УДК 577.11

Выделение с помощью ионообменной хроматографии ферментативного препарата сукцинатдегидрогеназы из летательных мыщц шмелей *Bombus terrestris*

Горбачева Т.М., Сыромятников М.Ю., Попов В.Н., Лопатин А.В.

ГОУ ВПО "Воронежский государственный университет", Воронеж

Поступила в редакцию 20.04.2011 г.

Аннотация

Разработан эффективный способ очистки сукцинатдегидрогеназы из митохондрий летательных мышц самцов шмелей *Bombus terrestris.* Очистка включала стадии фракционирования фермента сульфатом аммония из митохондриальной фракции, гель-фильтрации, ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе. Фермент очищен до гомогенного состояния. Удельная активность электрофоретически гомогенного препарата составила 7,14 ед. на 1 мг белка. Фермент представлен в летательных мышцах одной изоформой. Исследована субстратная специфичность фермента.

Ключевые слова: сукцинатдегидрогеназа (СДГ), хроматография, изоформа, шмели, *Bombus terrestris.*

An effective procedure for purification of the succinate dehydrogenase from mitochondria of flight muscles of bumble bee *Bombus terrestris* has been developed. The procedure includes fractionation of proteins from the mitochondrial fraction by ammonium sulfate, gel filtration, ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose. The enzyme was purified up to homogeneity. The specific activity of homogeneous preparation was 7.14 units per mg of protein. The enzyme from flight muscles of bumble bee is made up of one isoform. The substrate specificity has been investigated.

Key words: succinate dehydrogenase (SDH), ion-exchange chromatography, isofom, bumble bee, *Bombus terrestris*

Введение

На сегодняшний день хроматографический метод является одним из самых востребованных методов многокомпонентного анализа, так как его отличает экспрессность, высокая точность, чувствительность, автоматизация. Хроматографы активно используются специалистами различных сфер науки и промышленности, к которым относятся биология, физика, геология, химическая промышленность и другие отрасли. Широкое распространение данного метода анализа объясняется часто возникающей необходимостью разделения смесей различных веществ на составляющие компоненты, которое приобрело особое значение в последние десятилетия в связи с проблемой получения веществ в гомогенном состоянии.

Особую роль занимает хроматография в области изучения структуры и свойств белковых молекул. Изучаемый фермент – сукцинатдегидрогеназа (СДГ) – занимает

уникальное положение в системе метаболических процессов, протекающих в клетке, являясь ключевым звеном в энергетическом и конструктивном метаболизме. СДГ является одновременно компонентом дыхательной цепи митохондрий – входит в состав комплекса II электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), и ферментом цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), катализируя реакцию окисления сукцината. В настоящее время принято называть растворимой СДГ фермент, обладающий сукцинат:феназинметасульфат-редуктазной активностью (КФ 1.3.99.1.), а сукцинат:убихинон-редуктазной (СУР) – комплекс, в качестве акцептора электронов использующий убихинон (КФ 1.3.5.1.) [1].

Изолированная СДГ может быстро окислять сукцинат в присутствии различных акцепторов электронов, но не способна восстанавливать убихинон или его аналоги. Изолированная СДГ, как правило, неустойчива на воздухе, сдержащиеся в составе Fe-S кластеры, по-видимому, окисляются кислородом, и быстро теряет способность к реконструкции сукцинат:убихинон-редуктазной активности.

Выделение и изучение свойств фермента сопряжено с рядом трудностей, так как в процессе очистки, отделяясь от мембранных компонентов, сукцинатдегидрогеназа становится крайне лабильной структурой. Впервые очищенный препарат растворимой СДГ из животных тканей был получен Сингером [2].

В связи с этим нами была поставлена цель – разработать эффективный способ получения активного ферментативного препарата СДГ с целью дальнейшего изучения некоторых кинетических характеристик данного энзима.

Эксперимент

Объектом исследования служили самцы шмеля *Bombus terrestris* в возрасте 10 суток, отродившиеся из куколок, извлеченных из садков с крупными лабораторными колониями.

Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования [3]. Грудные отделы шмелей гомогенизировали на холоде со средой выделения (1:7), в состав которой входило 50 мМ Трис-HCl буфер (pH 7.5), 1 мМ ЭДТА, 10 мМ KCl, 1 мМ $MgCl_2$, 0,4 М сахарозы. Полученный гомогенат центрифугировали 3 мин при 1000 g и 5 мин при 3000g для осаждения фрагментов клеточной оболочки. Для осаждения митохондрий супернатант центрифугировали при 12000 g в течение 25 мин. Осадок, получившийся в результате центрифугирования и содержащий митохондриальную фракцию, ресуспендировали в 1-2 мл среды, содержащей 10мМ Трис−HCl-буфер (pH 7,8), 0,01% тритон X-100, 20мМ сукцинат натрия. Все процедуры проводились при температуре не выше 4˚С.

Активность СДГ определяли спектрофотометрически при 600 нм. За единицу активности (Е) принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при 25^0С. Определение общего количества белка проводили по методу Лоури [4].

Очистку фермента проводили по модифицированной пятистадийной схеме при 0-4°С, включающей - получение экстракта фермента, фракционирования фермента сульфатом аммония из митохондриальной фракции, гель-фильтрацию на колонке с сефадексом G-25 (“Pharmacia”, Швеция), ионообменную хроматографию на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (“Whatman”, Великобритания), элюцию осуществляли

линейным градиентом KCl от 0 до 250 мМ в растворе 50 мМ Трис-HCl-буфера (pH 7,5), содержащего 25 мМ сукцината.

Электрофоретические исследования проводили по модифицированному методу Дэвиса [5]. При проявлении на белок использовали методику с нитратом серебра [6]. Специфическое окрашивание пластинки осуществляли тетразолиевым методом [7]. Для хранения гели помещали в 7%-ный раствор уксусной кислоты.

Кинетические свойства фермента изучали на электрофоретически гомогенных препаратах СДГ. Константу Михаэлиса рассчитывали методом двойных обратных координат (1/V и 1/[S]) по графику Лайнувера-Берка с использованием программ линейной аппроксимации по методу наименьших квадратов.При математической обработке фактического материала применяли стандартные методы статистического анализа.

Обсуждение результатов

С целью получения высокоочищенного ферментативного препарата СДГ был использован неионный детергент X-100 в высокой концентрации, приводящей к солюбилизации СДГ и переводу ее из мембраны митохондрий в раствор. При определенной концентрации сульфата аммония (15-45%) происходило осаждение мембранной фракции, высаливание некоторых белков и, возможно, частичное осаждение тритона X-100. С помощью гель-фильтрации на G-25 происходило освобождение препарата от примеси солей. На последней стадии - хроматографии на DEAE-целлюлозе (линейный градиент) – осуществлялось разделение белков по заряду молекул. В результате СДГ была очищена в 81,55 раза с выходом 7,13 %, удельная активность препарата составила 7,14 ед. на 1 мг белка (табл. 1).

Таблица 1. Таблица очистки сукцинатдегидрогеназы из *Bombus terrestris*

Стадия	V,мл	ФЕ	Белок, мг/мл	Уд.акт	Степень очистки	Выход,%
Гомогенат	16.50	15.54	59.14	0.09	1.00	100.00
Мтх/фр	2.20	8.20	14.04	0.58	6.67	53.25
Фракционирование (NH4)2SO4, 15-45 %	2.20	3.10	10.04	0.62	7.15	20.13
Гель-фильтрация через сефадекс G-25	2.00	1.45	2.10	0.69	7.90	9.41
Хроматография на DEAE-целлюлозе	2.00	1.10	0.15	7.14	81.55	7.13

Работать с ферментом необходимо, строго соблюдая температурный режим - 0-4°C.

Известно, что в нативном состоянии СДГ прочно связана с мембраной, которая является каркасом, обеспечивающим ассоциативное состояние субъединиц. В связи с этим изменение состояния мембран может регулировать активность данного фермента [8]. Также не исключено, что Fe-S кластеры, подвергаясь контакту с кислородом воздуха, окисляются. Есть сообщения, что растворимые препараты сукцинатдегидрогеназы сохраняют железо-серный центр (ЖСЦ) S-l и S-2, но теряют ЖСЦ S-3, фермент при этом теряет и способность взаимодействовать с

естественным акцептором электронов - убихиноном, а также феррицианид-редуктазную активность [9].

Методом электрофореза на белки было показано, что ферментативный препарат является гомогенным, значения R_f СДГ совпадали при проявлении на специфичность и на гомогенность и оказались равны 0,24 (рис. 2)

Рис. 1. Электрофореграмма препарата сукцинатдегидрогеназы
1 – специфическое проявление на сукцинатдегидрогеназную активность тетразолиевым методом, 2 – проявление очищенного препарата универсальным красителем на белок ($AgNO_3$), F – фронт красителя бромфенолового синего, P – белковая полоса

Выявлено, что субстратная специфичность невысокая – K_m фермента к субстрату из *Bombus terrestris* составила 2мМ, K_m же, например, из митохондрий сердца быка – 0,48 мМ, из Mucor rouxii – 0,37 mM [10], из корней батата – 0,29 мМ [11]. Такое низкое сродство фермента к субстрату можно объяснить особенностями дыхательного метаболизма летающих насекомых [12]. Возможно, это адаптивная реакция на высокую внутриклеточную концентрацию сукцината в клетке, как необходимое условие для эффективного энергоснабжения летательных мышц во время полета.

Таким образом, с помощью модифицированной схемы очистки, ключевое место в которой занимает ионообменная хроматография, можно получать с высокой эффективностью гомогенные препараты СДГ из разных объектов и изучать кинетические, физико-химические и регуляторные свойства ферментов.

Список литературы

1. Виноградов А.Д. Сукцинат-убихинон редуктазный участок дыхательной цепи / А.Д. Виноградов // Биохимия. − 1986. − Т. 51. − №12. − С. 1944-1973.
2. Singer T.P. Solubilisation assay and purification of succinate dehydrogenase / T.P. Singer, E.B. Rsarney // Biochem et Biophys. Akta. − 1954. − Vol. 15. − P. 151-153.
3. Cooper T.G. Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm. enzyme constitutents and catalytic capacity / T.G. Cooper, H.J. Beevers // J.Biol. Chem. - 1969. - Vol. 244. - P. 3507–3513.

4. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. –1951. – vol. 193. - №1. – pp. 265-275.
5. Davis B.J. Disc electrophoresis II. Method and aplication to human serum protein / B.J. Davis // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 1994. – Vol. 121. – P. 404-427.
6. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O. Mass spectrometric sequncing of protein from silver-stained polyarylamide gels // Anal. Chem., 1996. V.68. P. 850-858.
7. Гааль, Э., Медьеши Г., Верецкий Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982. 446 с.
8. Ackrell A.C. Effect of membrane environment on succinate dehydrogenase activity / A.C. Ackrell, E.B. Kearney // The Journal of Biological Chemistry. – 1976 – Vol. 252. - №5. – P. 1582-1588.
9. Manadori A. (3Fe-4S) to (4Fe-4S) cluster conversion in Escherihia coli fumarate reductase by site directed mutagenesis / A. Manodori, G. Cecchini, M. K. Jonson // Biochemistry. – 1992.- Vol.31 - №10. – P. 2703-2712.
10. Holingren E., Hederstedt L. Rufberg L. // J.Bacteriol. 1979. V.138. N 2. P.377-382
11. Hattori T., Asahi T. // Plant and Cell Physiol. 1982. V.23. N 2. P.515-523.
12. Insect biochemistry and function / edited by D. J. Candy and B. A. Kilby 1936

Горбачева Татьяна Михайловна – аспирант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

Сыромятников Михаил Юрьевич – магистрант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

Попов Василий Николаевич – д.б.н., профессор, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

Лопатин Алексей Васильевич –к.б.н., кафедра энтомологии, Воронежский государственный университет, Воронеж

Gorbacheva Tatyana M. – graduate student, Department of biochemistry and physiology, Voronezh State University, Voronezh, *E-mail:* soki-tanya@yandex.ru

Syromyatnikov Mihail Yu. – master of biology, Department of biochemistry and physiology, Voronezh State University, Voronezh

Popov Vasilij N. – doctor of biology, professor, Department of biochemistry and physiology, Voronezh State University, Voronezh

Lopatin Aleksej V.– candidate of biology, Department of entomology, Voronezh State University, Voronezh