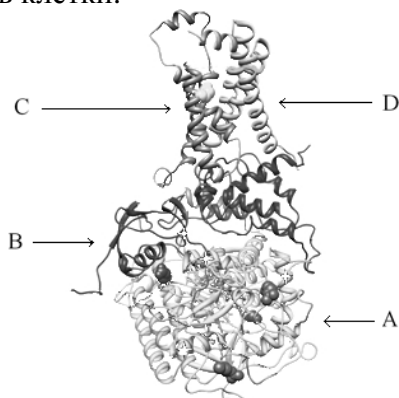


Рис. 1. Структурная организация сукцинатдегидрогеназы. А – флавопротеин, В – железо-серная субъединицы, С и D – мембраносвязанные субъединицы, содержащие гемм b.

Сукцинатдегидрогеназа, являясь модулируемым многими факторами ферментом, занимает ключевое положение в регуляции окислительного метаболизма и играет важную роль в обеспечении взаимодействия дыхания и фотосинтеза в клетках растений. В связи с этим, целью работы явилось получение высокоочищенных препаратов сукцинатдегидрогеназы из зеленых листьев кукурузы с помощью ионообменной хроматографии и изучение их свойств.

## Эксперимент

В качестве объектов исследования использовали листья 14-дневных проростков кукурузы (*Zea mays* L.) сорта «Воронежская 76», выращенные гидропонным ме-

тодом с интенсивностью света 25 Дж/(м<sup>2</sup> с) при температуре 20°C и 12-часовом световом дне.

Активность фермента определяли на СФ-2000 (ЛОМО, Россия) спектрофотометрическим методом, основанным на использовании искусственных акцепторов электронов с соответствующим редокс-потенциалом [4]. Содержание белка в пробе определили по методу Лоури [5].

Для очистки фермента применяли 5-ти стадийную схему очистки. Навеску растительного материала (1 г) гомогенизировали в соотношении 1:10 со средой выделения: 50 мМ Трис-НСl-буфера, рН 7.5, содержавшего 0.3 М сахарозу, 2.5 мМ ЭДТА, 1 мМ КСl и 4 мМ MgCl<sub>2</sub>. Выделение митохондрий осуществляли дифференцированным центрифугированием [4]. Осадок, содержащий в основном митохондрии и микротельца, ресуспендировали в 1 см<sup>3</sup> среды, содержащей 10 мМ фосфатный буфер (рН 7.8), 0.01% тритон Х-100, 20 мМ сукцинат натрия. Фракционирование сульфатом аммония с последующей гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25. Из митохондриальных белков выделяли 20-60% фракцию насыщения сульфатом аммония. Полученный ферментативный препарат наносили на колонку, заполненную сефадексом G-25, для освобождения от низкомолекулярных примесей. Элюцию осуществляли 10 мМ фосфатным буфером (рН 7.8), содержащим 20 мМ сукцинат натрия, со скоростью 15-20 см<sup>3</sup> в час. Ионообменную хроматографию проводили на колонке с ДЕАЕ-целлюлозе, предварительно уравновешенную 30 мМ фосфатным буфером (рН 7.8), содержащим 30 мМ КСl [6, 7]. Фермент десорбировали с колонки линейным градиентом концентрации КСl в среде элюирования следующего состава: 20 мМ фосфатный буфер (рН 6.2), содержащий 20 мМ сукцинат.

Электрофоретические исследования белков проводили в 7.5% полиакриламидном геле [8]. Универсальное окрашивание белков в гелях осуществляли с помощью AgNO<sub>3</sub> [9], для специфической идентификации СДГ использовали тетразолиевый метод со средой следующего состава: калий-фосфатный буфер 0.1 М (рН 7.5), 0.1 М сукцинат натрия, 0.5 мг/см<sup>3</sup> нитросинего тетразолия и 1 мг/см<sup>3</sup> феназин метасульфата.

## Обсуждение результатов

Исследование изоферментного спектра сукцинатдегидрогеназы в зеленых листьях кукурузы методом электрофореза в 7.5% ПААГ с последующим специфическим окрашиванием на активность СДГ показало, наличие двух форм с различной электрофоретической подвижностью (рис. 2). Наличие нескольких форм сукцинатдегидрогеназы в организмах различного уровня организации было показано ранее как для прокариот [10], так и для эукариот [11, 12].

Для получения высокоочищенного препарата СДГ из зеленых листьев кукурузы была проведена 5-стадийная очистка, результаты которой представлены в таблице 1. После десорбции фермента с ДЕАЕ-целлюлозы линейным градиентом КСl (50-250 мМ) получены два препарата, обладающих сукцинатдегидрогеназной активностью. Удельная активность для первой изоформы фермента (СДГ<sub>1</sub>) равнялась 0.768 Е/мг белка, при этом степень очистки составила 64 раз, выход – 0.91%. Для второй изоформы (СДГ<sub>2</sub>) значение удельной активности было 0.492 Е/мг белка, а степень очистки и выход – 41 раз и 0.94%, соответственно.

В качестве определяющей стадии очистки осуществляли ионообменную хроматографию, позволившую получить исследуемый фермент в высокоочищенном состоянии. Элюцию фермента с колонки осуществляли линейным градиентом хлорида

калия от 50 до 250 мМ и содержанием сукцината натрия в среде 20 мМ. Показано, что первая форма (СДГ<sub>1</sub>) десорбируется с ДЕАЕ-целлюлозы при концентрации хлорида калия 46.9 мМ, а вторая форма (СДГ<sub>2</sub>) при 109.4 мМ, что может указывать на различие в структурной организации полипептидных компонентов двух форм сукцинатдегидрогеназы.

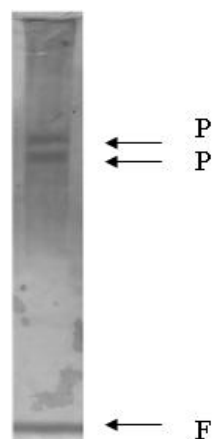


Рис. 2. Изоферментный состав сукцинатдегидрогеназы в зеленых листьях 14-дневных проростков кукурузы. P – белковая полоса, F – фронт красителя бромфенолового синего.

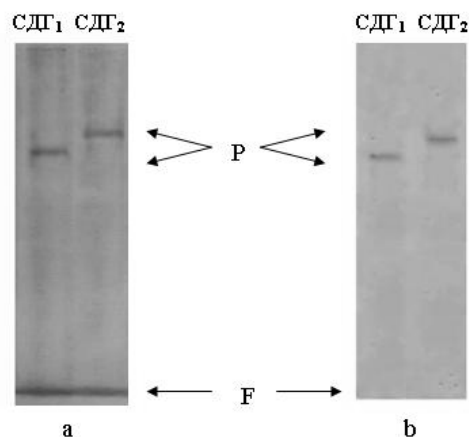


Рис. 3. Электрофореграммы препаратов СДГ зеленых листьев 14-дневных проростков кукурузы: (а) – специфическое проявление, (б) – окрашивание нитратом серебра, F – фронт красителя бромфенолового синего.

Таблица 1. Очистка сукцинатдегидрогеназы из зеленых листьев кукурузы (n=3, p<0.05)

Стадия очистки	Объем, мл	Общий белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	9.3	124.062	1.488	0.012	100	1
Фракция митохондрий	8.4	17.388	1.349	0.076	14,02	6.3
Фракционирование сульфатом аммония	1	4.265	0.642	0.151	3,44	12.5
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	2	4.025	0.640	0.159	3,24	13.3
Хроматография на ДЕАЕ-целлюлозе	1	3	1.125	0.864	0,91	64
	2	3	1.170	0.576	0,94	41

Аналитический электрофорез очищенных препаратов показал, что при универсальном окрашивании на белки обнаруживалось по одной белковой полосе (рис. 3) в каждого образце полученного препарата СДГ. Установлено, что в зеленых листьях кукурузы присутствуют две формы фермента, имеющие разную электрофоретическую подвижность: СДГ<sub>1</sub> с  $R_f=0.31$  и СДГ<sub>2</sub> с  $R_f=0.25$ .

Получение гомогенных препаратов СДГ позволило провести изучение их регуляторных характеристик. Исследование влияния концентрации АТФ на активность СДГ<sub>1</sub> и СДГ<sub>2</sub> показало различие в их функционировании. Обе изоформы ингибируются высокими концентрациями АТФ, однако, для формы СДГ<sub>1</sub> значительное снижение активности наблюдается при концентрациях более 50 мкМ, а для формы СДГ<sub>2</sub>

- при более 20 мкМ.

Полученные результаты по влиянию энергетического эквивалента клетки (АТФ) позволяют предположить, что его высокие концентрации угнетают работу обеих изоформ сукцинатдегидрогеназы. Следовательно, можно предположить, что именно АТФ способна быть регуляторным компонентом клетки, контролирующим скорость окислительного метаболизма на уровне сукцинатдегидрогеназы в условиях активно функционирующего фотосинтеза.

### Заключение

Таким образом, был разработан эффективный способ очистки СДГ из зеленых листьев кукурузы, включающий ионообменную хроматографию. В качестве определяющей стадии очистки осуществляли ионообменную хроматографию, позволившую получить две формы исследуемого фермента в гомогенном состоянии, что подтверждается результатами электрофоретического исследования с универсальным окрашиванием на белок. Показано, что все формы СДГ десорбируются с ДЕАЕ-целлюлозы при разных концентрациях хлорида калия, что может указывать на различие в структурной организации полипептидных компонентов изоформ сукцинатдегидрогеназы. Полученные в гомогенном состоянии препараты исследуемого фермента позволили изучить их регуляторные свойства, так показано ингибирующее действие высокие концентрации энергетического эквивалента клетки (АТФ) на скорость функционирования обеих изоформ сукцинатдегидрогеназы, что может быть одним из механизмов регуляции интенсивности окислительного метаболизма.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта  
Российского Научного Фонда №14-14-00721.*

### Список литературы

1. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Шевченко М.Ю. Глиоксилатный цикл. Универсальный механизм адаптации? М. Академкнига. 2007. 228 с.
2. Епринцев А.Т. и др. // *Известия РАН. Серия биологическая*. 2010. № 3. С. 324-332.
3. Pastore D., Trono D., Laus M.N. // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. pp. 32567-32574.
4. Землянухин А.А., Землянухин Л.А. Большой практикум по физиологии и биохимии растений. Воронеж: изд-во Воронеж. ун-та. 1996. 185 с.
5. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. pp. 265-275.
6. Селеменев В.Ф., Рудаков О.Б., Славинская Г.В., Дроздова Н.В. М.: ДеЛи принт. 2008. 246 с.
7. Karpov S.I., Matveeva M.V., Selemenev V.F. // *Russian Journal of Physical Chemistry* A. 2001. Vol. 75. No 2. pp. 266-271.
8. Davis B.J. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994. Vol. 121. pp. 404-427.
9. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. // *Anal. Chem.* 1996. Vol. 68. pp. 850-858.
10. Бу Т.Л., Селиванова Н.В., Епринцев А.Т., Федорин Д.Н. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2011. Т. 11. Вып. 6. С. 900-904.
11. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Федорин Д.Н. Сукцинатдегидрогеназа высших растений. Воронеж: ООО Центрально-Черноземное книжное изд-во. 2010, 184 с.
12. Епринцев А.Т. и др. // *Физиология растений*. 2012. Т. 59. № 3. С. 332-340.

## References

1. Eprincev A.T., Popov V.N., Shevchenko M.Ju. Glioksilatnyj cikl. Universal'nyj mehanizm adaptacii? M, Akademkniga, 2007, 228 p.
2. Eprincev A.T. et al., *Izvestija RAN. Serija biologicheskaja*. 2010, No 3, pp. 324-332.
3. Pastore D., Trono D., Laus M.N. *J. Biol. Chem.*, 2001, Vol. 276, pp. 32567-32574.
4. Zemljanuhin A.A., Zemljanuhin L.A., Bol'shoj praktikum po fiziologii i biohimii rastenij, Voronezh: izd-vo Voronezh. un-ta, 1996, 185 p.
5. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., *J. Biol. Chem.*, 1951, Vol. 193, pp. 265-275.
6. Selemenev V.F., Rudakov O.B., Slavinskaja G.V., Drozdova N.V., M., DeLi print, 2008, 246 p.
7. Karpov S.I., Matveeva M.V., Selemenev V.F., *Russian Journal of Physical Chemistry A.*, 2001, Vol. 75, No 2, pp. 266-271.
8. Davis B.J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1994, Vol. 121, pp. 404-427.
9. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M., *Anal. Chem.*, 1996, Vol. 68, pp. 850-858.
10. Vu T.L., Selivanova N.V., Eprincev A.T., Fedorin D.N., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2011, Vol.11, No 6, pp. 900-904.
11. Eprincev A.T., Popov V.N., Fedorin D.N. Sukcinatdegidrogenaza vysshih rastenij, Voronezh, OOO Central'no-Chernozemnoe knizhnoe izd-vo, 2010, 184 p.
12. Eprincev A.T., Fedorin D.N., Selivanova N.V. et al., *Fiziologija rastenij*, 2012, Vol. 59., No 3, pp. 332-340.

**Федорин Дмитрий Николаевич** – к.б.н., кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

**Карабутова Людмила Александровна** – аспирант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

**Покусина Татьяна Александровна** – магистр, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, тел.(473)2208877

**Епринцев Александр Трофимович** – д.б.н., проф., кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

**Fedorin Dmitry Nicolaievich** – Ph.D of Biology, Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: [rybolov@mail.ru](mailto:rybolov@mail.ru)

**Karabutova Lyudmila Alexandrovna** - post-graduate student, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: [lyudmilakarabutova@bk.ru](mailto:lyudmilakarabutova@bk.ru)

**Pokusina Tatiana Alexandrovna** - master, department of biochemistry and cell physiology, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: [tatjana.pokusina@yandex.ru](mailto:tatjana.pokusina@yandex.ru),

**Eprintsev Alexander Trofimovich** – Doctor of Biology, Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: [bc366@bio.vsu.ru](mailto:bc366@bio.vsu.ru)