



## Разделение изоферментов изоцитратлиазы из щитков кукурузы с помощью ионообменной хроматографии

Маслова Е.В., Чан Тхи Хоанг Куэн, Епринцев А.Т.

*Воронежский государственный университет, Воронеж*

### Аннотация

Была разработана универсальная схема очистки для изоферментов изоцитратлиазы (КФ 4.1.3.1) из щитков кукурузы, включающая 4 стадии. Ключевой стадией позволившей разделить изоформы исследуемого фермента послужила ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе с линейным градиентом КСl (50-150 мМ). Фермент элюировался с колонки в виде двух пиков, соответствующих концентрациям КСl 60,2 и 94,2 мМ. Показано различие в активации форм изоцитратлиазы глицином и гликолатом. Глицин оказывал активирующее действие на первую форму фермента в концентрации 5 мкМ, на вторую форму – 10 мкМ. Гликолат же активировал ИЦЛ<sub>1</sub> достаточно в высоких концентрациях (100 мкМ), по сравнению с ИЦЛ<sub>2</sub> (5 мкМ).

### Введение

Фермент изоцитратлиаза (КФ 4.1.3.1) катализирует обратимую реакцию альдольного расщепления изоцитрата на глиоксилат и сукцинат. Наряду с малатсинтазой изоцитратлиаза (ИЦЛ) является ключевым ферментом глиоксилатного цикла и появляется на ранних этапах прорастания семян масличных растений, но по мере утилизации запасных жиров наступает спад ее активности.

Изоцитратлиаза довольно часто встречается среди бактерий, грибов и высших растений. Что касается многоклеточных животных, фермент присутствует в некоторых нематодах во взрослой стадии, в постэмбриональных личинках и эмбрионах, и вероятно, в определенных членистоногих. Вопрос о присутствии ИЦЛ и глиоксилатного цикла в позвоночных животных все еще обсуждается.

Вопросы регуляции активности данного фермента в ходе прорастания семян имеют принципиальное значение, поскольку они позволяют пролить свет на общие закономерности регуляции ферментативных процессов в ходе онтогенеза.

К настоящему времени ИЦЛ очищена до гомогенного состояния из многих видов микроорганизмов, в частности бактерии *Pseudomonas indigofera*, грибов, высших растений, нематод, клещей, насекомых и крыс [1]. В растениях, ИЦЛ распространена в основном в жирозапасующих семенах, однако встречаются данные и о наличии этого фермента и в других органах растений – в плодах [2] и зелёных листьях [3, 4].

Очистка ИЦЛ из различных объектов, как правило, включала фракционирование сульфатом аммония, ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-Toyopearl и гель-фильтрацию на различных сефадексах. Также описана очистка (включающая фракционирование ацетоном, диализ, хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе и сефадексе G-200) ИЦЛ из развивающихся эмбрионов клещей *Hyalomma dromedarii* [1].

Как правило, применение обычных сорбентов не позволяет эффективно разделить изоформы фермента, поэтому цель нашей работы – разработка схемы разделения изоформ изоцитратлиазы из щитков кукурузы с применением ионообменной хроматографии.

## Методы исследования

В качестве объектов исследования использовали щитки 4-дневных этиолированных проростков кукурузы (*Zea mays* L., сорт Воронежская 76), выращенных гидропонным способом, при  $t = 25^{\circ}\text{C}$ .

Активность изоцитратлиазы (КФ 4.1.3.1) определяли спектрофотометрически на СФ-46, по изменению поглощения света при длине волны 324 нм, за счёт образования комплекса фенилгидразина с глиоксилатом [5]. Среда спектрофотометрирования содержала 50 мМ Tris-HCl-буфер, рН 7,5; 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 4 мМ ДТТ, 2 мМ изоцитрат натрия, 4 мМ фенилгидразин солянокислый.

За единицу активности фермента принимали такое количество изоцитратлиазы, которое обеспечивало образование 1 микромоля глиоксилата за 1 мин при  $t = 25^{\circ}\text{C}$ . Определение общего количества белка проводили по методу Лоури [6].

Для получения высокоочищенных препаратов изоцитратлиазы была разработана специальная схема очистки, включающая 4 стадии. Все операции проводили при температуре  $0-4^{\circ}\text{C}$ .

1. Получение гомогената: навеску растительного материала ( $m=5,0\text{g}$ ) гомогенизировали в соотношении 1:5 со средой выделения следующего состава: 50 мМ Tris-HCl-буфер (рН 7,5), содержащей 3мМ ЭДТА, 0,1М  $\text{MgCl}_2$ , 5мМ ДТТ. Центрифугировали 5 мин при 5000g.

2. Фракционирование белков осуществляли сульфатом аммония в пределах насыщения 0-40%. Полученный раствор центрифугировали 20 мин при 12000g.

3. Гель-фильтрацию проводили на колонке ( $1,5 \times 20$  см) с Сефадексом G-25 («Pharmacia», Швеция). Элюцию белков осуществляли 50 мМ Tris-HCl-буфером (рН 7.5), со скоростью 15-20 мл в час.

4. Ионообменную хроматографию проводили на колонке ( $1,5 \times 15$  см) с ДЭАЭ-целлюлозой («Whatman», Великобритания), предварительно уравновешенной 50 мМ Tris-HCl-буфером, рН 7.5. Фермент десорбировали с колонки линейным градиентом концентрации от 50 мМ до 150 мМ KCl в среде элюирования.

Для определения четвертичной структуры и молекулярной массы нативной ИЦЛ использовали метод гель-хроматографии на колонке ( $2 \times 40$  см) с Сефадексом G-200 [7]. Определяли объём его выхода ( $V_e$ ). Свободный объём ( $V_o$ ) колонки определяли с помощью голубого декстрана («Serva»). Молекулярную массу изучаемого фермента определяли по формуле, полученной из калибровочного графика (1):

$$\lg Mr = 6,698 - 0,987 (V_e/V_o) \quad (1)$$

Электрофоретические исследования белков проводили в 7,5% полиакриламидном геле [8]. Универсальное проявление белков осуществляли нитратом серебра. Гели хранили в 7% растворе уксусной кислоты.

Специфическую идентификацию фермента выявляли с помощью модифицированного реагента Шиффа [9]. DS-Na-ПААГ-электрофорез осуществляли при концентрации полиакриламидного геля 12,5%. Каждый образец содержал 3 – 5 мкг белка.

Для построения калибровочной кривой использовали стандартные маркерные белки («Sigma») [10].

Опыты проводились в трех повторностях. Аналитическое определение для каждой пробы осуществляли в двух повторностях. В таблице и на рисунках приведены данные

типичных опытов, где каждое значение есть среднее арифметическое. При математической обработке использовали статистический критерий Стьюдента.[11].

### Результаты их обсуждение

Известно, что изоцитратлиаза в прорастающих семенах, как правило, представлена в виде одной или двух, реже большего числа молекулярных форм [12, 13, 14].

С помощью электрофореза в 7,5% ПААГ с последующим специфическим окрашиванием на активность изоцитратлиазы, в щитках кукурузы было обнаружено две формы фермента с различной электрофоретической подвижностью (рис.1).

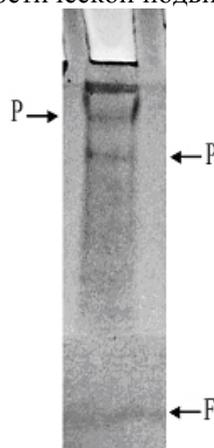


Рис. 1. Специфическое проявление ИЦЛ из щитков кукурузы: P – белковая полоса; F – фронт красителя

В ходе разработанной 4-х стадийной очистки были получены гомогенные препараты двух изоформ ИЦЛ из щитков кукурузы. Результаты типичной очистки представлены в таблице 1, из которой видно, что удельная активность для одной изоформы равнялась 4,64 Е/мг белка, при этом степень очистки составила 116 раз; выход – 5,6%. Для второй изоформы значение удельной активности составило 6,5 Е/мг белка, а степень очистки 162,5 раз; выход – 5,6%.

Таблица 1. Очистка изоцитратлиазы из щитков кукурузы (n=3, P<0,05)

Стадия очистки	Объём, мл	Общий белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
<i>Гомогенат</i>	6	61,32	2,32	0,04	100	1
Фракционирование сульфатом аммония	2	11,52	2,10	0,18	90,5	4,50
Гель-фильтрация на G-25	2	11,04	2,05	0,19	88,4	4,75
Ионообменная хроматография на ДЭАЕ-целлюлозе	2	0,028	0,13	4,64	5,60	116
	2	0,020	0,13	6,50	5,60	162,5

Ключевой стадией в получении высокоочищенных изоформ изоцитратлиазы являлось применение ионообменной хроматографии на ДЭАЕ-целлюлозе с линейным

градиентом KCl (50-150мМ). При очистке ИЦЛ из щитков получили 2 пика элюции ферментной активности. Максимальная элюция первой изоформы наблюдалась при концентрации раствора 60,2 мМ KCl, а второй - при 94,2 мМ. Профиль элюции активности изоцитратлиазы после ДЭАЕ-целлюлозы показан на рисунке 2.

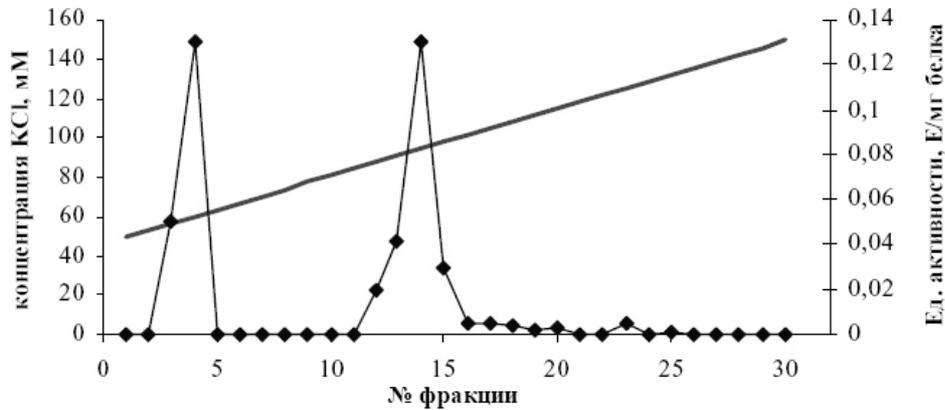


Рис. 2. Профиль элюции активности изоцитратлиазы на ДЭАЕ-целлюлозе при десорбции линейным градиентом KCl: — концентрация линейного градиента KCl (50-150 мМ); ◆ - единицы активности ИЦЛ (Е/мг белка)

Проведённый электрофоретический анализ очищенных препаратов показал, что в полиакриламидном геле при универсальном окрашивании на белки и специфическом проявлении обнаруживалось по одной белковой полосе (рис. 3). Таким образом, было установлено, что в щитке кукурузы присутствуют 2 формы фермента, имеющие разную электрофоретическую подвижность: ИЦЛ<sub>1</sub> с R<sub>f</sub> 0,29 и ИЦЛ<sub>2</sub> с R<sub>f</sub> 0,25.

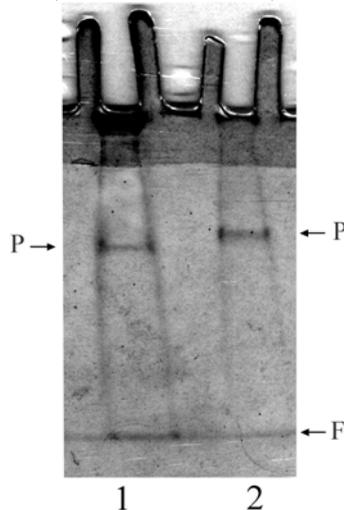


Рис.3. Электрофорез в 7,5% ПААГ (проявление с нитратом серебра) препаратов изоцитратлиазы из щитков кукурузы: 1 - ИЦЛ<sub>1</sub> с R<sub>f</sub> 0,29; 2 - ИЦЛ<sub>2</sub> с R<sub>f</sub> 0,25; P – белковая полоса; F – фронт красителя

При гель-хроматографии на Сефадексе G-200 ИЦЛ из щитков кукурузы элюировалась в виде двух пиков, соответствующих молекулярным массам 164 и 208 кДа.

Электрофоретическое исследование белка в присутствии Ds-Na позволило определить величину молекулярной массы каждой субъединицы, которая составила 43±1,2 кДа, для ИЦЛ<sub>1</sub> и 48±0,5 кДа для ИЦЛ<sub>2</sub> (рис. 4).

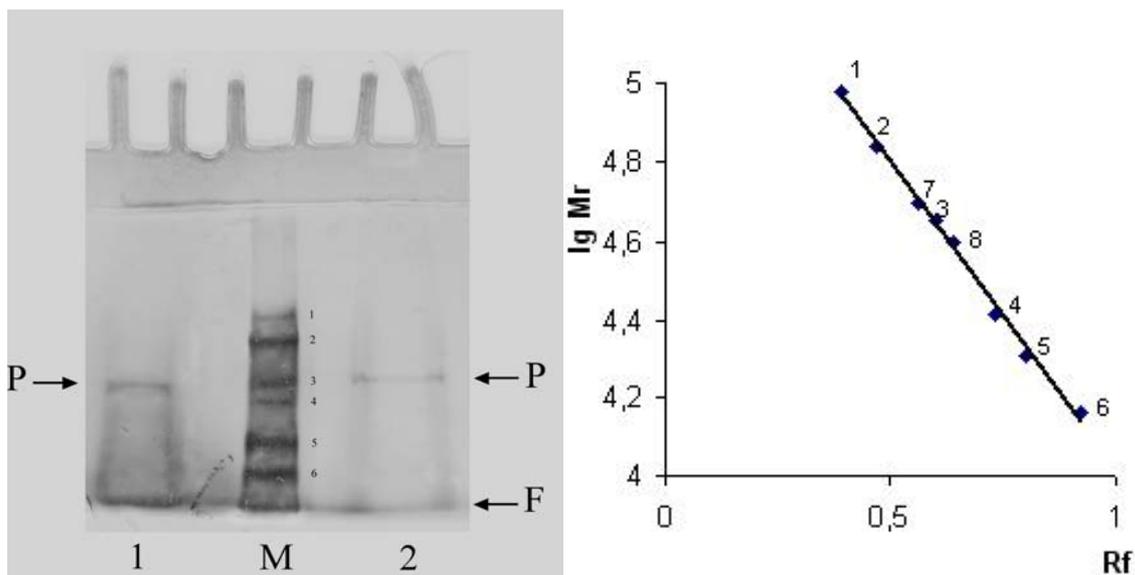


Рис. 4. Определение молекулярной массы субъединиц изоцитратлиазы из щитков кукурузы методом Ds-Na-электрофореза: 1- целлюлаза(94,6 кДа); 2- бычий сывороточный альбумин (66,2 кДа); 3-яичный альбумин (45 кДа); 4- карбоангидраза (31 кДа); 5- ингибитор трипсина (21,5 кДа); 6- лизоцим(14,4 кДа); 7- ИЦЛ<sub>2</sub>; 8- ИЦЛ<sub>1</sub>

Результаты с помощью гель-хроматографии на Сефадексе G-200 и данные денатурирующего электрофореза, позволяют заключить, что ИЦЛ является тетрамерным белком (рис. 4).

При изучении кинетических свойств для гомогенных препаратов изоцитратлиазы в щитках кукурузы было установлено, что фермент подчиняется кинетике Михаэлиса-Мэнтен.  $K_m$  по изоцитрату для ИЦЛ<sub>1</sub> составила 55,6  $\mu\text{M}$ , для ИЦЛ<sub>2</sub> сродство к субстрату было меньше по сравнению с первой формой фермента ( $K_m = 83,3 \mu\text{M}$ ). Анализ данных показывает, сродство исследуемого фермента к изоцитрату варьируют достаточно в широких пределах концентрации метаболита и сопоставимо с таковым из других объектов.

В ходе исследования по влиянию концентрации ионов водорода на активность ИЦЛ в щитках было показано, что данная зависимость активности ИЦЛ имела колоколообразный характер для обеих изоформ (рис.5). При этом максимальная активность для ИЦЛ<sub>1</sub> наблюдали при pH – 7,5. Для второй изоформы pH оптимум был несколько смещён в кислую область значений и был равен 6. Многочисленные исследования свидетельствуют, что pH оптимум для ИЦЛ, выделенной из различных источников, как правило - 7,5. Самая высокая активность фермента наблюдалась при использовании Tris-HCl- буфера с pH 7,5 [1].

Проводили исследования по влиянию различной концентрации глицина и гликолата на изоформы ИЦЛ. Показано, что глицин активировали обе формы фермента, но в различных концентрациях. Глицин увеличивал активность ИЦЛ<sub>1</sub> в концентрации 5  $\mu\text{M}$ , дальнейшее увеличение концентрации приводило к почти полному торможению активности фермента. Для ИЦЛ<sub>2</sub> максимальную активность наблюдали в присутствии глицина концентрации 10  $\mu\text{M}$ . Изоформы изоцитратлиазы существенно различались по влиянию гликолата. ИЦЛ<sub>1</sub> активировалась лишь малыми концентрациями гликолата (5  $\mu\text{M}$ ), тогда как вторая её форма проявляла высшую активность только при высоких концентрациях (100-500  $\mu\text{M}$ ).

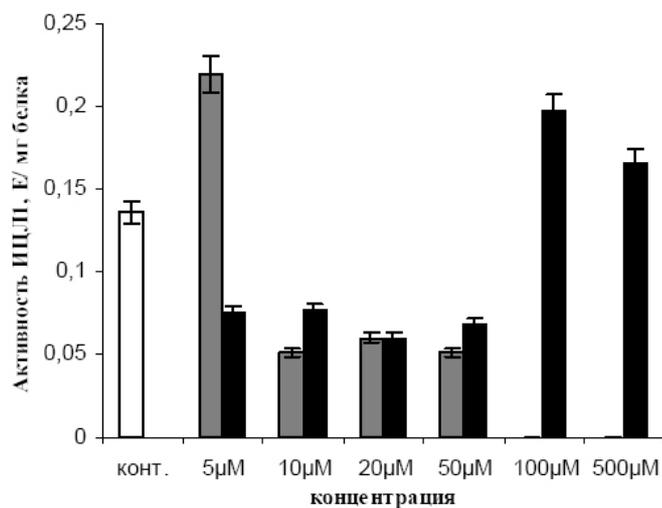


Рис. 5. Влияние глицина и гликолата на активность ИЦЛ<sub>1</sub>: □ - контроль; ■ - глицин; ■ - гликолат

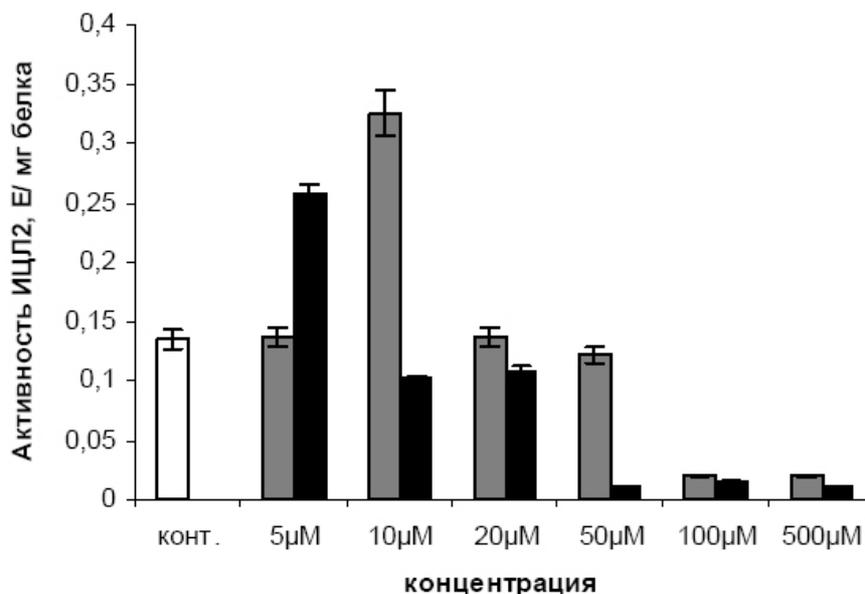


Рис. 6. Влияние глицина и гликолата на активность ИЦЛ<sub>2</sub>: □ - контроль; ■ - глицин; ■ - гликолат

Таким образом, использование ионообменной хроматографии в схеме многостадийной очистки позволило разделить изоформы изоцитратлиазы из щитков кукурузы и получить ферментные препараты в гомогенном состоянии. Исследование физико-химических и регуляторных свойств изоферментов ИЦЛ свидетельствует о их разной функциональной роли. Одна из форм участвует в метаболизации ацетила-СоА, образующегося при расщеплении жиров, утилизируя его через гликолатный цикл и обращенный гликолиз в доступную для клеток форму – глюкозу. Вторая форма может обеспечивать различные анаплеротические реакции, связанные с метаболизацией органических кислот, в частности глиоксилата.

---

## Список литературы

1. Епринцев, А.Т., Попов, В.Н., Шевченко, М.Ю. Глиоксилатный цикл. Универсальный механизм адаптации. М: Академкнига, 2007.
2. Jameel S., El-Gul T. and Mcfadden B. A. Isolation and properties of watermelon isocitrate lyase // *Phytochemistry*. 1984. Vol. 23. №12. P. 2753-27-59.
3. Lu Y., Wu Y.R., Han B. Anaerobic induction of isocitrate lyase and malate synthase in submerged rice seedlings indicates the important metabolic role of the glyoxylate cycle // *Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai)*. 2005. Vol. 37. №6. P. 406-414.
4. Bytof G., et al. Transient occurrence of seed germination processes during coffee post-harvest treatment // *Ann. Bot. (Lond)*. 2007. Vol. 100. №1. P. 61-66.
5. Kornberg H. L., Krebs H. A. Synthesis of cell constituents from C<sub>2</sub>-units by a modified tricarboxylic acid cycle // *Nature*. 1957. Vol. 179. P.988-991
6. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin pihend reagent // *J. Biol. Chem*. 1951. Vol. 193. P. 265-275.
7. Детерман Г. Гель-хроматография, М: Мир, 1970.
8. Davis B. J. Disc-electrophoresis II. Method and application to human Serum protein // *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 1994. Vol. 121. P. 404-427
9. Reeves H.C., Volk M.J. Determination of isocitrate lyase activity in polyacrylamide gels // *Anal. Biochem*. 1972. Vol. 48. №2. P. 437-441.
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227. P. 680–685.
11. Лакин Г. Ф. Биометрия, М: Высшая школа, 1980.
12. Землянухин А. А., Игамбердиев А. У., Преснякова Е. Н. Выделение и характеристика изоцитратлиазы из щитка кукурузы // *Биохимия*. 1986. Т. 51. Вып. 3. С. 442-448.
13. Землянухин А. А., Игамбердиев А. У. Регуляция активности изоцитратлиазы в растениях конопли // *Физиология растений*. 1985. Т. 32. Вып. 4. С. 739-746.
14. Vincenzini M. T., Nerozzi F., Vincieri F., Vanni P. Isolation and properties of isocitrate lyase from *Lupinus* seeds // *Phytochemistry*. 1980. Vol. 19. №5. P. 769-774.