

УДК 577.11

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОФОРМ ГЛИКОЛАТОКСИДАЗЫ ИЗ C₄-РАСТЕНИЙ

© 2005 г. А.Н. Ивентьев, В.Н. Попов, А.Т. Епринцев, А.Б. Пузырев

Воронежский государственный университет

Из разных тканей C₄-растений выделены и получены в высокоочищенном или гомогенном состоянии изоформы гликолатоксидазы. Изучены физико-химические характеристики различно локализованных форм фермента. Установлена четвертичная структура гликолатоксидазы, включающая 4–8 субъединиц двух типов. Делается заключение о различной функциональной роли изоформ.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одним из наиболее приоритетных направлений в биологических исследованиях в целом и в биохимических в частности, является изучение клеточного метаболизма растений. Установлено, что существует группа растений (C₄-тип) с отличным от других типом метаболизма. В первую очередь это проявляется в наличии адаптации к процессу фотодыхания, которая, как известно, может снижать продуктивность растений на 40–60%/1/. Для предотвращения данного процесса у растений C₄-типа процесс фотосинтеза разделен в пространстве между клетками обкладки проводящих пучков и мезофиллом, что вызывает снижение концентрации O₂ в клетках обкладки проводящих пучков и, следовательно, не дает РУБФ-карбоксилазе функционировать, как оксигеназе /2,3,4/.

Для изучения биохимических и генетических механизмов, обуславливающих явление фотодыхания, необходимо максимально точное исследование ферментативного аппарата клеток растений, что кроме фундаментального, имеет и практическое значение. В последствии данные исследования позволят разработать способы адаптации культурных растений к сложным условиям окружающей среды и повысить их урожайность. Исходя из этого, целью наших исследований было выделение высокоочищенных форм гликолатоксидазы (ГО КФ: 1.1.3.15.) из различных тканей C₄-растений (амаранта, кукурузы, сорго, табака) и исследование их физико-химических характеристик и функционального значения.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования применяли зеленые листья проростков амаранта, кукурузы, сорго, табака. Растения выращивали гидропонным методом при температуре 20-22°C. Для проведения

эксперимента использовали зеленые листья 18-ти дневных проростков. Активность ГО определяли спектрофотометрически на СФ-46. Реакционная среда состояла из 0,05 М трис-НСI буфер, рН 7,5, содержащий 5 мМ Mg Cl₂, 0,5 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 5 мМ гликолата, 4 мМ фенилгидразин-НСI, 0,12 мМ ФМН. При этом реакцию инициировали внесением ферментного препарата. Об активности фермента судили по увеличению поглощения при 324 нм, что обуславливалось образованием комплекса гликоксилата с фенилгидразином.

Активность ФЕП-карбоксилазы определяли спектрофотометрически на СФ-46. Реакционная среда представляла собой 0,1 М трис-НСI буфер, рН 8,2, содержащий 5 мМ Mg Cl₂, 50 мМ NaHCO₃, 1 ФЕ/мл МДГ, 10 мМ ФЕП, 0,25 мМ НАДН. Реакцию инициировали внесением НАДН. Об активности судили по уменьшению оптической плотности при 340 нм, обусловленному утилизацией НАДН. Определение активности НАДФ-зависимой глицеральдегидфосфатдегидрогеназы проводили спектрофотометрически на СФ-46. Реакционная среда представляла собой 0,1 М глициновый буфер, рН 8,5, содержащий 50 мМ NaHPO₄, 5 мМ Na₃ASO₄, 1 мМ НАДФ, 5 мМ ЭДТА. Реакцию инициировали внесением 10 мМ 3-ФГА. Об активности фермента судили по увеличению поглощения при 340 нм, обусловленному образованием НАДФН. Содержание белка определяли по Лоури. ГО очищали при 0-4°C в несколько этапов по следующей разработанной нами схеме:

Первый этап. Получение гомогената. При экстракции ГО из целых листьев растительный материал гомогенизировали в среде выделения (50 мМ трис-НСI буфер, рН 7,5, 5 мМ ДТТ и 1 мМ ЭДТА). Фильтровали через 4 слоя марли и центрифугировали 15 минут при 3000 г. Для дальнейшей очистки использовали полученный супернатант.

В ситуации с разделением клеток обкладки и мезофилла, применялась следующая методика получения гомогената.

Растительный материал гомогенизировали в среде выделения (50 мМ трис-НСI буфер, рН 7,5, 5 мМ ДТТ и 1 мМ ЭДТА) с помощью размельчителя тканей при температуре 4°С. Жидкую фракцию отделяли, фильтруя через несколько слоев марли. Таким образом, получали гомогенат клеток мезофилла. Оставшийся в марле растительный материал промывали 50 мМ трис-НСI буфером, затем растирали в фарфоровой ступке с кварцевым песком при температуре 4°С, получая гомогенат клеток обкладки.

Второй этап. Фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Белки из надосадочной жидкости осаждали $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (65-75% насыщения). Для этого в ферментную вытяжку добавляли сухой $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при постоянном помешивании магнитной мешалкой. Количество добавляемого $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на объем вытяжки рассчитывали по таблице Гродзинского. В процессе высаливания осуществляли постоянный контроль рН среды. Осадок собирали центрифугированием в течение 40 минут при 8000g растворяли в 10 мМ трис-НСI буфере, рН 7,5, содержащем 1 мМ ДТТ.

Третий этап. Гель-фильтрация через сефадекс G-25.

Полученную фракцию наносили на колонку с G-25 (1,3 x 20 см) используемую для освобождения от $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и низкомолекулярных примесей и элюировали со скоростью 0,5 мл/мин. 10 мМ трис-НСI буфером, содержащим 1 мМ ДТТ. Отсутствие NH_4^+ в активных фракциях элюата проверяли при помощи реактива Несслера.

Четвертый этап. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-фрактогеле

Раствор фермента наносили на колонку из ДЭАЭ-фрактогелем (1,3x18см), уравновешенную тем же

буфером и элюировали фермент линейным градиентом КСI. Скорость элюции составила 0,3 мл/мин.

Молекулярную массу нативного белка определяли с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-150, молекулярную массу субъединиц – методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Для построения калибровочной кривой использовали стандартные маркерные белки (кДа): целлюлозу – 94.6; БСА – 66.2; яичный альбумин – 45; карбоангидразу – 31; ингибитор трипсина – 21.5, лизоцим – 14.4/5/.

Нативный электрофорез проводили по модифицированной методике Девиса в 10% полиакриламидном геле. Для специфического проявления ГО применяли методику с использованием модифицированного реагента Шиффа. Для детекции белка использовали методику с нитратом серебра /1/.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Применение 4-х стадийной очистки позволило выделить и получить в высокоочищенном или гомогенном состоянии ГО из различных тканей C_4 – растений. Типичные результаты очистки фермента из исследуемых растений приведены в таблице 1.

Очистке изоформ ГО предшествовало разделение клеток мезофилла и обкладки из C_4 – растений, при этом перекрестное загрязнение тканей было небольшим /1/. Значения удельной активности очищенных препаратов изоформ ГО колебались незначительно. Величина этой характеристики для изоформы из обкладки составляла от 1,33 до 2,06 (исключение обнаружено для клеток обкладки кукурузы, в которых удельная активность составляла 7,6 Е/мг.б.). Несколько меньшие значения этого показателя обнаружены для мезофильной ГО (от 0,44 до 0,84 Е/мг.б.). Выход очищенного фермента колебался от 2,2% до 11%, в

Таблица 1.

Результаты очистки фермента из исследуемых растений (n = 6)

Вид растения		Удельная активность, Е/мг.б.	Выход, %	Степень очистки
Amarantus retroflexus L.	клетки обкладки	1,33	6,30	49,25
	мезофилл	0,55	9,20	100,00
Zea mays L.	клетки обкладки	7,60	2,20	86,35
	мезофилл	0,73	7,30	130,40
Sorghum sudanense (Piper) Stapf	клетки обкладки	2,06	3,60	40,39
	мезофилл	0,84	6,00	48,00
Nicotiana rustica. L	клетки обкладки	1,76	6,87	40,11
	мезофилл	0,44	11,25	47,31

Физико-химические и кинетические свойства гликолатоксидазы различных растений (n = 6)

Вид растения		pH	Rf	Молекулярная масса фермента, кДа	Субъединичное строение	
					количество субъединиц	субъединицы, кДа
Amarantus retroflexus L.	клетки обкладки	7,3	0,31	160	4 (тетрамер)	37 и 44
	мезофилл	7,5	0,28	158	4 (тетрамер)	37 и 44
Zea mays L.	клетки обкладки	7,3	0,30	308	8 (октамер)	37 и 44
	мезофилл	7,5	0,29	310	8 (октамер)	37 и 44
Sorghum sudanense (Piper) Stapf	клетки обкладки	7,3	0,32	156	4 (тетрамер)	37 и 44
	мезофилл	7,5	0,27	160	4 (тетрамер)	37 и 44
Nicotiana rustica. L	клетки обкладки	7,3	0,31	170	4 (тетрамер)	37 и 44
	мезофилл	7,5	0,28	164	4 (тетрамер)	37 и 44

зависимости от вида и тканей организмов. Большинство полученных препаратов ГО являлись электрофоретически гомогенными, за исключением фермента из (*Nicotiana rustica. L*). Все Исследуемые изоформы ГО имели близкие значения относительной электрофоретической подвижности (Rf).

Результаты исследований молекулярной массы гелем-хроматографией и субъединичного строения с помощью электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия приведены в таблице 2.

Значения молекулярной массы нативной ГО колеблются в значительных пределах в зависимости от исследуемого вида. Максимальная величина этой характеристики получена для фермента из листьев кукурузы. Так молекулярная масса ГО из клеток обкладки этого растения составляет 308 кДа, а из мезофилла 310 кДа. Величина Mr ГО из других объектов была примерно в 2 раза меньше [6,7]. Сравнительный анализ субъединичного строения исследуемого фермента указывает на отличия в четвертичной структуре ГО, выделенной из кукурузы. ГО из клеток обкладки и мезофилла листьев кукурузы представляет собой октамер, состоящий из двух типов субъединиц, при этом изоформы ГО из других исследуемых C₄ – растений, представляют собой тетрамер, состоящий также из малых и больших субъединиц. Общим для всех тканей и видов растений являются значения Mr малой субъединицы изучаемого фермента, которые составляют 37 кДа и большой 44 кДа.

Таким образом, установлено, что в тканях C₄-растений, существуют две специфично локализованные изоформы ГО, имеющие сложную четвертичную структуру и выполняющие различные физио-

лого-биохимические функции. ГО, находящаяся в клетках обкладки, функционирует в обеспечении фотодыхания, а мезофильная изоформа участвует в работе гликолатного метаболического пути, характерного для данной ткани.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Эдвардс Дж., Уокер Д. Фотосинтез C₃- и C₄-растений: механизмы и регуляция. М.: Мир, 1986.
2. Гамалей Ю.В., Воскресенская Е.В. Структурно-биохимические типы C₄-растений // Физиология растений. - 1986- Т.33, № 4.- С. 802-819.
3. Ленинджер А. Основы биохимии / Под ред. Энгельгардта, – М.: Мир, 1985. Т.2. 368 с.
4. Игамбердиев А.У., Землянухин А.А., Родионова Л.Г. Очистка гликолатоксидазы из листьев пшеницы и сахарной свеклы: каталитические свойства и роль в биосинтезе оксалата. // Биохимия. – 1988. – Т. 53, вып. 10. – С. 1738 – 1744.
5. Игамбердиев А. У. Роль фотодыхательных пероксисом в интеграции метаболизма фотосинтезирующей растительной клетки // Физиология растений. – 1992. – Т. 39, вып. 4. – С. 836 – 843.
6. Ивентьев А.Н., Попов В.Н. Выделение и характеристика гликолатоксидазы из клеток обкладки и мезофилла листьев кукурузы. // Организация и регуляция физиолого – биохимических процессов. – 2002. – вып. 4. С. 59 – 62.
7. Ивентьев А.Н., Пузырев А.Н., Марченко Г.А. Попов В.Н., Еприцев А. Т. Применение ионообменной хроматографии как основного этапа в процессе очистки гликолатоксидазы из листьев амаранта (*Amarantus retroflexus L.*) // Сорбционные и хроматографические процессы. – Воронеж, 2004. – Т.4. Вып.3. – С. 362 – 365.