



УДК 577.15

## Разделение изоформ L-лактатдегидрогеназы из галоалкалофильной бактерии *Rhodovulum steppense* штамма А-20s методом ионообменной хроматографии

Ларченков В.М., Сорокина Т.В., Ахмед А.Х., Целуйко Ж.А.,  
Фалалеева М.И., Епринцев А.Т.

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 25.07.2015 г.

В результате многостадийной очистки, включающей гель-фильтрацию на сефадексе G-25 и ионообменную хроматографию на носителе DEAE-Sephacel, были получены ферментные препараты двух изоформ лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27) из галоалкалофильных бактерий *Rhodovulum steppense* штамма А-20s. При этом удельная активность изоформ составила 4.286 и 5.23 Е/мг белка соответственно. Относительная электрофоретическая подвижность в полиакриламидном геле каждой из изоформ лактатдегидрогеназы равнялась 0.329 и 0.714 соответственно. Определено для одной из изоформ значение константы Михаэлиса по NADH (0.014 мМ). Оптимальная для активности этой изоформы данного фермента область значений рН находится в районе 7.5.

**Ключевые слова:** лактатдегидрогеназа, стадия очистки, ионообменная хроматография, электрофорез, изоформа, константа Михаэлиса

## Differentiation of lactate dehydrogenase isoforms using ion exchange chromatography

Larchenkov V.M., Sorokina T.V., Ahmed A.H., Tseluyko Z.A.,  
Falaleeva M.I., Eprintsev A.T.

Voronezh State University, Voronezh

The aim of this research work is a description of some catalytic characteristics of lactate dehydrogenase from haloalkaliphilic bacteria *Rhodovulum steppense* strain A-20s and creation of methods for extracting of this enzyme from bacterial cells. *Rhodovulum sulphidophilum* is cultivated on a salt medium with the sodium acetate and yeast extract as a carbon sources. The methods of ion exchange and gel chromatography were used for purification of enzyme. Electrophoretic analysis is realized by Davis method, enzyme staining is realized by tetrazolium method. The presence of two L-lactate dehydrogenase isoforms in *Rhodovulum steppense* is determined. The pH optimum for the first isoform is 7.5-7.75, and Michaelis constant value for this isoform is 0.14. Electrophoretic mobility coefficient values are 0.329 for first isoform and 0.714 for second isoform. Our results are confirmed the presence of L-lactate dehydrogenase in the *Rhodovulum steppense* in phototrophic conditions. This data may be useful for the creation of metabolism model of purple bacteria and biotechnological application of these organisms.

**Keywords:** lactate dehydrogenase, step of purification, ion exchange chromatography, electrophoresis, isoenzyme, Michaelis constant

## Введение

Пурпурные бактерии относятся к экологической группе фотосинтезирующих прокариот, объединяющей ряд представителей филумов Альфа-, Бета- и Гамма-Протеобактерии, которым свойственен бескислородный фотосинтез с использованием соединений серы в качестве доноров электронов. Они представляют большой интерес для изучения в связи со своей эволюционной древностью и возможной большой ролью в формировании современных организмов, а также в связи с определённой практической значимостью отдельных представителей пурпурных бактерий, в частности, бактерий рода *Rhodovulum*.

В данной работе объектом исследований являлся галоалкалофильный микроорганизм *Rhodovulum steppense* штамма А-20s. При изучении обмена веществ этих бактерий внимание было обращено на лактатдегидрогеназу, играющую важную роль в анаэробном метаболизме многих организмов.

## Эксперимент

Бактерии *Rhodovulum steppense* выращивали на питательной среде следующего состава (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.33,  $\text{MgCl}_2$  – 0.33,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 0.33,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  – 0.33,  $\text{KCl}$  – 0.33,  $\text{NaCl}$  – 30,  $\text{CaCl}_2$  – 0.1,  $\text{Na}_2\text{S}$  – 0.1, дрожжевой экстракт – 0.1,  $\text{CH}_3\text{COONa}$  – 0.5. В среду добавлялся раствор витаминов и микроэлементов в количестве 0.1 мл на 100 мл питательной среды. рН доводилась до необходимых значений раствором бикарбоната натрия.

Микроорганизмы выращивались при температуре 28°C микроаэробно в условиях круглосуточного освещения в фотобиологическом аппарате «Флора-1». Активность лактатдегидрогеназы измеряли спектрофотометрически при длине волны 340 нм в среде следующего состава: пируват — 1.8 мМ, NADH – 2.8 мМ [1] на спектрофотометре СФ-56. Раствор пирувата натрия вносили в кювету непосредственно перед измерением. За единицу ферментативной активности принималось количество фермента, катализировавшее превращение 1 мМ субстрата (NADH) за единицу времени при нормальных условиях [2]. Содержание белка в исследуемых препаратах определялось спектрофотометрически по методу Лоури при длине волны 750 нм. Все измерения проводили в трёх аналитических повторностях.

Очистка фермента включала в себя следующие стадии [3]:

– Культуры клеток разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора (УЗДН-2Т) при мощности 500 Вт и частоте 22 кГц в течение 2 мин в ледяной бане 3 раза по 30 сек.

– Получение экстракта фермента путём центрифугирования гомогената со скоростью 5 000 оборотов в минуту в течение 5 минут.

– Гель-фильтрация на колонке с сефадексом G-25 (сверхтонкий) для освобождения от низкомолекулярных примесей. Объём наносимого образца не превышал 4 мл [2].

– Ионообменная хроматография на носителе DEAE-Sephacel (США), в качестве элюента использовали растворы NaCl. Были подобраны эффективные концентрации, обеспечивающие десорбцию изоформ лактатдегидрогеназы. Элюцию изоформ фермента проводили линейным градиентом NaCl от 270 до 280 мМ и от 460 до 470 мМ в той же буферной системе [3, 4].

Электрофоретические исследования проводили по методу Дэвиса. Для концентрирования белковых растворов готовили 4% крупнопористый полиакриламидный гель, разделение осуществляли на мелкопористом 7% полиакриламидном геле. Специфическое проявление осуществляли с помощью нитросинего тетразолия, взаимодействие которого с NADH – продуктом обратной реакции лактатдегидрогеназы – приводило к образованию окрашенного диформаза. Гели окрашивали путём их помещения в инкубационную среду следующего состава: лактат натрия – 0.5 М, NAD – 0.28 мМ, ФМС – 0.21 М, НСТ – 0.32 М.

Оптимум pH изучаемого фермента определяли измерением значения активности ферментного препарата с использованием буферных растворов Tris-HCl с различными значениями pH от 7.0 до 9.2.

Сродство фермента к NADH определяли измерением активности фермента при различных концентрациях NADH с последующим расчётом значения константы Михаэлиса методом Лайнуивера-Берка.

### Обсуждение результатов

Для выполнения цели исследования необходимо было установить количество изоформ лактатдегидрогеназы у *Rhodovulum steppense* и выделить их препараты. В результате электрофоретических исследований было подтверждено наличие у *Rhodovulum steppense* двух изоформ лактатдегидрогеназы с коэффициентами электрофоретической подвижности 0.329 и 0.714 соответственно (рис. 1).

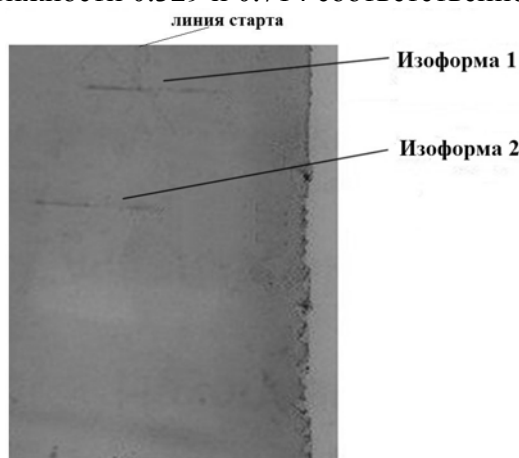


Рис. 1. Две изоформы лактатдегидрогеназы у *Rhodovulum steppense* штамма А-20s

Разделение белков было осуществлено с помощью четырёхстадийной схемы очистки. Применение данной схемы позволило получить препараты отдельных изоформ лактатдегидрогеназы с удельными активностями 4,286 и 5,23 Е/мг белка, очищенные в 10.91 и 13.3 раза соответственно (таблица 1). Ключевой стадией процесса являлась ионообменная хроматография, которая позволила разделить белки по заряду их поверхности. Использование DEAE-Sephacel обеспечило дифференцирование близких по характеристикам множественных молекулярных форм лактатдегидрогеназы из бактерий *Rh. steppense*. Данный ионообменный носитель в нашей лаборатории был использован впервые. DEAE-Sephacel показал более высокую эффективность при разделении изоформ лактатдегидрогеназы по сравнению с традиционно используемой ДЭАЭ-целлюлозой. С помощью ионообменной хроматографии на DEAE-Sephacel из гомогената клеточной культуры

были получены отдельные изоформы ЛДГ в высокоочищенном состоянии. Удельная активность первой изоформы после ионообменной хроматографии составила 4,28 Е/мг белка. При этом степень очистки равнялась 10,91. Удельная активность второй изоформы достигла значения 5,23 Е/мг белка, а степень очистки 13,3. Анализ полученных данных (табл.1) позволяет утверждать, что использование DEAE-Sephacel повышает эффективность применяемой схемы выделения чистых препаратов отдельных ферментов из клеток.

Таблица 1. Очистка L-лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27) из галоалкалофильной бактерии *Rhodovulum steppense* штамма А-20s (n=3, p≤0.05)

Стадия	V, мл	Белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	4.4	137.3	53.92	0.393	100	1
Супернатант	4.1	71.6	9.75	0.136	18.1	0.38
Гель-фильтрация на сефадексе -25	2	7.32	6.96	0.951	12.9	2.42
Ионнообменная хроматография на DEAE-Sephacel, (изоформа 1)	2	0.35	1.5	4.286	2.78	10.91
Ионнообменная хроматография на DEAE-Sephacel, (изоформа 2)	2	0.361	1.89	5.23	3.5	13.3

Оптимальное значение pH для 1-й изоформы лактатдегидрогеназы *Rhodovulum steppense* составило 7.5, что, по литературным данным, является средним значением по сравнению с другими организмами [5, 6, 7] (рис. 2). Значение константы Михаэлиса по NADH для исследованного фермента составило 0.014 мМ (данные не представлены). Эта величина свидетельствует о высоком сродстве исследованного фермента к NADH по сравнению с лактатдегидрогеназами других организмов [6, 8, 9].

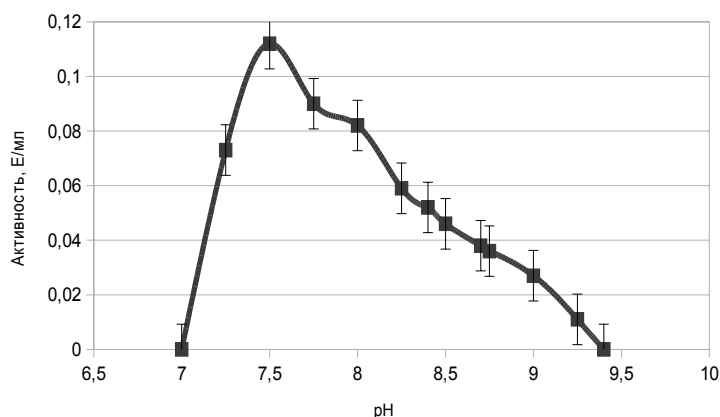


Рис. 2. pH-оптимум 1-й изоформы L-лактатдегидрогеназы из галоалкалофильной бактерии *Rhodovulum steppense* штамма А-20s.

## Заключение

Разработана многостадийная схема очистки лактатдегидрогеназы из галоалкалофильной бактерии *Rhodovulum steppense*, включающая гель-фильтрацию на сефадексе G-25 и ионообменную хроматографию на носителе DEAE-Sephacel, что позволило разделить изоформы данного фермента. Получение очищенных препаратов изоформ ЛДГ открывает возможности для изучения их кинетических и физико-химических свойств.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 14-14-00721.*

## Список литературы

1. Ларченков В.М., Ахмед А.Х., Фалалеева М.И., Епринцев А.Т. // *Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов*. 2014. Вып. 16. С. 85-88.
2. Епринцев А.Т., Фалалеева М.И., Степанова И.Ю., Парфенова Н.В. // *Биохимия*. 2003. Т.68. № 2. С. 20-21.
3. Епринцев А.Т., Фалалеева М.И., Степанова И.Ю. и др. // *Известия РАН. Серия: биологическая*. 2003. № 3. С. 301-310.
4. Селеменев В.Ф., Рудаков О.Б., Славинская Г.И., Дроздова Н.В. *Пигменты пищевых производств*. М.: ДеЛи принт. 2008. 246 с.
5. Ostendorp R., Auerbach G., Jaenicke R. *Protein Sci.* 1996. pp. 862-873.
6. Taguchi H., Machida M., Matsuzawa H., Otha T. // *AgricBiol.Chem.* 1985. Vol. 49. pp. 359-365.
7. Flores H., Ellington A.D. // *Protein Eng. Des. Se.* 2005. Vol. 18. pp. 369-377.
8. Garvie E.I. // *Microbiol Rev.* 2007. Vol. 44. No 1. pp. 106-39.
9. Caspar P., Neves A.R., Shearman C.A. et al. // *FEBS J.* 2007. Vol. 274. No 22. pp. 5924-5936.

## References

1. Larchenkov V.M., Ahmed A.H., Falaleeva M.I., Eprincev A.T., *Organizacija i reguljacija fiziologo-biohimicheskikh processov*, 2014, No 16, pp. 85-88.
2. Eprintsev A.T., Falaleeva M.I., Stepanova I.Yu., Parfenova N.V., *Biochemistry*, 2003, Vol. 68, No 2, pp. 20-21.
3. Eprintsev A.T., Falaleeva M.I., Stepanova I.Yu. et al., *Biology Bulletin*, 2003, No 3, pp. 301-310.
4. Selemenev V.F., Rudakov O.B., Slavinskaya G.I., Drozdov N.V., *Pigmentyi pischevyih proizvodstv*, M.: DeLee print, 2008, 246 p.
5. Ostendorp R., Auerbach G., Jaenicke R., *Protein Sci.*, 1996. pp. 862-873.
6. Taguchi H., Machida M., Matsuzawa H., Otha T., *Agric Biol Chem.*, 1985, Vol. 49, pp. 359-365.
7. Flores H., Ellington A.D., *Protein Eng. Des. Sel*, 2005, Vol. 18, pp. 369-377.
8. Garvie E.I., *Microbiol Rev*, 2007, Vol. 44, No 1, pp. 106-39.
9. Caspar P., Neves A.R., Shearman C.A. et al., *FEBS J.*, 2007, Vol. 274, No 22, pp. 5924-36.

**Ларченков Владимир Михайлович** – аспирант кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

**Сорокина Татьяна Викторовна** – студент, Воронежский государственный университет, Воронеж

**Larchenkov Vladimir M.** – the postgraduate student, department of biochemistry and physiology of cell, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: [larchenkoff.vladimir@yandex.ru](mailto:larchenkoff.vladimir@yandex.ru)

**Sorokina Tatyana V.** – the student of Voronezh State University, Voronezh

---

**Абдуллах Хасан Ахмед** - аспирант кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

**Целуйко Жанна Андреевна** – студент, Воронежский государственный университет, Воронеж

**Фалалеева Марина Ивановна** – доцент кафедры биохимии и физиологии клетки, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж

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

**Abdullah Hasan Ahmed** – the postgraduate student, department of biochemistry and physiology of cell, Voronezh State University, Voronezh

**Tseluyko Zhanna A.** – the student of Voronezh State University, Voronezh

**Falaleeva Marina I.** – Ph. D. (biology), associate prof., department of biochemistry and physiology of cell, Voronezh State University, Voronezh

**Eprintsev Alexander T.** – prof., grand Ph. D. (biology), department of biochemistry and physiology of cell, head pf chair, Voronezh State University, Voronezh