



УДК 577.12

Разделение изоферментов изоцитратлиазы с использованием ДЭАЭ-целлюлозы

Аль Дайни Саба Хади Бенайед, Никитина М.В., Сальников А.В.,
Федорин Д.Н., Епринцев А.Т.

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 7.07.2014 г.

Использование многостадийной очистки изоцитратлиазы обеспечивало получение ее в электрофоретически гомогенном состоянии. Ключевую роль в разделении изоферментов выделяемого энзима играла ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. Применение данной схемы очистки обеспечило разделение изоформ изоцитратлиазы из объектов разного происхождения. Были получены две изоформы изоцитратлиазы из листьев растений. Удельная активность гомогенных препаратов колебалась от 2,45 до 4,25 Е/мг белка. При этом выход составлял от 57 до 87 %, а степень очистки – 6,5-9. раз.

Ключевые слова: ДЭАЭ-целлюлоза, изоферменты, глиоксилатный цикл, глиоксисомы.

Differentiation isocitrate isoenzymes using DEAE-cellulose

Al Hadi Benayed Daina Saba, Nikitina M.V., Salnikov A.V.,
Fedorin D.N., Eprintsev A.T.

Voronezh State University, Voronezh

Study of physico-chemical and regulatory aspects of the isocitrate lyase is an urgent problem, because at the moment there is little data on the subject. The aim of this work was to develop a multi-stage purification scheme isocitrate lyase and its isoenzymes separation using ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose. For isocitrate lyase from various purification scheme was used objects, comprising homogenization of the material, an ammonium sulfate fractionation 0-70% of saturation, gel-filtration on Sephadex G-25 ion-exchange chromatography on a column of DEAE-cellulose.

Use of a four-step purification scheme yielded isocitrate lyase isoenzymes with high specific activity. Thus, the shape of the corn ICL1 specific activity value was 2.85 U / mg protein and ICL2 - 3.1 U / mg protein. A characteristic feature of the purification scheme used was the use of isocitrate ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose, and application of this step yielded two isoforms test preparations of the enzyme from corn, soybeans and amaranth. Isozymes ICL stripped from the column of DEAE cellulose with a gradient concentration of KCl. The degree of purification of homogeneous preparations ICL isoforms ranged from 57 to 87 times. In our opinion, this was due to different values of the specific activity in the homogenate on the test plants. It should be noted that the cleaning of the plant include isocitrate lyase characteristic significantly higher yield of the enzymatic activity, which have ranged from 6.5 to 9% soybean amaranth. The higher the output level of activity in the preparation of highly purified preparations DIC appears to be explained by a significant content isocitrate lyase activity in plant facilities. Analysis of the data indicates that as a result of four-step purification scheme obtained electrophoretically homogeneous isoforms $R_f = 0,28$ and $0,44$. Developed a multi-stage purification scheme involving ammonium sulfate salting out, gel filtration on Sephadex G-25 and the use of ion exchange chromatography on DEAE-cellulose, which allowed to obtain electrophoretically homogeneous preparations of isocitrate lyase isoenzymes of plants with different types of basal metabolism. Preparation of highly purified isoenzymes ICL offers opportunities to study the physico-chemical, catalytic and kinetic characteristics of the functioning of this enzyme system.

Keywords: DEAE-cellulose, isozymes, the glyoxylate cycle, glyoxysomes.

Введение

В литературе имеются многочисленные данные по проведению очистки изоцитратлиазы (ИЦЛ) (КФ 4.1.3.1.). В этих работах в качестве источников для выделения фермента использовались растения, водоросли, бактерии и грибы.

Для исследования физико-химических и регуляторных аспектов функционирования изоцитратлиазы необходимо получение ферментов в гомогенном или высокоочищенном состоянии. В данном исследовании использовались растения кукурузы, сои и амаранта, являющиеся типичными представителями, осуществляющими фотосинтез по C_4 -типу.

Эксперимент

Целью данной работы являлась разработка схемы многостадийной очистки изоцитратлиазы и разделение ее изоферментов с использованием ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе.

В данной работе проводились исследования растительных объектов с различным типом метаболизма. В качестве объектов исследования использовали: - семядоли четырехдневных проростков сои (*Glycine max L.*, сорт Игор), выращенных гидропонным способом при температуре 25°C , листья стареющего растения, выращенного на опытном поле ВГАУ; - щитки четырехдневных проростков кукурузы *Zea mays* сорта «Воронежская 76», выращенные гидропонным способом при температуре 25°C , листья стареющего растения, выращенного на опытном поле ВГАУ; - прорастающие семена амаранта *Amaranthus caudatus L.* сортов «Рыжик», выращенные гидропонным способом при температуре 25°C , листья стареющего растения, выращенного на опытном поле ВГАУ.

Для выделения ИЦЛ и гомогенизации 1 грамма использовали среду (соотношение 1/5): 50 мМ Tris-HCl, pH 7.5; 3 мМ MgCl_2 ; 5 мМ ДТТ; 3 мМ ЭДТА. Для осаждения неразрушенных тканей использовали метод центрифугирования, которое проводили в течение 5 минут при $5000g$.

Активность изоцитратлиазы определяли с помощью спектрофотометрического метода на спектрофотометре СФ-2000. Коэффициент молекулярной экстинкции составил $0.18 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ при длине волны равной 324 нм [1].

Для очистки изоцитратлиазы из различных объектов была использована следующая схема:

1. Гомогенизация материала.
2. Высаливание сульфатом аммония в пределах 0-70% насыщения.
3. Гель-фильтрация на сефадексе G-25.
4. Ионообменная хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. Десорбцию изофермента ИЦЛ осуществляли линейным градиентом KCl (50-150 мМ). Электрофоретические исследования проводили по методу Девиса [2].

Для концентрирования белкового раствора готовили крупнопористый 6% полиакриламидный гель. Разделение осуществляли на мелкопористом 7,5% полиакриламидном геле (ПААГ). Для определения гомогенности очищенных препаратов ИЦЛ вносили 3-5 мкг белка исследуемого раствора. При проявлении на белок использовали методику с нитратом серебра [3, 4]. Специфическое проявление ИЦЛ после электрофореза осуществляли с помощью модифицированного реагента Шиффа. Его взаимодействие с глиоксилатом приводило к образованию окрашенного соединения [5].

Гели окрашивали путём помещения их в инкубационную среду следующего состава: 50 мМ трис-НСl буфер, рН 7,5; 1 мМ ЭДТА; 3 мМ MgCl₂·6H₂O; 3 мМ ДТТ; 10 мМ изоцитрат (трёхнатриевая соль); 1,2 мл модифицированного реагента Шиффа. Гель инкубировали при 37°C до появления ярко-красной полосы в месте локализации ИЦЛ.

Обсуждение результатов

Для выполнения цели исследования необходимо было получить гомогенные препараты изоформ изоцитратлиазы из кукурузы, сои и амаранта. Применение четырехстадийной схемы очистки позволило получить изоферменты изоцитратлиазы с высокими значениями удельной активности. Так, быстродвижущаяся форма ИЦЛ из кукурузы имела значение удельной активности 2.85 Е/мг белка, а медленнодвижущаяся – 3.1 Е/мг белка. Максимальные значения этого показателя были характерны для сои и амаранта. Интересно отметить, что быстродвижущиеся формы ИЦЛ из сои и амаранта обладали более высокой удельной активностью. Так, величина удельной активности этой формы из сои составляла 4.25 Е/мг белка. Характерной особенностью используемой схемы очистки изоцитратлиазы было использование ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, причем применение этой стадии позволило получить препараты двух изоформ исследуемого фермента из кукурузы, сои и амаранта. Изоферменты ИЦЛ десорбировали с колонки с ДЭАЭ-целлюлозой с помощью градиента концентрации KCl. Степень очистки гомогенных препаратов изоформ ИЦЛ колебалась в пределах от 57 до 87 раз. На наш взгляд, это было обусловлено разным значением величины удельной активности в гомогенате исследуемых растений. Следует отметить, что для очистки изоцитратлиазы из растительных объектов характерен значительно более высокий уровень выхода ферментативной активности, который колебался от 6.5 у сои до 9% у амаранта (табл. 1). Более высокий уровень выхода активности при получении высокоочищенных препаратов ИЦЛ, по-видимому, можно объяснить более значительным содержанием изоцитратлиазной активности в растительных объектах.

Таблица 1. Основные показатели очистки изоферментов ИЦЛ из кукурузы, сои и амаранта

Название растений – объектов исследования	Изофермент	Удельная активность, Е/мг белка	Степень очистки	Выход, %
Кукуруза	ИЦЛ ₁	2.85	62	8
	ИЦЛ ₂	3.10	65	8.5
Соя	ИЦЛ ₁	4.25	87	7
	ИЦЛ ₂	3.60	71	6.5
Амарант	ИЦЛ ₁	3.63	57	9
	ИЦЛ ₂	4.05	67	8

Для выяснения гомогенности полученных препаратов изоцитратлиазы из растительных объектов использовали электрофоретические исследования в полиакриламидном геле. Применение универсального красителя AgNO₃, характеризующегося очень высокой чувствительностью, показало, что полученные

образцы проявлялись в виде одной полосы (рис. 1, 2, 3). У препаратов, выделенных из кукурузы, были обнаружены изоформы с $R_f = 0,25$ и $0,30$. Интересно отметить, что специфическое проявление очищенных препаратов изоформ ИЦЛ подтвердило наличие у белков изоцитратлиазной активности с одинаковыми значениями относительной электрофоретической подвижности (рис. 1).

На рис. 2 приводятся результаты электрофоретического анализа препаратов изоформ изоцитратлиазы из сои. Анализ полученных данных свидетельствует, что в результате четырехстадийной схемы очистки получены электрофоретически гомогенные изоформы с $R_f = 0.28$ и 0.44 . С помощью специфического проявления было подтверждено, что электрофоретически гомогенные препараты изоформ ИЦЛ из сои характеризуются специфическим проявлением. Следовательно, можно заключить, что полученные образцы являются изоформами фермента изоцитратлиазы.

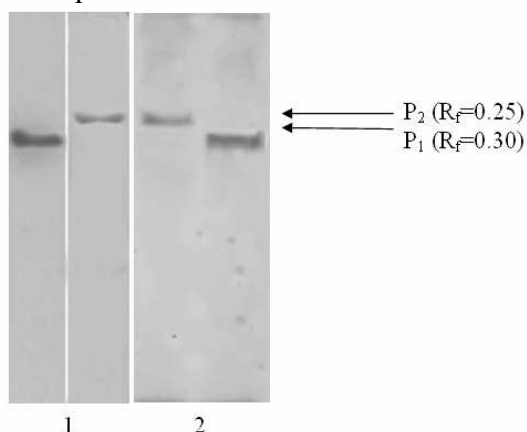


Рис. 1. Подтверждение гомогенности полученных форм ИЦЛ из кукурузы 1 – специфическое проявление ИЦЛ, 2 – окрашивание геля нитратом серебра (на белок), P_1, P_2 – белковые полосы

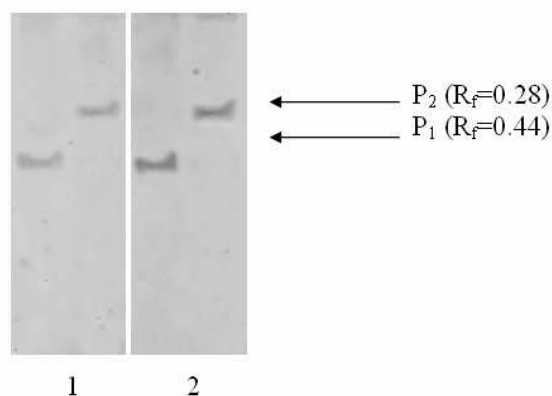


Рис. 2. Подтверждение гомогенности полученных форм ИЦЛ из сои 1 – специфическое проявление ИЦЛ, 2 – окрашивание геля нитратом серебра (на белок), P_1, P_2 – белковые полосы

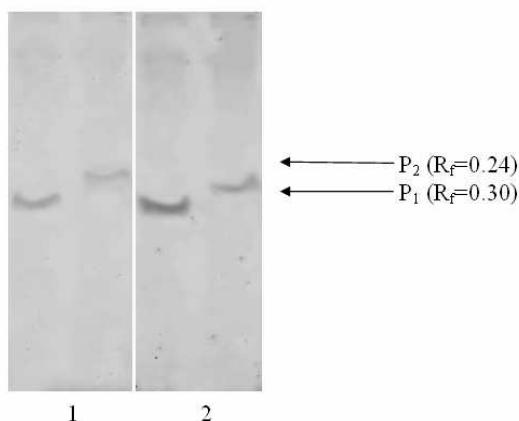


Рис. 3. Подтверждение гомогенности полученных форм ИЦЛ из амаранта: 1 – специфическое проявление ИЦЛ, 2 – окрашивание геля нитратом серебра (на белок), P_1, P_2 – белковые полосы

Анализ данных электрофоретических исследований высокоочищенных препаратов и изоформ ИЦЛ из амаранта (рис. 3) четко указывает, что полученные образцы являются электрофоретически гомогенными и обладают изоцитратлиазной

активностью. Следует отметить, что данные электрофореза в значительной степени подтверждаются другими исследователями. Было показано, что высокоочищенные препараты изоцитратлиазы из растительных объектов с удельной активностью выше 3,5 Е/мг белка являются гомогенными, то есть чистыми от примесей других белков [6].

Заключение

Разработана многостадийная схема очистки, включающая высаливание сульфатом аммония, гель-фильтрацию на сефадексе G-25 и применение ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, что позволило получить электрофоретически гомогенные препараты изоферментов изоцитратлиазы из растений с разным типом основного обмена. Получение высокоочищенных препаратов изоферментов ИЦЛ открывает возможности для исследования физико-химических, каталитических и кинетических характеристик функционирования данной ферментной системы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ №14-14-00721.

Список литературы

1. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Шевченко М.Ю. Глиоксилатный цикл. Универсальный механизм адаптации? М.: Академкнига. 2007. 231с.
2. Davis B.J. Disc electrophoresis II. Method and Application to Human Serum Protein // Annals of the New York Academy of Sciences. 1994. V. 121. pp.404-427.
3. Мауэр Г. Диск-электрофорез / Пер. с англ. Москва: Мир. 1971. 222 с.
4. Nesterenko M.V., Tilley M., Upton S.J. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels // Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 1994. V.28. pp. 239-242.
5. Kornberg H.L., Krebs H.A. Synthesis of cell constituents from C₂-units by a modified tricarboxylic acid cycle // Nature. 1957. V.179. pp. 988-991.
6. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука. 1981. 288с.

References

1. Yepintsev A.T., Popov V.N., Shevchenko M.YU. Glioksilatnyy tsikl. Universal'nyy mekhanizm adaptatsii? M., Akademkniga, 2007, 231p.
2. Davis B.J. Disc electrophoresis II. Method and Application to Human Serum Protein, Annals of the New York Academy of Sciences, 1994, V. 121, pp.404-427.
3. Mauer G. Disk-elektroforez / Per. s angl. Moskva: Mir, 1971, 222 p.
4. Nesterenko M.V., Tilley M., Upton S.J. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 1994, V. 28, pp. 239-242.
5. Kornberg H.L., Krebs H.A. Synthesis of cell constituents from C₂-units by a modified tricarboxylic acid cycle, Nature, 1957, V. 179, pp. 988-991.
6. Osterman L.A. Metody issledovaniya belkov i nukleinovykh kislot: elektroforez i ul'tratsentrifugirovaniye, M.: Nauka, 1981, 288 p.

Аль Дайни Саба Хади Бенайед – аспирант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, (473)2208877

Никитина Марина Викторовна – магистрант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

Saba Al Hadi Benayed Daina - graduate student, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh

Nikitina Marina V. – graduate student, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh

Сальников Алексей Владимирович – к.б.н., инженер, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

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

Епринцев Александр Трофимович – д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

Salnikov Alexei V. - PhD, Engineer, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh

Fedorin Dmitry N. - PhD, Associate Professor, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, (073) 2208877, e-mail: rybolov@mail.ru

Eprintsev Alexander T. - Ph.D., Professor, Head of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, (073) 2208877, e-mail: bc366@bio.vsu.ru