



УДК 577.152.1:579.08

Использование ионообменной хроматографии для получения сукцинатдегидрогеназы из бактерий *Sphaerotilus natans* штамм Д-507

Бу Т. Л., Селиванова Н. В., Епринцев А. Т., Федорин Д. Н.

Воронежский государственный университет, Воронеж

Поступила в редакцию 2.03.2011 г.

Аннотация

С помощью метода ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой получили электрофоретически гомогенные препараты сукцинатдегидрогеназы (СДГ, КФ 1.3.99.1) из бесцветных серобактерий с удельной активностью 22 Е/мг белка (для первой изоформы) и 14,75 Е/мг белка (для второй изоформы); выходом 15,52% и 10,41%; степенью очистки 81,48 раз и 54,63 раз соответственно.

Ключевые слова: сукцинатдегидрогеназа, изоформы, ионообменная хроматография, электрофорез, *Sphaerotilus natans*.

Abstract: Using the method of ion-exchange chromatography on a column of DEAE-cellulose were electrophoretically homogeneous preparations of succinate dehydrogenase (SDH) from colorless sulfur bacteria with a specific activity of 22 units/mg protein (for the first isoform) and 14.75 units/mg protein (for the second isoform); yield 15.52%, and 10, 41%, degree of purification 81.48 and 54.63 respectively.

Keywords: succinate dehydrogenase, isoforms, ion-exchange chromatography, electrophoresis, *Sphaerotilus natans*

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, животных и микроорганизмов. В наших работах изучаются ферменты цикла трикарбоновых кислот, глиоксилатного шунта и других центральных метаболических путей [5,7].

Одной из ключевых реакций цикла, сопряженной с запасанием энергии, является реакция окисления сукцината до фумарата, катализируемая сукцинатдегидрогеназой (КФ 1.3.99.1), единственным ферментом, встроенным во внутреннюю мембрану митохондрий. В процессе протекания данной реакции образуется ФАДН₂, который может использоваться как источник энергии для различных процессов. СДГ – компонент не только цикла Кребса, но и электрон-

транспортной цепи, поэтому её регуляция связана с функционированием сразу двух ключевых процессов [8].

Сукцинатдегидрогеназа, являясь модулируемым многими факторами ферментом, занимает ключевое положение в регуляции дыхания митохондрий и играет важную роль в обеспечении взаимодействия клеточных органелл, однако данный фермент не охарактеризован у бесцветных серобактерий. В связи с этим, целью работы явилось получение высокоочищенных препаратов СДГ из бактерий *Sphaerotilus natans* с помощью ионообменной хроматографии и изучение их свойств.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили матообразующие бактерии рода *Sphaerotilus natans* штамм Д-507, выращенные в условиях органотрофного роста. Бактерии выделены из термальных источников Краснодарского края. Для культивирования использовали питательную среду следующего состава (мг/л): NH_4Cl – 300; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 34,4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 22,5; CaCl_2 – 27,5; KH_2PO_4 – 8,5; K_2HPO_4 – 21,5; пептон – 500; дистиллированная вода; рН среды 7,5 [1]. Перед посевом в среды вносили раствор микроэлементов и витаминов – 1 мл/л. Суспензию клеток получали путем центрифугирования культуры при 8000g и 4°C в течение 10 мин. Клетки отмывали 0,1 М калий-фосфатным буфером (рН 7,5).

Активность фермента определяли на СФ-2000 (ЛОМО, Россия) спектрофотометрическим методом, основанным на использовании искусственных акцепторов электронов с соответствующим редокс-потенциалом [3]. Содержание белка в пробе определили по методу Лоури [9].

Для получения высокоочищенных препаратов СДГ была использована схема очистки, включающая пять стадий. Все операции проводили при температуре 0- 4°C. Культуры клеток разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т при мощности 500 Вт и частоте 22 кГц в течение 2,5 мин в ледяной бане с последующим добавлением Triton X-100 4,02% (0,002% к объёму гомогената). Супернатант получали после центрифугирования клеточных экстрактов при 5000 g в течение 4 мин. Фракционирование белков супернатанта осуществляли сульфатом аммония (20 – 60% насыщения). Полученный раствор центрифугировали 30 мин. при 12000 g. Гель-фильтрацию проводили на колонке (1,5 × 20 см), заполненной сефадексом G-25 («Pharmacia», Швеция) для освобождения от низкомолекулярных примесей. Ионообменную хроматографию проводили на колонке (1,5 × 12 см) с ДЭАЭ-целлюлозой («Whatman», Англия). Элюцию осуществляли линейным градиентом KCl от 20 до 150 мМ.

Электрофоретические исследования белков проводили в 7,5% полиакриламидном геле [10]. Универсальное окрашивание белков в гелях осуществляли с помощью AgNO_3 , для специфической идентификации СДГ использовали тетразолиевый метод со средой следующего состава: калий-фосфатный буфер 0,1 М (рН 7,5), 0,1 М сукцинат натрия, 0,5 мг/мл нитросинего тетразолия и 1 мг/мл ФМС [4].

Результаты и их обсуждение

С помощью электрофореза в 7,5% ПААГ с последующим специфическим окрашиванием на активность СДГ в бесцветных серобактериях были обнаружены

две изоформы фермента с различной электрофоретической подвижностью (рис.1). Множественные формы СДГ были описаны ранее, по крайней мере для эукариот [6].

Для получения гомогенного препарата СДГ из *Sphaerotilus natans* штамм Д-507 была проведена 5-стадийная очистка, результаты которой представлены в табл. 1. После элюции белков с ДЭАЭ-целлюлозы линейным градиентом КС1 (20-150мМ) удельная активность для одной изоформы фермента (СДГ₁) равнялась 22 Е/мг белка, при этом степень очистки составила 81,48 раз, выход - 15,5%. Для второй изоформы (СДГ₂) значение удельной активности было 0,59 Е/мг белка, а степень очистки и выход – 54,63 раз и 10,41%, соответственно.

Таблица 1. Очистка сукцинатдегидрогеназы из бактерий (n=3, p<0,05)

Стадия очистки	Объём. мл	Общая активность. Е	Общий белок. мг	Удельная активность. Е/мг белка	Выход. %	Степень очистки
Гомогенат	4	5.67	21.36	0.27	100	1
Супернатант	3.4	0.24	14.60	0.02	4.23	0.07
Фракционирование сульфатом аммония	3.5	5.01	10.80	0.46	88.36	1.70
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	2	1.26	1.47	0.86	22.22	3.19
Хроматография на ДЭАЭ- целлюлозе	1	0.88	0.04	22	15.52	81.48
	2	0.59	0.04	14.75	10.41	54.63

Важнейшим этапом очистки является ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе, позволившая получить исследуемый фермент в высокоочищенном состоянии.

Электрофоретический анализ очищенных препаратов показал, что при универсальном окрашивании на белки обнаруживалось по одной белковой полосе (рис.1). Таким образом, было установлено, что у бесцветных серных бактерий *Sphaerotilus natans* штамм Д-507 присутствуют две формы фермента, имеющие разную электрофоретическую подвижность: СДГ₁ с $R_f = 0,10$ и СДГ₂ с $R_f = 0,34$.

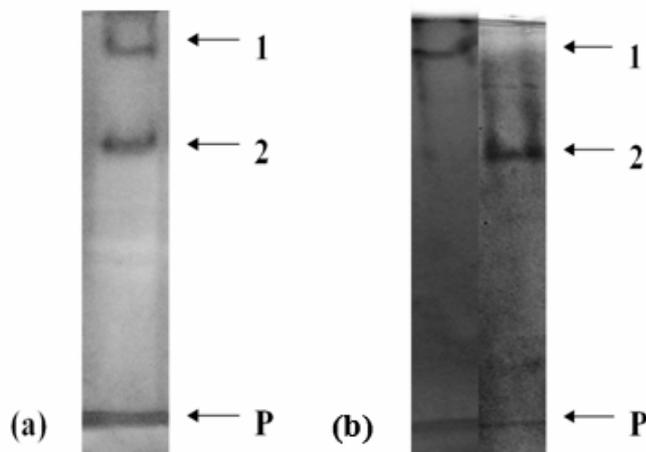


Рис. 1. Электрофореграммы препаратов СДГ из *Sphaerotilus natans* Д-507, (а) – специфическое проявление, (б) – окрашивание изоформ нитратом серебра, 1 – белковая полоса с $R_f = 0,10$ (СДГ₁), 2 – белковая полоса с $R_f = 0,34$ (СДГ₂), P – фронт

Получение гомогенных препаратов СДГ позволило провести сравнение их кинетических характеристик. Исследование K_m показало, что обе изоформы фермента подчиняются кинетике Михаэлиса – Ментен. Значение K_m для первой и второй изоформ составило 3,85 мМ и 2,08 мМ, соответственно. K_m СДГ из *Sulfolobus acidocaldarius* – 1,42 мМ [11] и *Rhodothermus marinus* – 0,165 мМ [12]. Эти данные показали, что СДГ из микроорганизмов имеет невысокое сродство к сукцинату.

Известно, что СДГ - крайне лабильная структура [2]. Одним из факторов, влияющих на работу данного фермента, является температура. В ходе экспериментов показано, что через двадцать пять часов инкубации при комнатной температуре исследуемый фермент был полностью инактивирован, при температуре 4°C также наблюдалось значительное (83,8%) снижение активности СДГ. Тогда как хранение сукцинатдегидрогеназы при -20°C и -70°C практически не повлияло на ее функционирование (потеря активности составила 10,7%).

Таким образом, была разработана эффективная схема очистки СДГ из *Sphaerotilus natans* штамм Д-507, включающая ионообменную хроматографию. Полученные в гомогенном состоянии препараты сукцинатдегидрогеназы позволяют изучить регуляторные и физико-химические свойства этого важнейшего фермента клеточного метаболизма.

Список литературы

1. Арабцева М.А. Очистка и регуляторные свойства тетрамерной формы малатдегидрогеназы из бактерий *Sphaerotilus natans* // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. – 2008. – №1. – С. 69-73.
2. Ackrell A. C. Effect of membrane environment on succinate dehydrogenase activity // The Journal of Biological Chemistry. – 1976. – Vol. 252. – № 5. – P. 1582-1588.
3. Землянухин А.А., Землянухин Л.А. Большой практикум по физиологии и биохимии растений // Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та. – 1996. – 185 с.
4. Епринцев А.Т., Климова М.А. Очистка ферментов и методы исследования их каталитических свойств // Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та. – 2008. – 26 с.
5. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Шевченко М. Ю. Глиоксилатный цикл: универсальный механизм адаптации? // М.: ИКЦ «Академкнига», 2007. – 228 с.
6. Епринцев А.Т., Попов В. Н., Федорин Д. Н. Сукцинатдегидрогеназа выших растений // Воронеж: ООО Центрально-Черноземное книжное изд-во. – 2010. – 184 с.
7. Tornroth Susanna, Yankovskaya Victoria, Cecchini Gary, Iwata So. Purification, crystallization and preliminary crystallographic studies of succinate: Ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli* // Biochem. et biophys. acta. Bioenerg. № 1-2. – 2002. – т. 1553. – P. 171-176.
8. Федорин Д. Н. Световая регуляция функционирования сукцинатдегидрогеназы в листьях растений // Автореф. диссертации к.б.н. –Воронеж. – 2007. – 24 с.
9. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. - 1951. - Vol. 193. - P. 265-275.
10. Davis B.J. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum protein // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 1994. – Vol. 121. – P. 404-427.
11. Moll R., Schafer G. Purification and characterisation of an archaebacterial succinate dehydrogenase complex from the plasma membrane of the thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius* // Eur. J. of Biochem. 1991. Vol. 201. № 3. P. 593-600.
12. Fernandes Andreia S., Pereira Manuela M., Teixeira Miguel. The succinate

dehydrogenase from the thermohalophilic bacterium *Rhodothermus marinus*: Redox-bohr effect on Heme b[L] // J. Bioenerg. And Biomembr. 2001. Vol. 33. № 4. P. 343-352.

Ву Тхи Лоан – аспирант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, тел.(473)2208877

Селиванова Наталия Владимировна – аспирант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

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

Федорин Дмитрий Николаевич – к.б.н., кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

Vu Thi Loan – graduate student, Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Selivanova Natalia V. – graduate student, Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh

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

Fedorin Dmitry N. – Ph.D of Biology, Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh