



УДК 577.15.08

Выделение ферментов глиоксилатного цикла хроматографическими методами

Сыромятников М.Ю., Епринцев А.Т., Попов В.Н.

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 8.10.2014 г.

В статье представлен обзор по способам изоляции ключевых ферментов глиоксилатного цикла из организмов различных таксономических групп с использованием гель-хроматографии и ионообменной хроматографии, а также схема выделения изоцитратлиазы (ИЦЛ), малатдегидрогеназы (МДГ) и аконитатгидратазы (АГ), предложенная исследователями кафедры биохимии и физиологии клетки ВГУ. На первом этапе, чаще всего, используется гель-фильтрация на сефадексе с малоразмерными порами для освобождения от низкомолекулярных примесей, затем приводится ионообменная хроматография на диэтиламиноэтилцеллюлозе либо DEAE-Toyopearl. Заключительным этапом является проведение гель-хроматографии с крупными размерами пор.

Ключевые слова: глиоксилатный цикл, фермент, гель-хроматография, ионообменной хроматография, очистка.

Using chromatographic methods for the purification of the key enzymes of the glyoxylate cycle from organisms of different taxonomic groups

Syromyatnikov M.Yu., Eprintsev A.T., Popov V.N.

Voronezh State University, Voronezh

The article presents an overview of methods for the isolation of key enzymes of the glyoxylate cycle of organisms from different taxonomic groups using gel chromatography and ion exchange chromatography. The main interest of the study of the functioning of the glyoxylate cycle enzyme is the study of isocitrate lyase (ICL), akoninate hydratase (AH) and malate dehydrogenase (MDH). At the first stage, gel filtration with Sephadex in order to relief from low molecular weight particles is used most often, then goes driven ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose or DEAE-Toyopearl. The final step is using gel column chromatography with large pore sizes. The process of glyoxylate cycle enzymes purification from organisms of different taxonomic groups was developed at the Department of Biochemistry and Cell Physiology of Voronezh State University. This purification scheme allowed us to receive glyoxylate cycle enzymes preparations (MDH, ICL, AH) with high specific activity.

Keywords: glyoxylate cycle enzyme, gel chromatography, ion-exchange chromatography purification.

Введение

Хроматографические методы получения гомогенного белка нашли широкое применение при получении ферментов глиоксилатного цикла из организмов разных таксономических групп. Глиоксилатный цикл был впервые открыт Корнбергом и Кребсом в 1957 году [1]. Было показано, что глиоксилатный цикл широко распространён у организмов далёких в эволюционном отношении [2-4]. Основной

интерес при исследовании функционирования глиоксилатного цикла представляет изучение фермента изоцитратлиазы (ИЦЛ), который является маркерным ферментом в этом цикле [3, 7, 8].

Рядом исследователей был получен гомогенный препарат ИЦЛ из различных организмов с применением хроматографии. Изоцитратлиаза была получена из *Aspergillus nidulans*. Фермент выделяли в несколько стадий. На первом этапе применяли ионообменную хроматографию. Сконцентрированный экстракт наносили на колонку с диэтиламиноэтил (DEAE)-Сефарозой, уравновешенной 10 мМ MOPS-NaOH (pH 7). Сефароза – агароза с высокой степенью сшивки. DEAE-Сефароза, также, как и DEAE-целлюлоза, несет положительный заряд, таким образом, происходит связывание белков, которые имеют отрицательный заряд. Белки «смываются» растворами с высокой ионной силой. После повторного концентрирования препарат подвергали гель-хроматографии [5]. Фермент наносили на Сефакрил S-300. Фракция с активностью фермента повторно загружалась на колонку с Сефакрилом S-300. Размер гранул сефакрила – 40-05 мкм, что позволяет изолировать крупные биомолекулы (от 4 до 600 кДа). В результате этих процедур был получен фермент со степенью очистки 4,9 [6].

Была произведена очистка ИЦЛ из *Acinetobacter calcoaceticus*. Экстракт бактериальных клеток наносили на колонку с Фенил-сефарозой, уравновешенной 1 М сульфатом аммония. После промывки колонки, ИЦЛ была «смыта» с помощью линейного градиента сульфата аммония в промывочном буфере. Далее экстракт фермента помещали на колонку с DEAE-Сефадекс А-50. После того, как фермент нанесли на колонку производили его «смыв» с помощью линейного градиента NaCl. Далее экстракт пропускали через колонки HPLC. В результате проведенных процедур был получен фермент со степенью очистки – 73 и выходом 7%. После этого на препарате фермента изучались его физико-химические свойства [9].

При получении фермента из *Chlorella* использовалась другая схема [10]. Вначале проводили осаждение фермента с помощью сульфата аммония. После того, как частично очищенный фермент был получен, его наносили последовательно на колонки с Сефадексом G-100 и Сефадексом G-200. После этих процедур фермент отделяли от других белков с помощью DEAE-целлюлозы. В результате был получен полностью очищенный препарат фермента, гомогенность которого подтвердилась на электрофореграмме.

Очистка ИЦЛ из дрожжей *Candida brassicae* E- 17 проводилась по следующей схеме: первоначально осаждали фермент с помощью высаливания сульфатом аммония. После этого, экстракт фермента наносили на колонку с DEAE-целлюлозой, уравновешенной натрий-фосфатным буфером. «Смыв» фермента производился с использованием линейного градиента (0-0.1 М) NaCl. Фракцию с максимальной активностью фермента наносили на колонку с Сефадексом G-200. В результате, фермент был очищен в 13 раз [15].

Рядом исследователей был получен фермент ИЦЛ из базидиомицет. После осаждения фермента сульфатом аммония авторы применили гель-фильтрацию с TSK гель фенил-Тоуорепарл 650М. Фермент был «смыт» с колонки линейным градиентом $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0-1,8 М). После этого фракция с ферментом была пропущена через колонку Protein-Pak DEAE 15HR, представляющей из себя полиметилкрилат с размерами частиц 8-15 мкм и пораами 1000 ангстрем. Фермент элюировали линейным градиентом NaCl. На третьей стадии очистки ИЦЛ помещали на колонку HiLoadSuperdex 200 (размер частиц 22-44 мкм), а затем на колонку с Cosmogel QA. В результате, степень очистки фермента составила 73 с выходом ИЦЛ 23% [14]. При выделении фермента из *Saccharomyces cerevisiae* на первом этапе экстракт клеток

помещали на колонку HA-Ultrogel (размер частиц 60-180 мкм). Этот наполнитель представляет из себя гидроксипатитную агарозу. Очистка осуществляется как за счет действия ионных сил, так и за счет гидрофобных взаимодействий. После этого, полученный препарат фермента, помещали на колонку с DEAE-сефадекс А-50 и проводили ионообменную хроматографию. После этой стадии проводили повторную гель-хроматографию на HA-Ultrogel [13].

ИЦЛ была изолирована из семян *Lupinus*. Очистку осуществляли с помощью гель-хроматографии на Сефадексе G-150 и G-200. В результате удельная активность фермента увеличилась в 100 раз [21]. Также изоцитратлиазу очищали из проростков сои. Использовалась классическая схема после осаждения фермента $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Далее проводилась гель-фильтрация на Сефарозе CL-6В для избавления от низкомолекулярных примесей. После этого проводилась ионообменная хроматография на DEAE-Сефарозе CL-6В и затем гель-хроматография на CM-Сефарозе CL-6В. После заключительной стадии степень очистки составила 120 [20].

Имеются работы по проведению очистки фермента из клеток бактерий. Так, ИЦЛ была очищена из *Colwelliapsychrerythraea*. После предварительной обработки бактерий экстракт подвергали гель-фильтрации на Сефакрил S-300. После чего, проводили очистку DEAE-целлюлозой. После элюции линейным градиентом NaCl экстракт наносили на колонку с фенил-Сефарозой CL-4В. После получения гомогенного фермента проводили измерения его молекулярной массы с помощью гель-хроматографии на колонке с Сефадексом G-150 и маркерными белками известной молекулярной массой [22].

Кроме ИЦЛ также осуществляли очистку аконитатгидратазы. Так рядом авторов был изолирован фермент из *Bacillus subtilis*. После высаливания сульфатом аммония экстракт клеток с активностью аконитазы подвергали гель-фильтрации через колонку с Bio-Gel. Далее проводили ионообменную хроматографию на DEAE-Sephacel. Аконитаза была элюирована Tris-ацетатным буфером. После этого препарат фермента подвергали гель-хроматографии на Сефадекс G-100 [23].

На кафедре биохимии и физиологии клетки Воронежского государственного университета были усовершенствованы методы очистки ферментов глиоксилатного цикла из организмов различных таксономических групп, в первую очередь животных. Так, было проведено выделение ферментов глиоксилатного цикла из печени крыс, которые, возможно, участвуют в глиоксилатном цикле. Ранее было показано, что этот цикл может функционировать в тканях животных [7, 11, 12, 17]. Очистку малатдегидрогеназы проводили с высаливанием препарата сульфатом аммония и последующей гель-фильтрацией через Сефадекс G-25. Фермент отделяли с помощью ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-Toyopearl [19]. В таблице 1 представлена типичная схема очистки малатдегидрогеназы из печени крыс.

Кроме того, была проведена очистка изоцитратлиазы из печени голодающих крыс [16]. Как и в предыдущем случае, в начале, проводилась гель-фильтрация через колонки с Сефадексом G-25 (для избавления от сульфата аммония и низкомолекулярных примесей). Затем проводилась ионообменная хроматография на DEAE-целлюлозе 52. Последней стадией явилась гель-хроматография на колонках с Toyopearl HW-65 (гидролизованый метакриловый полимер, который позволяет изолировать биомолекулы размером от 4 кДа до 5000 кДа). В результате был получен гомогенный препарат ИЦЛ (рис. 1). Предложенный способ анализа намного информативнее существующих, о чем свидетельствует обнаружение новых изоформ ИЦЛ на электрофореграмме ферментов для голодающих крыс.

Таблица 1. Выделение изоформ МДГ из печени голодающих крыс

Стадия	Активность Е/мл	Общий Белок, мг	Удельная Активность Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	12.50±0.25	99.40±2.9	0.120±0.002	100	1
Гель-фильтрация на Сефадекс G-25	11.4±0.17	80.6±1.6	0.14±0.004	91.2	1.2
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ- Тоуорpearl					
МДГ1* 25-40 мМКСI	1.75±0.035	0.37±0.00	4.7±0.09	14.0	39.4
МДГ2* 55-70 мМКСI	1.65±0.033	0.46±0.00	3.6±0.05	13.2	30.0
МДГ3* 130-140 мМКСI	1.34±0.034	0.25±0.00	5.4±0.1	10.7	44.6

* Различные изоформы малатдегидрогеназы

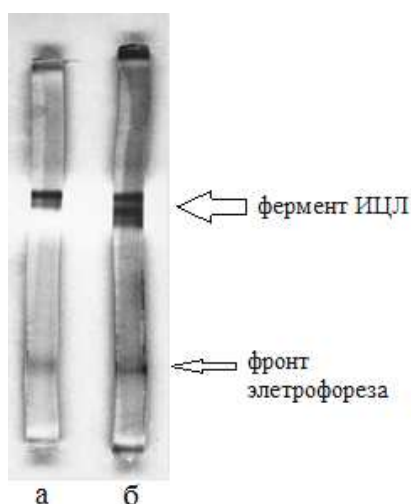


Рис. 1. Электрофореграмма изоцитратлиазы из печени крыс. Левая полоса (а) электрофореза – контрольные крысы, правая полоса (б) электрофореза – голодающие крысы. У голодающих крыс наблюдается индукция дополнительной изоформы фермента ИЦЛ

Продолжением исследования явилась очистка ИЦЛ из печени крыс, болеющих аллоксановым диабетом. Для очистки фермента применялись, как гель-фильтрация на Сефадексе G-25, так и ионообменная хроматография на DEAE-целлюлозе 52. После чего, проводилась гель-хроматография на Тоуорpearl HW-65 [18]. Фермент был очищен в 108 раз.

Очистку ИЦЛ была осуществлена из куколок *Papiliomachaon* L. В этом случае использовалась следующая схема очистки: фермент осаждали с помощью сульфата аммония, затем проводили гель-фильтрацию на Сефадексе G-25, затем ионообменную хроматографию на DEAE-Тоуорpearl. Полной очистки фермента добивались гель-хроматографией на колонках с Тоуорpearl HW 65. Гомогенность фермента проверяли электрофоретически. Несмотря на низкий выход фермента (6 %), ИЦЛ из куколок махаона была очищена в 98 раз и в дальнейшем были проведены исследования по изучению субъединичного строения фермента [8].

Таким образом, при изолировании ферментов глиоксилатного цикла чаще всего применяются следующая схема: гель-фильтрация на Сефадексе с

малоразмерными порами для освобождения от низкомолекулярных примесей, затем проводится ионообменная хроматография на диэтиламиноэтилцеллюлозе либо DEAE-Toyopearl. Заключительным этапом является проведение на колонках гель-хроматографии с крупными размерами пор, таких как Сефароза (G-100, G-150, G-200) либо Сефакрил S-300. Исползованная на кафедре биохимии и физиологии клетки, схема очистки позволила не только получать препараты ферментов глиоксилатного цикла (МДГ, ИЦЛ, АГ) с более высокими значениями удельной активности и выходом ферментов, чем у аналогичных коммерческих препаратов зарубежных фирм с одновременным снижением себестоимости процедуры выделения, но и расширить представления о функционировании глиоксилатного цикла в организмах различных таксономических групп.

Список литературы

1. 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.
2. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Шевченко М. Ю. Глиоксилатный цикл: универсальный механизм адаптации? // Москва. ИКЦ «Академкнига». 2007. 228 с.
3. Епринцев А.Т., Шевченко М.Ю., Попов В.Н. Распространение глиоксилатного цикла у организмов различных таксономических групп // *Успехи современной биологии*. М., 2008. Т. 128. No3. С. 271-280.
4. Попов В.Н., Москалёв Е.А., Шевченко М.Ю., Епринцев А.Т. Сравнительный анализ ключевого фермента глиоксилатного цикла, изоцитратлиазы, из организмов разных систематических групп // *Журнал эволюционной физиологии и биохимии*. 2005. No6. С. 776-781.
5. Детерман Г. Гель-хроматография. М. Мир. 1970. 173 с.
6. De Lucasa J. R., Amora C., Díazla M., Turnerb G., Laborda F. Purification and properties of isocitratelase from *Aspergillus nidulans*, a model enzyme to study catabolite inactivation in filamentous fungi // *Mycological Research*. 1997. V. 101. No 4. pp. 410-414.
7. Eprintsev A.T., Semenova E.V., Popov V.N. Induction of aconitate hydratase in hepatocytes of starving rats // *Biochemistry (Mosc)*. 2002. V. 67. No 7. pp. 795-801.
8. Eprintsev A.T., Shevchenko M.Y., Popov V.N. Purification and properties of isocitratelase from pupas of the butterfly *Papiliomachaon L.* // *Biochemistry (Mosc)*. 2004. V. 69. No4. pp 376-80.
9. Hoyt J.C., Johnson K.E., Reeves H. C. Purification and characterization of *Acinetobacter calcoaceticus* isocitrate lyase // *J Bacteriol*. 1991. V. 173. No21. pp 6844-6848.
10. John P.C., Syrett P.J. The purification and properties of isocitratelase from *Chlorella* // *Biochem. J*. 1967. V. 105. No1. pp 409-416.
11. Kamel M.Y., Fahmy A.S. Biochemical studies of tick embryogenesis. Purification and partial characterization of isocitratelase from eggs of the tick *Hyalommadromedarii* // *Comp. Biochem. Physiol. B*. 1982. V. 72. pp 107-115.
12. Liu F., Thatcher J.D., Barral J.M. Bifunctional glyoxylate cycle protein of *Caenorhabditiselegans*: a developmentally regulated protein of intestine and muscle // *Dev. Biol*. 1995. V. 169. pp 399-414.
13. Lopez-Boado Y.S., Herrero P., Fernandez M.T., Fernandez R., Moreno F. Purification of isocitratelase from *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast*. 1988. V. 4. No1. pp 41-46.
14. Munir E., Hattori T., Shimada M. Purification and characterization of isocitratelase from the wood-destroying basidiomycete *Fomitopsis palustris* grown on glucose // *Arch. Biochem. Biophys*. 2002. V. 399. No2. pp 225-231.

15. Nakamura K., Amano Y., Nakadate M., Kagami M. Purification and properties of isocitratelase from candida brassicae e 17. J. of Fermentation & Bioengineering. 1989. V. 67. No3. pp 153-157.
16. Popov V.N., Igamberdiev A.U., Schnarrenberger C., Volvenkin S.V. Induction of glyoxylate cycle enzymes in rat liver upon food starvation // FEBS Lett. 1996. V. 390. No 3. pp. 258-260.
17. Popov V.N., Volvenkin S.V., Eprintsev A.T., Igamberdiev A.U. Induction of glyoxylate cycle enzymes in various tissues from starving rats // Izv. AkadNauk Ser. Biol. 2000. V. 6. pp. 672-678.
18. Popov V.N., Volvenkin S.V., Eprintsev A.T., Igamberdiev A.U. Glyoxylate cycle enzymes are present in liver peroxisomes of alloxan-treated rats // FEBS Lett. 1998. V. 440. No 1-2. pp. 55-58.
19. Popov V.N., Volvenkin S.V., Kosmatykh T.A., Suad A., Schnarrenberger C., Eprintsev A.T. Induction of a peroxisomal malate dehydrogenase isoform in liver of starved rats // Biochemistry (Mosc). 2001. V. 66. No 5. pp. 496-501.
20. Ruchti M., Widmer F. Isocitratelase from germinating soybean cotyledons: purification and characterization // J. exp. Bot. 1986. V. 37. pp 1685-1690.
21. Vincenzini M.T., Nerozzi F., Vincieri F.F., Vanni pp Isolation and properties of isocitratelase from Lupinus seed // Phytochemistry. 1980. V. 19. No5. pp 769-774.
22. Watanabe S., Yamaoka N., Fukunaga N., Takada Y. Purification and characterization of a cold-adapted isocitratelase and expression analysis of the cold-inducible isocitratelase gene from the psychrophilic bacterium Colwellia psychrerythraea // Extremophiles. 2002. V. 6. No5. pp 397-405.
23. Dingman D.W., Sonenshein A.L. Purification of aconitase from Bacillus subtilis and correlation of its N-terminal amino acid sequence with the sequence of the citB gene // J. Bacteriol. 1987. V. 169. No7. pp 3062-3067.

References

1. 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.
2. Eprintsev A.T., Popov V.N., Shevchenko M.Yu. Gliksilatnyi tsikl: universal'nyi mekhanizm adaptatsii? [Glyoxylate cycle: a universal mechanism for adaptation], Moskva. IKTs «Akademkniga», 2007, 228 p.
3. Eprintsev A.T., Shevchenko M.Yu., Popov V.N. Rasprostranenie gliksilatnogo tsikla u organizmov razlichnykh taksonomicheskikh grupp [Distribution of the glyoxylate cycle in organisms of different taxonomic groups] // Uspekhi sovremennoi biologii. M., 2008, V. 128, No 3, pp. 271-280.
4. Popov V.N., Moskalev E.A., Shevchenko M.Yu., Eprintsev A.T. Sravnitel'nyi analiz klyuchevogo fermenta gliksilatnogo tsikla, izotsitratliazy, iz organizmov raznykh sistemicheskikh grupp [Comparative analysis of the key enzyme of the glyoxylate cycle, isocitrate lyase, from organisms of different taxonomic groups], Zhurnal evolyutsionnoi fiziologii i biokhimii, 2005, No 6, pp. 776-781.
5. Determan G. Gel'-khromatografiya [Gel chromatography], M. Mir, 1970, 173 p.
6. De Lucasa J.R., Amora C., Diazla M., Turnerb G., Laborda F. Purification and properties of isocitrate lyase from Aspergillus nidulans, a model enzyme to study catabolite inactivation in filamentous fungi, Mycological Research, 1997, V. 101., No 4, pp. 410-414.
7. Eprintsev A.T., Semenova E.V., Popov V.N. Induction of aconitase hydratase in hepatocytes of starving rats, Biochemistry (Mosc), 2002, V. 67, No 7, pp. 795-801.
8. Eprintsev A.T., Shevchenko M.Y., Popov V.N. Purification and properties of isocitrate lyase from pupas of the butterfly Papilio machaon L, Biochemistry (Mosc), 2004, V. 69, No 4, pp. 376-80.
9. Hoyt J.C., Johnson K.E., Reeves H.C. Purification and characterization of Acinetobacter calcoaceticus isocitrate lyase, J Bacteriol, 1991, V. 173, No 21, pp. 6844-6848.

10. John P.C., Syrett P.J. The purification and properties of isocitrate lyase from *Chlorella*, *Biochem. J.*, 1967, V. 105, No 1, pp. 409-416.
11. Kamel M.Y., Fahmy A.S. Biochemical studies of tick embryogenesis. Purification and partial characterisation of isocitrate lyase from eggs of the tick *Hyalomma dromedarii*, *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 1982, V. 72, pp. 107-115.
12. Liu F., Thatcher J.D., Barral J.M. Bifunctional glyoxylate cycle protein of *Caenorhabditis elegans*: a developmentally regulated protein of intestine and muscle, *Dev. Biol.*, 1995, V. 169, pp. 399-414.
13. Lopez-Boado Y.S., Herrero P., Fernandez M.T., Fernandez R., Moreno F. Purification of isocitrate lyase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 1988, V. 4, No 1, pp. 41-46.
14. Munir E., Hattori T., Shimada M. Purification and characterization of isocitrate lyase from the wood-destroying basidiomycete *Fomitopsis palustris* grown on glucose, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2002, V. 399, No 2, pp. 225-231.
15. Nakamura K., Amano Y., Nakadate M., Kagami M. Purification and properties of isocitrate lyase from *Candida brassicae* e 17. *J. of Fermentation & Bioengineering*, 1989, V. 67, No 3, pp. 153-157.
16. Popov V.N., Igamberdiev A.U., Schnarrenberger C., Volvenkin S.V. Induction of glyoxylate cycle enzymes in rat liver upon food starvation, *FEBS Lett.*, 1996, V. 390, No 3, pp. 258-260.
17. Popov V.N., Volvenkin S.V., Eprintsev A.T., Igamberdiev A.U. Induction of glyoxylate cycle enzymes in various tissues from starving rats, *Izv. Akad Nauk Ser. Biol.*, 2000, V. 6, pp. 672-678.
18. Popov V.N., Volvenkin S.V., Eprintsev A.T., Igamberdiev A.U. Glyoxylate cycle enzymes are present in liver peroxisomes of alloxan-treated rats, *FEBS Lett.*, 1998, V. 440, No 1-2, pp. 55-58.
19. Popov V.N., Volvenkin S. V., Kosmatykh T. A. et al. Induction of a peroxisomal malate dehydrogenase isoform in liver of starved rats, *Biochemistry (Mosc)*, 2001, V. 66, No 5, pp. 496-501.
20. Ruchti M., Widmer F. Isocitrate lyase from germinating soybean cotyledons: purification and characterization, *J. exp. Bot.*, 1986, V. 37, pp. 1685-1690.
21. Vincenzini M.T., Nerozzi F., Vincieri F.F., Vanni P. Isolation and properties of isocitrate lyase from *Lupinus* seed, *Phytochemistry*, 1980, V. 19, No 5, pp. 769-774.
22. Watanabe S., Yamaoka N., Fukunaga N., Takada Y. Purification and characterization of a cold-adapted isocitrate lyase and expression analysis of the cold-inducible isocitrate lyase gene from the psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea*, *Extremophiles*, 2002, V. 6, No 5, pp. 397-405.
23. Dingman D.W., Sonenshein A.L. Purification of aconitase from *Bacillus subtilis* and correlation of its N-terminal amino acid sequence with the sequence of the *citB* gene, *J. Bacteriol.*, 1987, V. 169, No 7, pp. 3062-3067.

Сыромятников Михаил Юрьевич – преподаватель кафедры генетики, цитологии и биоинженерии, Воронежский государственный университет, Воронеж

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

Попов Василий Николаевич – д.б.н., заведующий кафедрой генетики, цитологии и биоинженерии, Воронежский государственный университет, Воронеж

Syromyatnikov Mikhail Yu. – teacher of Department of genetics, cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: syromyatnikov@bio.vsu.ru

Eprintsev Alexander T. – Ph.D., Head of Department cells biochemistry and physiology, Voronezh State University, Voronezh.

Popov Vasily N. - Ph.D., Head of Department of genetics, cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Voronezh.