

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС (*RATTUS RATTUS L.*)

Али С. Махмуд, А. Т. Епринцев

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 03.09.2012 г.

Аннотация. Применение ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой позволило получить электрофоретически гомогенные препараты сукцинатдегидрогеназы (СДГ, КФ 1.3.99.1) из печени крыс с удельной активностью 6,27 Е/мг белка, выходом 18 %, степенью очистки 89,5 раза. Получение в электрофоретически гомогенном состоянии препарата сукцинатдегидрогеназы позволило провести исследования физико-химических и каталитических характеристик данного фермента. Методом денатурирующего электрофореза определена молекулярная масса субъединицы фермента, сравнительный анализ величин молекулярной массы нативной молекулы и субъединицы позволил установить олигомерное строение белковой молекулы сукцинатдегидрогеназы.

Ключевые слова: сукцинатдегидрогеназа, ионообменная хроматография, гель-хроматография, константа Михаэлиса, молекулярная масса

Abstract: Application of the method of ion-exchange chromatography on a column of DEAE-cellulose yielded electrophoretically homogeneous succinate dehydrogenase (SDH, 1.3.99.1) from rat liver with a specific activity of 6,27 units/mg protein, degree of purification 89,5. Obtaining the homogeneous preparation of succinate dehydrogenase allowed conducting research of physicochemical and catalytic properties of the enzyme. Subunit molecular weight determined by denaturing electrophoresis method. Comparative analysis of the molecular weight of the native molecule and separate subunit allowed us to establish the oligomeric structure of the protein molecule of succinate dehydrogenase.

Keywords: succinate dehydrogenase, ion-exchange chromatography, gel chromatography, the Michaelis constant, molecular weight

ВВЕДЕНИЕ

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ и КФ 1.3.99.1) представляет собой ферментативный комплекс, являющийся одновременно компонентом дыхательной цепи митохондрий и цикла трикарбоновых кислот, катализирующий трансэлиминирование двух атомов водорода от янтарной кислоты с образованием фумаровой кислоты. Коферментом СДГ является ковалентно связанный ФАД. Активность фермента обнаруживается практически во всех исследованных организмах. Даже некоторые анаэробные прокариоты содержат множественные гены, кодирующие комплекс II. **Впервые очищенный препарат растворимой СДГ из животных тканей был получен Сингером [1].** Кроме того, фермент очищали из листьев табака, свеклы, из корней батата, семян сои, щитка кукурузы и других растений. Для исследования субъединичного строения СДГ необходимо получить гомогенный препарат данного фермента. Известно, что большая субъединица, обращенная в матрикс митохондрий, содержит ковалентно связанный ФАД,

молекула которого присоединена к 44 гистидину. Составная часть сукцинатдегидрогеназы, закрепляющая каталитический димер в мембране митохондрий, состоит из двух гидрофобных субъединиц. Каждая субъединица имеет свою аминокислотную последовательность в матриксе и 3 трансмембранных сегмента. Наличие мембранного домена, закрепляющего каталитический димер внутренней мембраны восстанавливает убихинон-редуктазную активность, и фермент приобретает чувствительность к хинон-аналоговому ингибитору. Очень важным моментом в исследовании сукцинатдегидрогеназы является выяснение механизмов регуляции активности СДГ не только на уровне белковой молекулы (воздействие на скорость ее функционирования различных метаболитов), но и регуляция фермента путем действия на генетический аппарат. Сукцинатдегидрогеназа является ферментом, субъединицы которого кодируются в геноме несколькими генами. Исследование субъединичного строения фермента, кинетики катализируемой реакции, физико-химических свойств невозможно без получения ферментных препаратов, характеризующихся гомогенностью.

В связи с этим целью работы явилось получение электрофоретически гомогенных препаратов СДГ из печени крыс с помощью ионообменной хроматографии и изучение их свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования использовали самцов беспородных лабораторных крыс (*Rattus rattus L.*) массой 200—300 г., которые выращивались при обычных условиях питания. Выделение фермента производили гомогенизацией 2 г печени в 10 мл среды выделения (1:5), содержащей 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 0,25 М сахарозу; 2 мМ цитрат Na, 1 мМ MgCl₂, 4 мМ дитиотрейтол (ДТТ) и 1 мМ ЭДТА с последующей фильтрацией через 4-х слойную марлю. Осаждение неразрушенных тканей осуществляли центрифугированием при 7000g в течение 15 мин. Осадок, содержащий в основном клеточные стенки, отбрасывали.

Активность фермента измеряли на СФ-2000 (ЗАО ОКБ “Спектр”, Россия) спектрофотометрическим методом, основанным на использовании искусственных акцепторов электронов с соответствующим редокс-потенциалом [2]. Содержание белка в пробе определяли по методу Лоури [3]. Для получения гомогенных препаратов СДГ была использована пятистадийная схема очистки. Все операции проводили при температуре 0—4 °С. 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 ли-

нейным градиентом концентрации KCl от 20 до 150 мМ. Для выявления четвертичной структуры и молекулярной массы нативной СДГ использовали гель-хроматографию на колонке (2×40 см) с сефадексом G-200 (“Pharmacia”, Швеция) [12]. Свободный объем колонки определяли с помощью голубого декстрана (“Serva”, ФРГ).

Na-ДДС-ПААГ (додецилсульфат натрия — полиакриламидный гель) электрофорез осуществляли при концентрации полиакриламидного геля 12,5 % по методике Лэммли [4].

Электрофоретические исследования белков проводили в 7,5 %-ном полиакриламидном геле модифицированным методом Дэвиса [5].

Опыты проводили в трехкратной биологической и аналитической повторностях. В таблицах и на рисунках приводятся данные типичных опытов, причем каждое значение есть среднее арифметическое из трех определений. Для определения достоверности результатов исследований применяли метод вариационной статистики. Полученные данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов с помощью критерия Стьюдента [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что получение гомогенного ферментного препарата открывает возможности для тщательного исследования физико-химических характеристик сукцинатдегидрогеназы. С целью получения чистого ферментативного препарата была проведена 5-стадийная очистка СДГ из печени крыс. Результаты типичной очистки представлены в табл. 1. На первой стадии очистки было получение гомогената с использованием среды, содержа-

Таблица 1

Очистка сукцинатдегидрогеназы из печени крыс ($n = 3, p < 0,05$)

Стадия очистки	Объем, мл	Общая активность, Е	Общий белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	10	3,75	52,8	0,07	100	1
Митохондрии	3	1,05	3,15	0,33	28	4,7
Фракционирование сульфатом аммония	2	0,99	1,23	0,8	26	11,4
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	2	0,86	1,15	0,75	23	10,7
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	2	0,69	0,11	6,27	18	89,5

щей сахарозу. После чего проводили фракционирование сульфатом аммония в пределах 20—60 % насыщения. Гель-фильтрация использовалась на следующей стадии для удаления низкомолекулярных соединений. Общая активность СДГ составила 0,86 Е, тогда как удельная активность равнялась 0,75. Степень очистки после данной стадии соответствовала 10,7 раза с выходом 23 %. Решающую роль в получении гомогенного препарата исследуемого фермента играла ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. Элюцию фермента с колонки осуществляли линейным градиентом хлорида калия от 60 до 190 мМ с концентрацией сукцината в среде 15 мМ. После применения ионообменной хроматографии фермент был очищен в 89,5 раза. Удельная активность ферментативного препарата составила 18 Е/мг белка. Гомогенность очищенного препарата сукцинатдегидрогеназы выявили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с последующей окраской нитратом серебра [7]. Было показано, что после ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе получен электрофоретически гомогенный фермент, на что указывает наличие одной полосы на геле с $Rf = 0,41$.

Определенная гель-хроматографией на сефадексе G-150 молекулярная масса нативной сукцинатдегидрогеназы из печени крыс составила $184 \pm 2,4$ кДа.

Электрофоретическое исследование в присутствии додецилсульфата натрия позволило опреде-

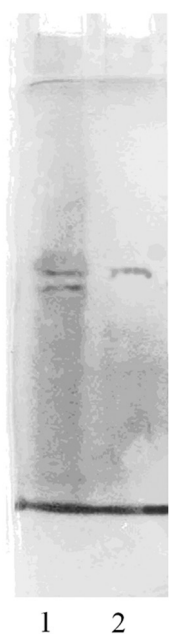


Рис. 1. Электрофореграмма СДГ, очищенной из печени крыс: 1 — специфическое проявление, 2 — универсальное окрашивание с помощью азотнокислого серебра

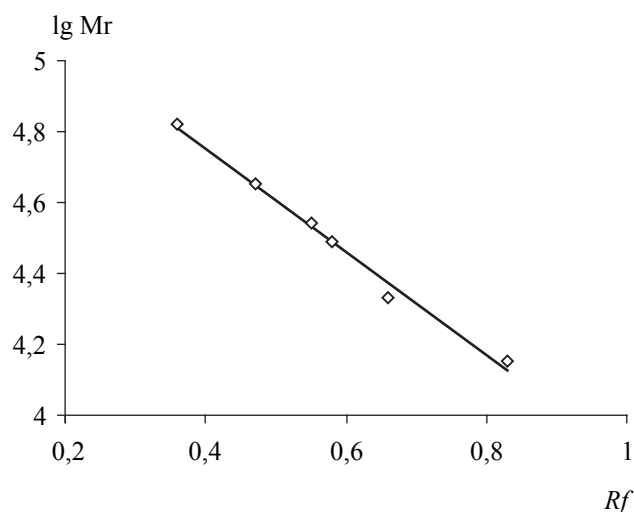


Рис. 2. Определение молекулярной массы субъединицы СДГ методом Ds-Na-электрофореза: 1 — БСА, 2 — овалбумин, 3 — карбоангидраза, 4 — ингибитор трипсина, 5 — лизоцим, 6 — исследуемая СДГ

лить молекулярную массу субъединиц СДГ из изучаемого объекта, которая составила 41 кДа (рис. 2).

Сравнение результатов гель-хроматографии и Ds-Na-электрофореза показывает, что СДГ из печени крыс представлена олигомером, то есть ферментом, состоящим из четырех субъединиц.

Полученные результаты по молекулярной массе и субъединичному строению совпадают с данными других авторов, которые описывают сукцинатдегидрогеназу как олигомерную белковую молекулу, которые различаются по структуре и функциям [8].

Таким образом, проведенные исследования позволили получить в электрофоретически гомогенном состоянии сукцинатдегидрогеназу из печени крыс и исследовать ее физико-химические характеристики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Епринцев А. Т. Сукцинатдегидрогеназа высших растений / А. Т. Епринцев, В. Н. Попов, Д. Н. Федорин // Воронеж: Центр. черн. книжное изд-во. — 2010. — 184 с.
2. Епринцев А. Т. Глиоксилатный цикл: универсальный механизм адаптации? / А. Т. Епринцев, В. Н. Попов, М. Ю. Шевченко // М.: ИКЦ "Академкнига". — 2007. — 228 с.
3. Lowry T. Protein measurement with the folin phenol reagent / T. Lowry // J. Biol. Chem. — 1951. — 193, P. 265—275.
4. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул / Л. А. Остерман // М.: Мир. — 1983. — 297 с.
5. Роль метилирования промоторов в регуляции генов сукцинатдегидрогеназы в проростках кукурузы /

Физико-химические и каталитические свойства сукцинатдегидрогеназы из печени крыс (Rattus rattus L.)

А. Т. Епринцев [и др.] // Физиология растений. — 2012. — Т. 59, № 3. — С. 332—340.

6. *Лакин Г. Ф.* Биометрия / Г.Ф. Лакин // Москва. Изд-во Высшая школа. — 1990. — 352с.

7. Получение гомогенных препаратов изоформ сукцинатдегидрогеназы из бактерий *Sphaerotilus natans*

штамм Д-507 / А.Т. Епринцев [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. — 2012. — Том 48, № 6. — С. 600—605.

8. Succinate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* is regulated by light via phytochrome A. / V.N. Popov [et al.] // FEBS Lett. — 2010. — 584 (1). — P.199—202.

Махмуд Али С. — аспирант кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет; тел.: (473) 220-8877 e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Makhmud Ali S. — Graduate student, Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University; tel.: (473) 220-8877, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Епринцев Александр Трофимович — профессор, доктор биологических наук, зав. кафедрой биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет; тел.: (473) 225-0563

Eprintsev Alexander T. — Doctor of biology, Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University; tel.: (473) 225-0563, e-mail: bc366@bio.vsu.ru