



УДК 541

Ионообменная хроматография – необходимый этап для разделения изоферментов глиоксилатного цикла

Сальников А.В., Мирошниченко Л.А., Хаба А.М.,
Гати Моханнад А.Г., Епринцев А.Т.

Воронежский государственный университет, Воронеж

Поступила в редакцию 13.12.2011 г.

Аннотация

Применение ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе позволило получить препараты изоферментов изоцитратлиазы и аконитатгидратазы из животных и растительных объектов в высокоочищенном электрофоретически гомогенном состоянии. Исследованы кинетические и физико-химические свойства выделенных энзимов.

Ключевые слова: аконитатгидратаза, изоцитратлиаза, аконитаза, изоферменты, электрофорез, ионообменная хроматография, изоформа.

The use of ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose yielded drugs and aconitate hydratase isoenzymes of isocitrate lyase from animal and plant facilities in a highly purified electrophoretically homogeneous state. Kinetic and physico-chemical properties of isolated enzymes.

Keywords: aconitate hydratase, isocitrate lyase, aconitase, isozymes, electrophoresis, ion exchange chromatography, isoform

Введение

В последнее время ферменты глиоксилатного цикла являются объектами значительного количества исследований [2; 4; 5; 7]. Однако, основное внимание направлено на их изучение из растений и микроорганизмов. Глиоксилатный цикл, являясь важнейшим этапом глюконеогенеза, осуществляет синтез из двух молекул ацетил-КоА одной молекулы сукцината, используемой для синтеза углеводов [8]. Появились серьезные публикации об индукции глиоксилатного цикла в животных тканях. Наличие ферментов β -окисления жирных кислот в животных пероксисомах и феномен ресинтеза гликогена в печени крыс при некоторых патологиях позволяет предположить возможность индукции ферментов глиоксилатного цикла [2; 9]. Особый интерес вызывает функционирование аконитатгидратазы (АГ; КФ 4.2.1.3), участвующей в функционировании, как цикла Кребса, так и глиоксилатного цикла, а также изоцитратлиазы (ИЦЛ; КФ 4.1.3.1.) – ключевого фермента в процессе трансформации липидов в доступные для организма формы углеводов. Рядом авторов было показано наличие двух изоферментных форм растительной аконитатгидратазы в цитоплазме и глиоксисомах, а также в митохондриях [6; 8; 11]. В работах по изучению распространения аконитазной активности в животных тканях

установлено аналогичное распределение локализации данного фермента. Исоцитратлиаза растений представлена двумя формами, имеющими глиоксисомальную и цитоплазматическую локализации [4]. У животных ИЦЛ может быть как в одной форме, так и в нескольких изоформах [6].

Эксперимент

Целью данной работы являлась разработка способов получения аконитатгидратазы и изоцитратлиазы из животных и растительных клеток с применением ионообменной хроматографии.

В качестве объектов исследования использовали самцов беспородных лабораторных крыс (*Rattus rattus L.*) массой 200-300г., которые выращивались при обычных условиях питания; проростки семян амаранта (*Amaránthus caudatus L.*) сорта «Рыжик» и соя (*Glycine max L.*) сорта «DT-84», выращенные гидропонным способом; эмбрионы птиц *Gallus domesticus L.*, яйца которых инкубировали при температуре 39⁰ С в течение 21-го дня.

Активность АГ из печени крыс и из амаранта определяли спектрофотометрическим методом по разнице поглощения цитрата по сравнению с цис-аконитовой кислотой при длине волны 240 нм (по увеличению оптической плотности раствора). Активность изоцитратлиазы из сои и из печени эмбрионов птиц измеряли спектрофотометрически по изменению поглощения света при длине волны 324 нм, за счёт образования комплекса фенилгидразина с глиоксилатом[.]

За единицу активности принимали количество фермента, превращающее 1 мкМ субстрата или образующее 1 мкМ продукта за 1 минуту при 25⁰С и оптимальном значении рН.

Для получения высокоочищенных препаратов изоферментов применяли модифицированные схемы очистки:

1. Гомогенизацию материала осуществляли в среде выделения. Гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 5000 g.

2. Фракционирование сульфатом аммония. Белки из надосадочной жидкости осаждали сульфатом аммония. Полученный раствор центрифугировали 20 мин при 12000 g.

3. Гель-фильтрация на колонке (1.5 × 20 см) с сефадексом G-25 («Pharmacia», Швеция) для освобождения ферментных препаратов от низкомолекулярных примесей. Объем наносимого образца не превышал 3 мл. Элюцию проводили трис-НСl буфером со скоростью 15–20 мл/ч.

4. Ионообменная хроматография на колонке (1.5 × 15 см) с ДЭАЭ-целлюлозой («Whatman», Великобритания), предварительно уравновешенной Трис-НСl буфером. Фермент десорбировали с колонки в линейном градиенте концентрации КСl (50–150 мМ в среде элюирования). Все операции проводили при 4⁰С.

В ходе исследований для разделения белков применялся метод диск-электрофореза в 7,5% ПААГ при 4⁰С по модифицированному методу Девиса с последующим универсальным и специфическим окрашиванием геля. Универсальное окрашивание проводили с нитратом серебра. Для специфической идентификации АГ использовали тетразолиевый метод. Специфическую идентификацию изоцитратлиазы осуществляли с помощью модифицированного реагента Шиффа.

Обсуждение результатов

Использование модернизированной схемы очистки позволило получить гомогенные препараты изоферментов ИЦЛ из сои вьетнамского сорта «DT-84» (табл. 1).

Таблица 1 Очистка изоцитратлиазы из сои вьетнамского сорта «DT-84» (n=3; P≤0,05)

Стадии очистки	Объём, мл	Общий белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	18	197.52	8.19	0.04	100	1
Фракционирование сульфатом аммония	2	41.48	6.75	0.16	82.42	4.00
Гель-фильтрация на G-25	3	37.25	6.33	0.17	77.29	4.25
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	1	2	0.32	0.80	9.77	62.50
	2	2	0.25	0.89	10.87	89.00

Так, параметры препаратов фермента из сои вьетнамского сорта «DT-84» составляли: удельная активность для одной изоформы фермента (ИЦЛ₁) равнялась 2,50 Е/мг белка, при этом степень очистки составила 62,50 раза, выход – 9,77 %. Для второй изоформы (ИЦЛ₂) значение удельной активности составило 3,56 Е/мг белка, а степень очистки – 89,00 раз, выход – 10,87% (табл. 1). Максимальную элюцию одной из форм наблюдали при концентрации градиента 66,67 мМ раствора хлорида калия, а второй – при 100 мМ.

Проведенный электрофоретический анализ очищенных препаратов ИЦЛ из сои разных сортов показал, что в полиакриламидном геле, при окрашивании нитратом серебра, раствором кумасси бриллиантового голубого G-250 и специфическом проявлении модифицированным реагентом Шиффа выявили две белковые полосы с $R_f = 0,28$ и $R_f = 0,44$ (рис. 1).

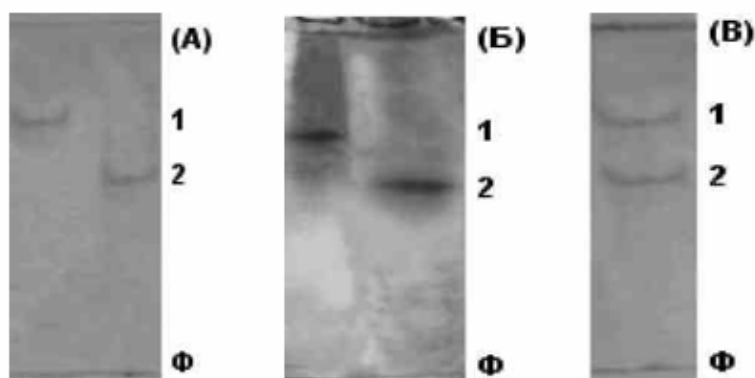


Рис. 1. Электрофореграммы препаратов ИЦЛ из семядолей проростков сои: А – окрашивание изоформ нитратом серебра, Б – окрашивание изоформ раствором кумасси, В – специфическое проявление гомогената, 1 – белковая полоса с $R_f = 0,28$ (ИЦЛ₁), 2 – белковая полоса с $R_f = 0,44$ (ИЦЛ₂), Φ – фронт красителя бромфенолового синего

Изучение каталитических характеристик двух изоформ ИЦЛ показало, что обе изоформы фермента подчиняются кинетике Михаэлиса – Ментен. Константа Михаэлиса, характеризующая сродство изоцитратлиазы к субстрату, для первой изоформы составляла 16 мкМ, для второй изоформы – 50 мкМ, т. е. первый изофермент обладает большим сродством к субстрату.

В результате многостадийной очистки были получены ферментные препараты ИЦЛ из печени эмбрионов птиц *Gallus domesticus L* с удельной активностью 6, 87 Е/мг белка, степенью очистки 36, 16 и выходом 8, 41% (Табл. 2).

Таблица 2. Очистки ИЦЛ из печени зародыша птиц (n=3; P≤0,05)

Стадии очистки	Общий объем, мл	Белок, мг/мл	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	14.4	55.6	10.7	0.19	100	1
Высаливание	2.15	14.5	8.84	0.61	82.6	3.21
Гель-фильтрация через сефадекс G-25	4.6	13.9	8.83	0.63	82.5	3.32
Ионообменная хроматография на DEAE-Тоуорpearl	4.0	0.34	1.14	3.35	10.7	17.63
Гель-хроматография на Тоуорpearl HW-60	5.15	0.131	0.9	6.87	8.41	36.16

Электрофоретические исследования полученного ферментного препарата в ПААГ в неденатурированных условиях показали наличие на электрофореграммах одной белковой полосы с R_f равной 0.12, поэтому можно утверждать, что полученный ферментный препарат гомогенен (рис.2.)

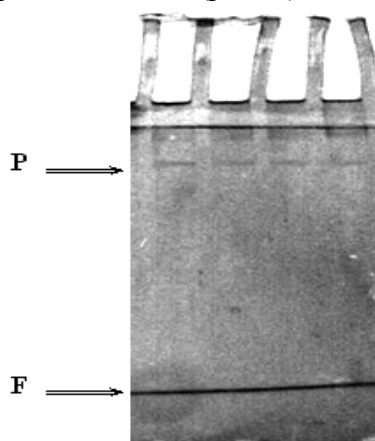


Рис. 2. Электрофореграмма ИЦЛ, очищенной из печени зародыша птиц. P-белковая полоса; F-фронт красителя бромфенолового синего

Изучение кинетических свойств показало, что фермент подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен, константа Михаэлиса для лиазной реакции по изоцитрату составила 5 мМ.

ИЦЛ представляет собой фермент, подчиняющийся кинетике Михаэлиса-Ментен. Единственное сообщение, которое противоречит этим данным, касается

ИЦД из *Chlorella vulgaris*, кинетика которой проявляет кооперативность, т.е. фермент обнаруживает аллостерические свойства.

При определении рН оптимума изоцитратлиазы из эмбрионов птиц полученные данные свидетельствуют о том, что ИЦД проявляет максимальную активность в 50 мМ Tris HCL при рН=7,5.

Фермент - это белок, следовательно, рН влияет на состояние ионизации его функциональных групп, то есть на распределение заряда внутри молекулы. Так как распределением заряда определяется способность субстрата взаимодействовать с ферментом, то рН оказывает воздействие на ферментативную активность. Все белки проявляют каталитические способности внутри определенных пределов концентрации ионов водорода в растворе. Изменение рН меняет степень диссоциации кислотных и основных групп, нарушает взаимодействие и устойчивость третичных структур, а так же меняет течение биохимических реакций.

Для получения гомогенного препарата аконитазы из семян амаранта была проведена 4-х стадийная очистка, результаты которой представлены в таблице 3. Применение данной схемы очистки позволило получить цитоплазматическую форму аконитазы в гомогенном состоянии. Для аконитазы, полученной из амаранта, удельная активность составила 1,74 Е/мг белка; степень очистки составила 21,75 раз; выход 5,4 %.

Таблица 3. Очистка цитоплазматической формы аконитазы из проростков амаранта (n=3, P<0,05)

Стадия очистки	Объём, мл	Общая активность, Е	Общий белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	6.2	3.868	48.3	0.08	100	1
Фракционирование сульфатом аммония	2.5	1.938	12.6	0.1538	52	1.92
Гель-фильтрация на G-25	3	1.741	9.66	0.1803	47	2.25
Ионообменная хроматография на ДЭАЕ-целлюлозе	2	0.2089	0.12	1.74	5.4	21.75

Важную роль в получении высокоочищенного препарата играла ионообменная хроматография на DEAE-целлюлозе. Использование линейного градиента KCl (60-120мМ) позволило получить высокую эффективность очистки и выхода фермента. При очистке цитоплазматической формы аконитазы из проростков семян амаранта был получен один пик элюции ферментной активности при концентрации 68 мМ KCl.

Проведенный электрофоретический анализ очищенного препарата показал, что в полиакриламидном геле, окрашенном кумасси, проявилась одна белковая полоса с R_f 0,58 (рис. 3). При специфическом проявлении также обнаруживалась одна полоса, обладающая аконитазной активностью. Полосы после специфического проявления на активность и окрашивания на белок совпадают.

При изучении каталитических свойств цитоплазматической формы АГ, выделенной из семян амаранта, показано, что кинетика реакций подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. Значение константы Михаэлиса определяли по

методу Лайнуивера-Берка. Как видно из приведённых данных, значение K_m по изоцитрату составило 1,8 мМ, а по цитрату 9,6 мМ.

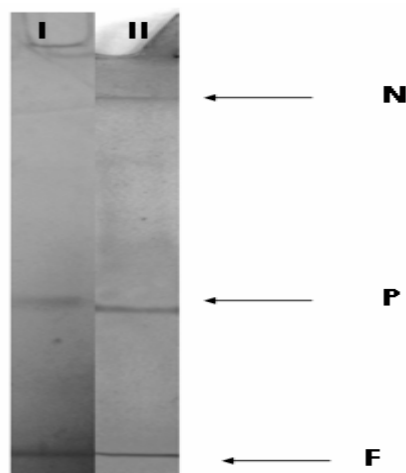


Рис. 3. Электрофореграммы препаратов АГ из проростков амаранта: I – окрашивание кумасси; II – специфическое проявление из семян амаранта; N – начало разделяющего геля; P – белковая полоса; F – фронт красителя.

Изучение влияния концентрации ионов водорода на активность АГ проводили в трис-НСl буфере, в качестве субстрата использовали цитрат. Исследования показали, что зависимость активности АГ от концентрации ионов водорода имеет колоколообразный характер. При этом оптимальное значение рН, при котором наблюдалась максимальная активность фермента равнялось 8,0.

Для изучения физико-химических и регуляторных свойств АГ из гепатоцитов крыс в норме нами была проведена очистка цитоплазматической и митохондриальной изоформы изучаемого фермента.

Последовательное применение указанных выше стадий очистки (табл. 4) позволило получить цитозольную фракцию фермента из гепатоцитов опытных животных с удельной активностью 11,1 Е/мг белка, что соответствует очистке в 231,5 раз и выходу – 10 % и митохондриальную – с удельной активностью – 6,13 Е/мг белка, очисткой – в 122,6 раз и выходом – 15 %.

Таблица 4. Очистка цитоплазматической аконитатгидратазы из гепатоцитов опытных крыс ($n = 3$, $p < 0.05$)

Стадии очистки	Объем, мл	Общая активность, ФЕ	Количество белка, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Цитозольная фракция	30.5	11.61	239.169	0.048	100	1.0
Фракционирование $(\text{NN}_4)_2\text{SO}_4$, 35-65%	5.0	8.51	83.151	0.103	74	2.2
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	8.0	6.20	30.878	0.197	53	4.1
Хроматография на ДЭАЭ-Тоуорpearl	9.5	2.89	0.720	4.111	25	84.0
Гель-фильтрация на Тоуорpearl HW-65	6.0	1.12	0.099	11.089	10	231.5

Электрофоретические исследования в ПААГ полученных препаратов цитоплазматической и митохондриальной изоформы аконитазы показали наличие на электрофореграммах одной белковой полосы с R_f 0,7 и 0,62 соответственно. Следовательно, можно утверждать о гомогенности полученных изоформ фермента (рис. 4). С помощью специфического проявления на активность АГ было установлено, что полученные электрофоретически гомогенные препараты фермента обладают аконитазной активностью.

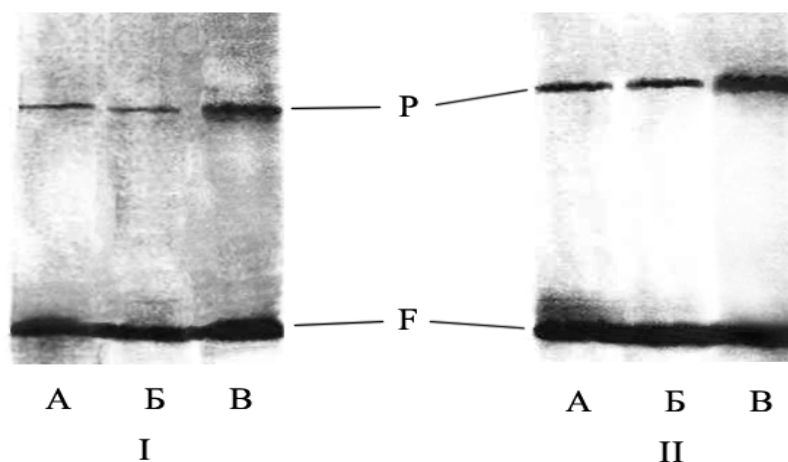


Рис. 4. Электрофореграммы аконитатгидратазы из гепатоцитов крыс: I - цитоплазматическая аконитатгидратаза; II - митохондриальная аконитатгидратаза; А - универсальное окрашивание амидом черным; Б - универсальное окрашивание амидом черным; В - специфическое проявление; Р - белковая полоса; F - фронт красителя бромфенолового синего

Получение ферментов в электрофоретически гомогенном состоянии позволило исследовать их физико-химические свойства. Такие исследования необходимы для выяснения физиологической роли АГ, которая принимает участие в осуществлении, как энергетического, так и конструктивного метаболизма [1].

При изучении физико-химических свойств аконитазы было установлено, что фермент подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен. Зависимость скорости реакции, катализируемой АГ, от концентрации субстрата (цитрат, изоцитрат и цис-аконитат) представлена ниже.

Так, определена величина K_m по цитрату для цитоплазматической изоформы - 83,52 мкМ. Для фракции, локализованной в митохондриях, это значения K_m составило 20,12 мкМ. Рассматривая влияние изоцитрата и цис-аконитата были установлены намного меньшие значения данной константы. Например, по цис-аконитату для цитоплазматической изоформы в опыте K_m составила 14,65 мкМ, а для митохондриальной - 4,20 мкМ. Максимальная скорость работы митохондриальной изоформы была в 4,5 раза меньше, чем у цитозольного фермента. Так, значения V_{max} для цитоплазматической и митохондриальной изоформ, выделенных из гепатоцитов опытных крыс, составили $2,06 \pm 0,017$ Е/мг белка и $0,045 \pm 0,009$ Е/мг белка (субстрат - цитрат).

Анализ полученных данных показывает, что наибольшее сродство цитоплазматическая и митохондриальная изоформы фермента имели к цис-аконитату, тогда как сродство к изоцитрату и цитрату было значительно меньше, хотя величина K_m (по лимонной кислоте) была выше значения данной константы (по изолимонной кислоте) почти в 3 раза. Определенные значения K_m по цитрату,

изоцитрату, цис-аконитату свидетельствуют об увеличении этого показателя в ряду: цис-аконитат \rightleftharpoons изоцитрат \rightleftharpoons цитрат для обеих изучаемых изоформ фермента.

Для изучения рН-оптимума исследуемых изоформ фермента, выделенных из гепатоцитов крыс, использовались буферные системы: Трис-НС1, NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 . Наибольшую активность АГ проявляла в интервале рН 6,8-8,0 (табл. 6). Самая высокая активность цитоплазматического фермента и в контрольных и опытных образцах наблюдалась при использовании Трис-НС1-буфера рН 8,0; натрий-фосфатного в контроле - рН 7,4, при голодании - 7,2. Рассматривая влияние концентрации ионов водорода на активность митохондриальной АГ было установлено, что в Трис-НС1-буфере оптимум рН составил 7,6-7,4 соответственно в контроле и опыте: 4 день, а в Na-фосфатном - 7,0-6,8 соответственно (табл. 6). Таким образом, цитозольная форма имела рН оптимум, сдвинутый в щелочную область по сравнению с митохондриальной изоформой, что, по-видимому, обусловлено состоянием среды в цитоплазматической фракции. Известно, что рН внутренней среды матрикса митохондрий находится в районе 7,0-7,2.

Заключение

Использование ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе является необходимым условием для разделения изоферментов, характеризующимися близкими значениями молекулярной массы и сходством четвертичной структуры. Этот этап является ключевым для получения в гомогенном состоянии изоформ аконитатгидратазы и изоцитратлиазы. Интересно отметить, что характер очистки, включающий четыре этапа, обладал универсальными свойствами для энзимов из разных биологических источников. Выделение изоферментов в чистом состоянии открывает широкие перспективы для их комплексного изучения. В частности, в нашей работе установлена четвертичная структура молекулы, а также кинетические и физико-химические свойства.

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., Климова М.А. Очистка ферментов и методы исследования их каталитических свойств – Воронеж:Изд-во Воронеж. Гос. ун-та, 2008. – 36с.
4. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Шевченко М.Ю. Глиоксилатный цикл: универсальный механизм адаптации? // М.: ИКЦ «Академкнига», 2007. – 228 с.
5. Епринцев А.Т., Шевченко М. Ю., Попов В.Н. Очистка и физико-химические свойства изоцитратлиазы из куколок бабочки *P. machaon L.* // Биохимия. – 2004. – Т.69, № 4. – С. 467-472.
6. Епринцев А.Т., Шевченко М.Ю., Попов В.Н. Распространение глиоксилатного цикла у организмов различных таксономических групп // Успехи современной биологии. — М., 2008. — Т. 128, № 3. - С. 271-280.
7. Епринцев А.Т., Шевченко М.Ю., Попов В.Н. Экспрессия и регуляция ферментов

глиоксилатного цикла– Воронеж: Центрально-Черноземное книжное издательство, 2005. – 224с.

8. Землянухин А.А., Землянухин Л.А., Епринцев А.Т., Игамбердиев А.У. Глиоксилатный цикл растений – Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 1986. – 148 с.

9. Попов В.Н., Волвенкин С.В., Епринцев А.Т., Игамбердиев А.У. Индукция ферментов глиоксилатного цикла в различных тканях голодающих крыс // Известия РАН. Серия биологическая – 2000. – № 6. – С. 663-667.

10. Чан Тхи Хоанг Куен., Епринцев А.Т., Маслова Е.В. Разделение изоферментов изоцитратлиазы из щитков кукурузы с помощью ионнообменной хроматографии // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – Т.8, № 2. – С. 297-303.

11. De los Reyes B.G., Myers S. J., McGrath J. M. Differential induction of glyoxylate cycle enzymes by stress as a marker for seedling vigor in sugar beet (*Beta vulgaris*) // Mol. Genet. Genomics. – 2003. – Vol. 269, №5. –P. 692–698.

Сальников Алексей Владимирович – аспирант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

Мирошниченко Лидия Александровна – к.б.н., кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

Хаба Ассиль Мундер – аспирант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

Гати Моханнад Абдулраззак – аспирант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

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

Salnikov Alexey V. – graduate student, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh

Miroshnichenko Lydia A. – Ph.D., Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh

Haba Assilem M. – graduate student, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh

Gati Mohannad A. – graduate student, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh

Eprintsev Alexander T. – Professor, Head of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh