

Список литературы

1. Перистый В.А., Голдовская – Перистая Л.Ф., Везенцев А.И. Синтез анионных реагентов для высокоэффективной жидкостной хроматографии // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. - Т. 8, вып. 5. – С. 881 – 884.
2. Крешков А.П. Основы аналитической химии. Кн. 2. - М.: Химия, 1965. – 376 с.
3. Тютюнников Б.Н. Химия жиров. - М.: Пищевая промышленность, 1966. – 632 с.
4. Крешков А.П., Быкова Л.Н., Казарян Н.Л. Кислотно – основное титрование в неводных средах. – М.: Химия, 1967. – 153 с.
5. Бухштаб З.И., Гасюк Л.В., Гаевой Г.М., Перистый В.А. Применение метода потенциометрического титрования для анализа моющих средств на основе алкенсульфонатов // Вестник Харьковского политехнического института. – 1973. - №71, вып. 5. - С. 56 – 60.
6. Вейганд – Хильгетаг Методы эксперимента в органической химии / Пер. с нем. - М.: Химия, 1968. - 944 с.
7. Перистый В.А., Семенов А.А., Гаевой Г.М., Бухштаб З.И. Определение алкенсульфонатов // Научно – технический сборник. Серия «Нефтепереработка и нефтехимия». - М.: ЦНИИТЭНефтехим, 1972. - С. 30 – 31.
8. Салдадзе К.М., Пашков А.Б., Титов В.С. Ионообменные высокомолекулярные соединения. – М., 1960. – 335 с.
9. Ионообменные методы очистки веществ. Учебное пособие / Под ред. Г.А. Чикина, О.Н. Мягкого. – Воронеж.: Изд. ВГУ, 1984. – 372 с.

Перистый Владимир Александрович – к.т.н., доцент кафедры общей химии Белгородского государственного университета, Белгород, тел. (4722) 30-11-50

Перистая Лидия Федотовна – Доцент кафедры общей химии Белгородского государственного университета, Белгород

Peristy Vladimir A. – Cand. of Science (Engeneering), docent of the chair of general chemistry, Belgorod State University, Belgorod, e-mail: ekolesnikova@bsu.edu.ru

Peristaya Lidiya Ph. – docent of the chair of general chemistry, Belgorod State University, Belgorod, e-mail: peristaya@bsu.edu.ru

УДК 577.121

Применение ионообменной хроматографии для получения высокоочищенных препаратов аконитатгидратазы

Альнассер А., Зайчикова М.В., Стольников Ю.А., Епринцев А.Т.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 10.07.2010 г.

Аннотация

Изучена динамика активности аконитазы из щитков кукурузы и печени крыс с аллоксановым диабетом. Использование гель-хроматографии на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой и ДЭАЭ-сефарозой позволило получить цитоплазматическую форму фермента в высокоочищенном электрофоретически гомогенном состоянии с удельной активностью 2,4 Е/мг белка (для растительного объекта) и 2,06 Е/мг (для животного). Исследованы кинетические и физико-химические свойства аконитазы.

Ключевые слова: аконитатгидратаза, аконитаза, изоформы, ионообменная хроматография, электрофорез, щитки кукурузы, гепатоциты.

The dynamic of aconitase activity from maize scutellum and rat liver was studied. Using gel-chromatography on DEAE-cellulose and DEAE-sepharose let to obtain cytoplasmic form of enzyme in highly purified electrophoretically homogeneous condition with specific activity of 2,4 units/mg protein (for plant object) and 2,06 units/mg protein (for animal object). Kinetic and physico-chemical properties of aconitase were investigated.

Keywords: aconitate hydratase, aconitase, isoforms, ion-exchange chromatography, electrophoresis, maize scutellum, hepatocytes

Введение

В последние годы биохимии достигли больших успехов в выделении и получении высокоочищенных препаратов ферментов разных метаболических путей. Большую роль в этих исследованиях играет использование хроматографических и ионообменных методов очистки белков из гомогенатов клеток растений и животных. В наших работах изучаются ферменты цикла трикарбоновых кислот, глиоксилатного шунта и других центральных метаболических путей [5,6,7].

Аконитатгидратаза (аконитаза, АГ, КФ 4.2.1.3) представляет значительный интерес для изучения физико-химических и кинетических свойств, являясь полифункциональной ферментной системой, обеспечивающей протекание катаболических и анаболических процессов [6].

К невыясненным вопросам относится индукция аконитазной активности у организмов при изменении факторов внешней и внутренней среды. В частности, известно, что при экспериментальном диабете резко возрастает активность ферментов ГЦ в гепатоцитах крыс [10]. Кроме того, резкое усиление функционирования глюконеогенеза характерно для прорастающих семян масличных растений [3].

Целью нашей работы являлось получение в высокоочищенном состоянии цитоплазматической изоформы АГ из печени крыс и щитков кукурузы с помощью ионообменной хроматографии и исследование физико-химических и регуляторных характеристик данной ферментной системы.

Эксперимент

В качестве объектов исследования использовались щитки кукурузы (*Zea mays* L.), выращенные гидропнным способом при 25⁰С, а также самцы беспородных лабораторных крыс (*Rattus rattus* L.) массой 200-300г. Животные выращивались при обычных условиях питания, а затем были инъектированы подкожно 5% аллоксаном (100 мг/кг веса, раствор в 0,9% NaCl). Контрольные крысы выращивались при обычном пищевом режиме; без введения аллоксана.

Индукция диабета контролировалась изменением концентрации глюкозы в крови животных. Кровь брали из хвостовой вены крысы. Определение глюкозы производили с помощью глюкометра “Сателлит плюс”.

Активность ферментов определяли спектрофотометрически на СФ-2000 при длине волны равной 240 нм[8]. Содержание белка измеряли по методу Лоури[8]. Электрофоретические исследования осуществляли по методу Дэвиса[4] в 7,5% ПААГ. Универсальное окрашивание белков осуществляли кумасси[4], специфическое проявление – с помощью тетразолиевого метода[4].

Для получения высокоочищенных препаратов аконитатгидратазы из гепатоцитов крыс в условиях аллоксанового диабета использовали 5-ти стадийную схему очистки: 1) гомогенизация 2 г печени в 10 мл среды выделения; 2) фракционирование белков сульфатом аммония - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ осуществляли путем ступенчатого повышения его концентрации в границах 0-65% насыщения; 3) гель-фильтрация гомогената на сефадексе G-25 (Pharmacia, Швеция) для освобождения от низкомолекулярных примесей. Для элюции использовался 50 мМ Трис-НСl буфер, рН 8,0; 4) ионообменная хроматография на DEAE-Sepharose Fast Flow (Amersham, США). Белковую фракцию наносили на колонку, уравновешенную 50 мМ Tris-буфером, рН 8,0. Элюцию проводили ступенчатым градиентом КСl от 50 до 110 мМ в той же буферной системе; 5) для окончательного разделения активные фракции после DEAE-Sepharose наносили на Toyopearl HW-65 (Toyosoda, Япония), уравновешенную 50 мМ трис-НСl буфером [3].

Экстракт фермента из щитков кукурузы наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (1,7*15 см). Элюцию белков проводили линейным градиентом КСl концентрациями от 60 до 90мМ в 50мМ tris-HCL-буфере, рН 8,0.

Обсуждение результатов

Как известно, в клетке существует две формы АГ – митохондриальная и цитоплазматическая [2, 9], которые имеют различия в функциональных значениях. В представленной работе проведено исследование цитоплазматической формы АГ из животных и растительных объектов. С помощью дифференциального центрифугирования было осуществлено разделение цитоплазматической и митохондриальной форм АГ.

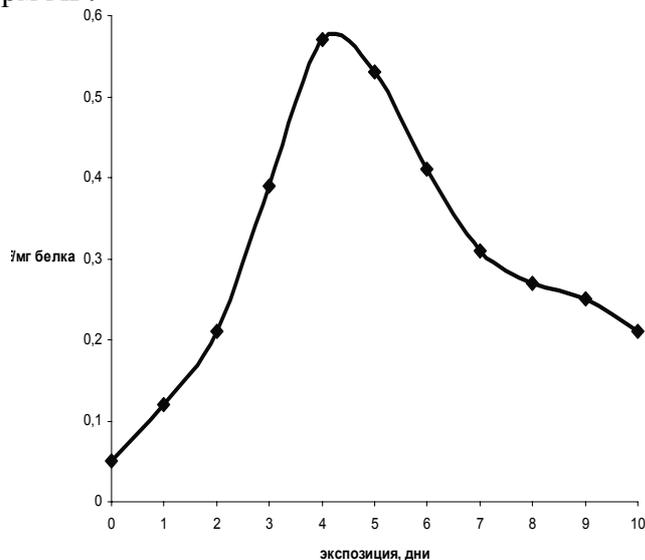


Рис. 1. Динамика активности аконитазы в щитках кукурузы (n=3, P<0,05)

В ходе исследования динамики активности аконитазы в щитках кукурузы было обнаружено резкое возрастание ферментной активности на 4 сутки. Это связано с активизацией глиоксилатного цикла при прорастании семян, а также гидролизом запасных веществ [6, 5]. Однако к 10 суткам, когда запас питательных веществ уменьшался, величина активности АГ снижалась (рис.1).

У опытных животных, подвергшихся воздействию аллоксана, наблюдается более чем двукратное увеличение активности цитоплазматической АГ из гепатоцитов крыс. В норме активность цитоплазматической АГ составила 1,6 Е/г сырой массы печени, на 10 день после инъекции аллоксана это значение было максимально и составило для гомогената тканей печени 4,0 Е/г сырой массы. На 14 день экспозиции активность фермента снижалась, и эксперимент прекращали (рис. 2).

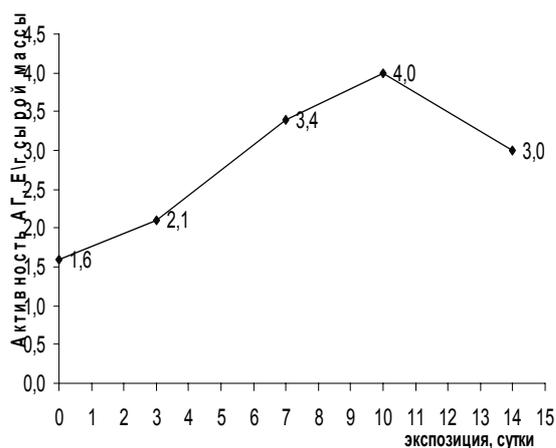


Рис. 2. Динамика активности аконитазы в гепатоцитах крыс в условиях аллоксанового диабета

Обнаруженное увеличение активности цитоплазматической аконитатгидратазы свидетельствует об ускорении метаболических процессов, связанных с этим ферментом [1, 7].

Таблица 1. Этапы очистки аконитазы из щитков кукурузы (n=3, P<0,05).

Стадия очистки	Объём, мл	Общая активность, Е	Общий белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	19	13	191	0.068	100	1
Фракционирование сульфатом аммония	2.5	8.7	24	0.36	67	5.4
Гель-фильтрация на G-25	3	8.1	21	0.39	62	5.8
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	2	2.3	0.96	2.4	18	36

Для получения гомогенного препарата аконитатгидратазы из щитков кукурузы была проведена 4-х стадийная очистка, результаты которой представлены

в табл. 1. Применение данной схемы очистки позволило получить цитоплазматическую форму аконитазы в гомогенном состоянии. Для аконитазы удельная активность составила 2,4т Е/мг белка; степень очистки составила 36 раз; выход 18 %.

Важнейшим этапом очистки является ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе, позволившая получить АГ в высокоочищенном или гомогенном состояниях. Использование в наших исследованиях разных по своей природе ионообменников показало высокую их эффективность. DEAE-целлюлоза позволяла получить электрофоретически гомогенный препарат АГ из щитков кукурузы с очень высоким выходом фермента (18%). Проведение ионообменной хроматографии на DEAE-сефарозе резко усиливало эффективность многостадийной схемы очистки фермента из гепатоцитов крыс.

Таблица 2. Этапы очистки аконитазы из печени крыс с аллоксановым диабетом (n=3, P<0,05)

Стадия	Объём мл	Актив- ность, Е	Общий белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход %	Степень очистки
Гомогенат	8	10.5	384.8	0.0272	100	1
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄ , 35-65%	1.5	7.6	68.82	0.110	72.4	4
Гель-фильтрация на G-25	1.5	3.5	26.6	0.131	33.3	5
Хроматография на ДЭАЭ-Sepharose	2	0.8	0.7	1.14	7.6	42
Гель-фильтрация на Toyopearl HW-65	2	0.3	0.145	2.06	3	76

Применение 5-ти стадийной схемы очистки позволило получить препараты цитоплазматической формы АГ в гомогенном состоянии в норме и в условиях экспериментального диабета (табл. 2 и 3). Для аконитазы из крыс с аллоксановым диабетом удельная активность составила 2,06 Е/мг белка, что соответствует очистке в 76 раз и выходу - 3%, а для АГ, выделенной из печени контрольных животных – 0,714 Е/мг белка, что соответствует очистке в 69 раз и выходу – 4%.

Таблица 3. Этапы очистки аконитазы из печени контрольных животных (n=3, P<0,05)

Стадия	Объём мл	Актив- ность, Е	Общий белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход %	Степень очистки
Гомогенат	7	3.5	338.6	0.0103	100	1
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄ , 35-65%	1	2.55	65.5	0.039	72.8	3.8
Гель-фильтрация на G-25	1.5	1.56	33.4	0.047	44.5	4.6
Хроматография на ДЭАЭ-Sepharose	2	0.28	0.75	0.373	8	36
Гель-фильтрация на Toyopearl HW-65	2	0.15	0.21	0.714	4	69

Проведенный электрофоретический анализ очищенных препаратов АГ показал, что в полиакриламидном геле, окрашенном кумасси, проявилось по одной белковой полосе в каждой пробе (рис.3, 4).

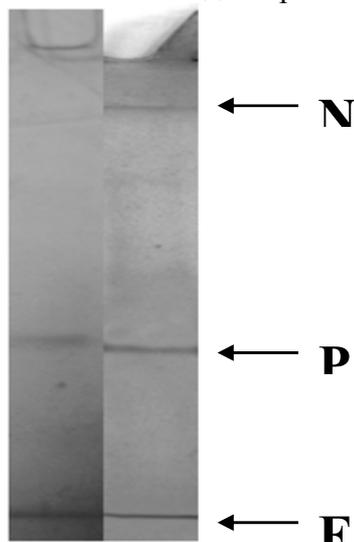


Рис. 3. Электрофореграммы препаратов аконитазы из щитков кукурузы. N – начало разделяющего геля; P – белковая полоса; F – фронт красителя

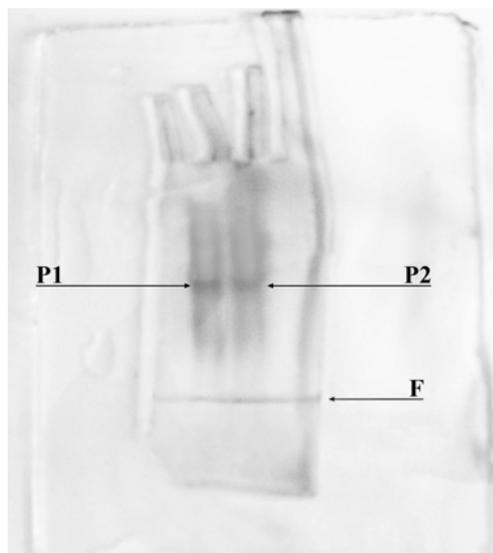


Рис. 4. Электрофореграмма препаратов аконитазы из печени крыс с аллоксановым диабетом и печени контрольного животного. P1 – опыт; P2 – контроль; F - фронт красителя

Получение препаратов АГ в высокоочищенном гомогенном состоянии позволило исследовать кинетические и физико-химические свойства фермента из различных объектов (табл. 4).

Исследование K_m показало, что АГ из растительных и животных объектов имеет большее сродство к изоцитрату, чем к цитрату. Оптимальное для работы фермента значение рН различалось незначительно.

Таблица 4. Кинетические и физико-химические характеристики аконитазы из исследуемых объектов

Свойства	АГ из щитков кукурузы	АГ из печени крыс с аллоксановым диабетом	АГ из печени контрольных крыс
K_m по изоцитрату (мМ)	1.8	0.21	0.37
K_m по цитрату (мМ)	9.6	0.65	0.68
рН оптимум	8.0	7.5	7.5

Таким образом, с помощью многостадийной очистки, включающей ионообменную хроматографию, получены в гомогенном состоянии цитоплазматические формы АГ из разных объектов и исследованы их физико-химические и каталитические характеристики.

Список литературы

1. Андреещева А.Т., Попова Т.Н., Матасова Л.В. Оксидативный статус и активности аконитатгидратазы и NADP-изоцитратдегидрогеназы в гепатоцитах крыс в норме и при токсическом гепатите // Вестник ВГУ. – 2001. №2. – С. 74-77.
2. Волвенкин С.В., Попов В.Н., Епринцев А.Т. Субклеточная локализация и свойства ферментов глиоксилатного цикла в печени крыс с аллоксановым диабетом // Биохимия. – 1999. – Т.64, №. 9. – С. 1185-1191.
3. Епринцев А.Т., Землянухин Л.А., Алексюк М.П. Очистка и некоторые свойства аконитатгидратазы из щитка кукурузы // Биохимия. – 1995.Т.60.- №8, с.1244-1250.
4. Епринцев А. Т., Климова М. А.Очистка ферментов и методы исследования их каталитических свойств - Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2008. – 36 с.
5. Епринцев А.Т., Попов В.Н. Ферментативная регуляция метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растениях. Воронеж: ВГУ, 1999. – 192с.
6. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Шевченко М.Ю. Глиоксилатный цикл: универсальный механизм адаптации? М.: ИКЦ «Академкнига», 2007. – 228с.
7. Епринцев А.Т., Семёнова Е.В., Попов В.Н. Индукция аконитатгидратазы в гепатоцитах голодающих крыс // Биохимия. – 2002. – Т.67, №7. – С. 956-966.
8. Землянухин А.А., Землянухин Л.А. Большой практикум по физиологии и биохимии растений // ВГУ.–Воронеж,1996.– С.38-39, 67-68, 87-89.
9. Courtois-Verniquet F., Douce R. Lack of aconitase in glyoxysomes and peroxisomes // Biochem. J. – 1993. - № 294. – P. 103-107.
10. Popov V.N., Igamberdiev A.U., Schnarrenberger C. Induction of glyoxylate cycle enzymes in rat liver upon food starvation // FEBS Lett. – 1996. – Vol. 390. – P. 258-260.

Альнассер Амин – аспирант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

Зайчикова Марина Викторовна – аспирант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

Стольниковая Юлия Александровна – студент, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

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

Alnasser Amin – graduate student, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh

Zajchikova Marina V. - graduate student, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh

Stolnikova Julia A. - student, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: marinazajchikova@yandex.ru

Eprintsev Alexander T. – Doctor of Biology, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh

УДК 541.183

Геохимические барьеры на основе клиноптилолитсодержащих туфов для решения экологических задач

Никашина В.А., Серова И.Б., Кац Э.М.

Учреждение РАН Институт геохимии и аналитической химии им. В.И.Вернадского, Москва