



Применение ионообменной хроматографии для разделения изоформ малатдегидрогеназы из *Sphaerotilus natans* штамм Д-507, культивируемых в условиях миксотрофного роста

Арабцева М. А., Епринцев А. Т., Фалалеева М. И., Парфенова И. В.

Воронежский государственный университет, Воронеж

Аннотация

Показано наличие двух изоформ малатдегидрогеназы, выделенной из бесцветных серобактерий *Sphaerotilus natans* штамм Д-507 в условиях миксотрофного роста. С помощью многостадийной очистки, включающей ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе, изоформы малатдегидрогеназы были разделены и получены в гомогенном состоянии. Установлено, что малатдегидрогеназа из бактерий *Sphaerotilus natans* штамм Д-507 в условиях миксотрофного культивирования представлена двумя изоформами. Результаты гель-хроматографии и Ds-Na-электрофореза показывают, что данный фермент является изологическим димером и тетрамером

Введение

Sphaerotilus natans штамм Д-507 представляет собой новые матообразующие бесцветные серобактерии, выделенные из термальных источников Краснодарского края. В отличие от других штаммов данного вида, штамм Д-507 способен к хемоорганогетеротрофному и хемолитогетеротрофному росту в присутствии восстановленных соединений серы.

Некоторые виды в зависимости от условий культивирования могут изменять тип метаболизма от органотрофного до литотрофного. Регуляция метаболизма осуществляется на уровне отдельных ферментов, в частности перестройкой субъединичной структуры молекулы. Ранее было показано у серобактерий *Beggiatoa leptomitiformis* наличие двух изоформ малатдегидрогеназы (МДГ, КФ 1.1.1.37). При адаптации бактерий к литотрофным условиям происходит изменение четвертичной структуры молекулы малатдегидрогеназы. В результате происходит перераспределение роли ЦТК и глиоксилатного цикла [1]. Бактерии *S. natans* штамм Д-507 также способны расти миксотрофно. Установлено, что малатдегидрогеназа участвует в функционировании обоих метаболических путей. Поэтому целью нашей работы было разделение изоформ малатдегидрогеназы из бактерий *Sphaerotilus natans* штамм Д-507 с помощью ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, получение их в гомогенном состоянии и изучение физико-химических свойств фермента.

Эксперимент

Объектом исследования служили матообразующие бесцветные серобактерии рода *Sphaerotilus natans*. штамм Д-507 культивируемые в условиях миксотрофного роста. Бактерии выделены из термальных источников Краснодарского края.

Для культивирования микроорганизмов использовали питательную среду следующего состава (мг/л): NH_4Cl - 1.7; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 34.4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 22.5; CaCl_2 - 27.5; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0.25; KH_2PO_4 - 8.5; K_2HPO_4 - 21.5; пептон - 200; лактат - 200; дистиллированная вода; рН среды 7.5. Перед посевом в среды вносили раствор микроэлементов и витаминов – 1.0×10^{-3} (г/л) [2]. Для создания миксотрофных условий в среды вносили тиосульфат 1 г/л.

Суспензию клеток получали путем центрифугирования культуры при 8000 г и 4⁰С в течение 20 мин. Клетки отмывали 50 мМ *трис*-HCl-буфером (рН 7.5). Клеточный экстракт получали разрушением бактериальных клеток с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т при мощности 500 Вт и частоте 22 кГц в течение 2 мин на ледяной бане. Супернатант получали после центрифугирования гомогената при 8000 г и 4⁰С в течение 5 мин.

Активность МДГ определяли спектрофотометрически при 340 нм. За единицу активности (Е) принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при 25⁰С. Определение общего количества белка проводили по методу Лоури.

Очистку фермента осуществляли по модифицированной схеме, включающей - получение экстракта фермента, гель-фильтрацию на колонке с сефадексом G-25, ионообменную хроматографию на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой.

Молекулярную массу нативного белка определяли с помощью гель-хроматографии через сефадекс G-200 [3].

Электрофорез проводили по модифицированной методике Дэвиса в 9% полиакриламидном геле [4]. Для специфического проявления МДГ применяли тетразолиновый метод [5]. Для детекции белка использовали методику с нитратом серебра [6].

Результаты и их обсуждение

Для получения гомогенных препаратов МДГ и разделения изоформ фермента была проведена многостадийная очистка. В результате получены ферментные препараты малатдегидрогеназы с удельной активностью 2,78 Е/мг белка и степенью очистки 45 раза и 3,37 Е/мг белка со степенью очистки в 54 раза (табл.1).

После ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе малатдегидрогеназа из микроорганизмов была получена в электрофоретически гомогенном состоянии. Элюцию осуществляли ступенчатым градиентом KCl. Максимум активности МДГ обнаруживался во фракциях 100-105мМ и 110-115мМ KCl. Электрофоретический анализ очищенного препарата показал, что в геле при универсальном окрашивании на белки проявилось по одной полосе с Rf 0,45 и 0,5 (рис.1). Это свидетельствует о гомогенности МДГ из данных бактерий.

Методом гель-хроматографии на сефадексе G-200 была определена молекулярная масса МДГ, элюция фермента осуществлялась в виде двух пиков, которым соответствовала молекулярная масса 71 и 141 кДа. Электрофоретическое исследование в присутствии додецилсульфата натрия позволило определить величину молекулярной массы одной субъединицы, которая составила 35 кДа (рис. 2,3).

Таблица 1. Схема очистки МДГ из *Sphaerotilus natans* штамм Д-507 в условиях миксотрофного роста

Стадии очистки	Общий объем, мл	Общая активность, Е	Белок, мг/мл	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %	
Гомогенат	8,9	19,43±0,58	315,0±9,45	0,062±0,001	1	100	
Супернатант	5,7	12,44±0,37	201,6±6,04	0,063±0,001	1,02	64	
Гель-фильтрация через сефадекс G25	2,5	10,89±4,06	44,1±1,32	0,247±0,007	1,06	56	
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	1	1,0	1,82±0,05	0,653±0,02	2,78±0,08	45	9,4
	2	1,0	1,44±0,04	0,427±0,01	3,37±0,1	54	7,4

Сравнение результатов гель-хроматографии и электрофореза с додецилсульфатом натрия показывает, что МДГ из *Sphaerotilus natans* штамм Д-507 в условиях миксотрофного роста представлена двумя изоформами – изоэлектрическим димером и тетрамером.

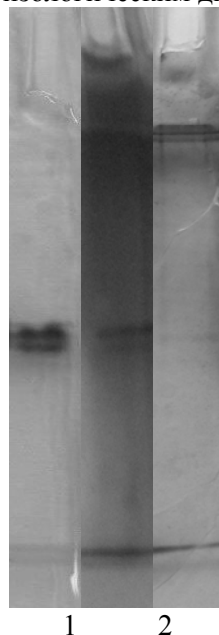


Рис. 1. Электрофореграммы МДГ, очищенной из *S. natans* при миксотрофном росте: 1-специфическое проявление; 2-окрашивание нитратом серебра

Т.о., с помощью метода ионообменной хроматографии добились разделения изоформ малатдннгидрогеназы из серобактерий *Sphaerotilus natans* штамм Д-507. Показано, что МДГ при миксотрофном росте бактерий представлена изоэлектрическим димером и тетрамером, выполняющими различные функции.

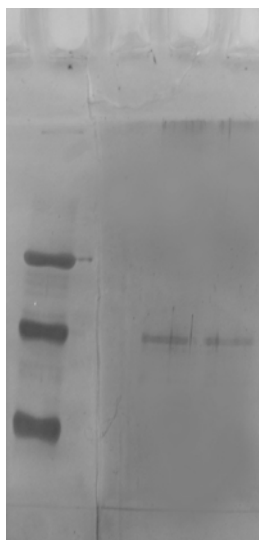


Рис. 2. Ds-Na-электрофорез МДГ из *S. natans*: 1-фосфорилаза b, 2-БСА, 3-овальбумин, 4-карбоангидроза, 5-ингибитор трипсина, 6-лизоцим, 7-исследуемая МДГ

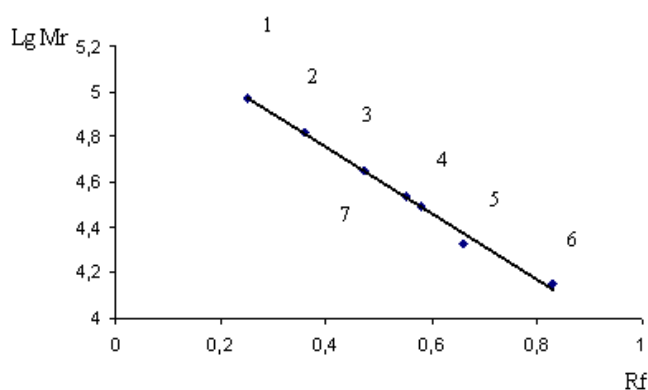


Рис. 3. Определение молекулярной массы субъединицы МДГ методом Ds-Na-электрофореза: 1-фосфорилаза b, 2-БСА, 3-овальбумин, 4-карбоангидроза, 5-ингибитор трипсина, 6-лизоцим, 7-исследуемая МДГ

Список литературы

1. Епринцев А.Т., Фалалеева М.И., Грабович М.Ю., Парфенова Н.В., Каширская Н.Н., Дубинина Г.А. Роль изиформ малатдегидрогеназы в регуляции анаболических процессов у бесцветных серобактерий *Beggiatoa leptomitiformis* Д-402 // Микробиология. 2004. Т.73. №.4. С.437-442.
2. Дубинина Г.А., Грабович М.Ю., Чурикова В.В. Образование перекиси водорода *Beggiatoa leptomitiformis* // Микробиология, 1990. Т.59. С. 425-431.
3. Остерман Л.А. Исследование макромолекул. М.: Мир, 1983. 297с
4. Davis B.J. Disk electrophoresis II-method and application to human serum proteins // Ann. NY Acad. Sci., 1964. V. 121. P. 404-427.
5. Гааль, Э., Медъеши Г., Верецкий Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982. 446 с.
6. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O. Mass spectrometric sequencing of protein from silver-stained polyarylamide gels // Anal. Chem., 1996. V.68. P. 850-858.