

УДК 577.152.1:579.08

ПОЛУЧЕНИЕ ГОМОГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗОФОРМ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ БАКТЕРИЙ *Sphaerotilus natans* ШТАММ Д-507

© 2012 г. А. Т. Епринцев, Т. Л. Ву, Н. В. Селиванова, А. Хасан Хамад

Воронежский государственный университет, Воронеж, 394006,

e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 26.01.2012 г.

Из бесцветных серных бактерий *Sphaerotilus natans* Д-507, культивируемых органотрофно, получены ферментные препараты двух изоформ СДГ с удельной активностью 22.00 Е/мг белка и 14.75 Е/мг белка. Выявлено, что обе формы сукцинатдегидрогеназы являются гетеротетрамерами с молекулярной массой субъединиц 70.8; 35.0; 31.8 и 16.2 кДа. Значения K_m для первой и второй изоформ составили 0.615 и 0.531 мМ соответственно, а оптимальное значение рН 7.2. Установлено, что активирующий эффект на активность СДГ проявляет ион Cl^- , что может быть объяснено специфической химической модификацией белковой молекулы фермента. Полученные результаты позволяют предположить, что выделенные формы фермента входят в состав разных мультиферментных комплексов, обеспечивающих функционирование цикла трикарбоновых кислот и глюконеогенеза. Препараты СДГ могут использоваться для регенерации нуклеотидных коферментов при исследовании других ферментных систем или при моделировании *in vitro* надмолекулярных структур клетки.

Изучение механизмов регуляции метаболических процессов, осуществляемых в живых организмах, является важнейшим направлением биохимических исследований. Среди множества проблем данной области науки важное место занимает изучение ферментных систем, их физиолого-биохимической роли и механизмов действия [1].

Знание структуры и характеристики ферментных комплексов, механизмов регуляции их активности имеет как фундаментальное, так и практическое значение.

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ, КФ 1.3.99.1) представляет собой мультифункциональный фермент и по этой причине имеет практически универсальное распространение среди живых организмов. Данный фермент занимает ключевое положение в регуляции аэробного дыхания. Кроме того, СДГ является мембраносвязанным ферментом, что обуславливает его полифункциональность — участие в функционировании ЦТК и работе электрон-транспортной цепи (комплекс II) [2]. Для СДГ выявлено множество модулирующих ее активность веществ. Активирующими агентами считаются изоцитрат, β -оксимасляная кислота, α -глицерофосфат, ионы K^+ , Ca^{2+} , SO_4^{2-} , Vg^- и Cl^- . Ингибиторами СДГ являются щавелевоуксусная кислота, оксалаты, 2-оксоглутарат, дикарбоновые кислоты, пирофосфаты, хиноны, бикарбонат-ионы [3].

Ферменты из бактерий представляют особый интерес, несмотря на то, что СДГ из разных объ-

ектов хорошо изучена. Условия обитания прокариот более разнообразны, чем эукариот, что обусловлено значительной гибкостью их метаболизма, выражающейся в способности использовать большое число различных соединений, а также переходить с одного типа питания на другой [4].

Бактерии рода *Sphaerotilus* — это образующие маты бесцветные нитчатые граммотрицательные прокариоты, способные к органотрофному и миксотрофному росту. Типичные местообитания *S. natans* — это медленно текущие пресные воды, сильно загрязненные стоками сельскохозяйственного производства [5]. Предпочтительный рост данных организмов при пониженном содержании кислорода в среде и способность к утилизации большого количества органических источников углерода объясняют их массовое развитие в соответствующих антропогенных экосистемах [6].

Определенный интерес представляет исследование структурной организации сукцинатдегидрогеназной ферментной системы из *S. natans* в различных условиях культивирования. В настоящее время показано, что при органотрофном росте у данных бактерий функционирует полный ЦТК, тогда как при миксотрофном культивировании — глиоксилатный цикл. При переходе от одного типа питания к другому в метаболизме бактериальных клеток происходит изменение соотношения роли цикла трикарбоновых кислот и глиоксилатного цикла [7].

СДГ находит широкое применение в исследовательской практике, являясь удобным объектом

для изучения структуры активных центров оксидоредуктаз, регуляции ферментативной активности и решения других актуальных проблем энзимологии и молекулярной биологии [8, 9]. Гомогенные препараты изоформ СДГ могут быть применены для регенерации нуклеотидных коферментов при исследовании других ферментных систем или при моделировании *in vitro* надмолекулярных структур клетки. Кроме того, СДГ может быть использована в иммуноферментном анализе некоторых антигенов в качестве фермента-маркера; фермент находит применение при диагностике болезней [9, 10]. Поэтому остается актуальным поиск источника получения СДГ. В нашей работе для получения гомогенного препарата СДГ использовали серобактерии *S. natans* штамм Д-507.

Цель работы – получение гомогенных препаратов изоформ СДГ из бесцветных серобактерий *S. natans* и изучение их свойств.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служили образующие маты бактерии рода *S. 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 [7]. Перед посевом в среды вносили раствор микроэлементов и витаминов – 1 мл/л. Суспензию клеток получали путем центрифугирования культуры при 8000 г и 4°C в течение 10 мин. Клетки отмывали 0.1 М калий-фосфатным буфером (рН 7.5).

Активность фермента измеряли на СФ-2000 (“ЛОМО”, Россия) спектрофотометрическим методом, основанным на использовании искусственных акцепторов электронов с соответствующим редокс-потенциалом [11]. Содержание белка в пробе определяли по методу Лоури.

Для получения гомогенных препаратов СДГ была использована пятистадийная схема очистки. Все операции проводили при температуре 0–4°C. Культуры клеток разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т (НПП “Укрросприбор”, Украина) при мощности 500 Вт и частоте 22 кГц в течение 2.5 мин в ледяной бане с последующим добавлением Тритона X-100 4.02% (0.002% к объему гомогената). Супернатант получали после центрифугирования клеточных экстрактов при 5000 г в течение 4 мин. Фракционирование белков супернатанта осуществляли сульфатом аммония (20–60% насыщения). Полученный раствор центрифугировали 30 мин при 12000 г.

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 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). Молекулярную массу изучаемого фермента рассчитывали из соотношения, полученного из калибровочного графика:

$$\lg M_r = 6.698 - 0.987(V_e/V_{cb}),$$

где M_r – молекулярная масса изучаемого фермента; V_e – объем элюции фермента, мл; V_{cb} – свободный объем колонки, мл.

Na-ДДС-ПААГ (додецилсульфат натрия – полиакриламидный гель) электрофорез осуществляли при концентрации полиакриламидного геля 12.5% по методике Лэммли [13]. Каждый образец содержал 3–5 мкг белка. Для построения калибровочной кривой использовали стандартные маркерные белки (“Sigma”, США) (кДа): целлюлаза – 94.6, бычий сывороточный альбумин – 66.2, овальбумин – 45, карбоангидраза – 31.0, ингибитор трипсина – 21.5, лизоцим – 14.4.

Электрофоретические исследования белков проводили в 7.5%-ном полиакриламидном геле модифицированным методом Дэвиса [14]. Универсальное окрашивание белков осуществляли по методике с нитратом серебра, 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 феназинметасульфата [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью электрофореза в 7.5%-ном 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 [9].

Для получения гомогенных препаратов изоформ СДГ из *S. natans* штамм Д-507 была использована 5-стадийная очистка, результаты которой представлены в таблице. После элюции белков с ДЭАЭ-целлюлозы линейным градиентом концентрации KCl (20–150 мМ) удельная активность

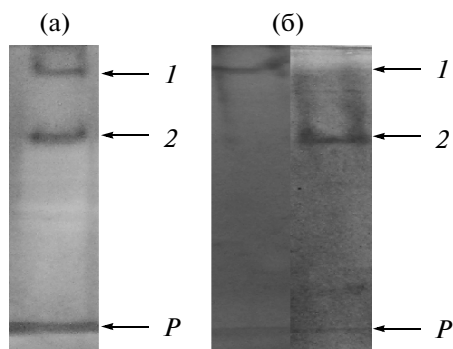


Рис. 1. Электрофореграммы препаратов СДГ из *S. natans* Д-507, а – специфическое проявление, б – окрашивание изоформ нитратом серебра, 1 – белковая полоса с $R_f=0.10$ (СДГ-1), 2 – белковая полоса с $R_f=0.34$ (СДГ-2), P – фронт красителя.

для одной изоформы фермента (СДГ-1) равнялась 22 Е/мг белка, при этом степень очистки составила 81.48 раз, выход – 15.5%. Для второй изоформы (СДГ-2) значение удельной активности было 14.75 Е/мг белка, а степень очистки и выход – 54.63 раз и 10.41% соответственно.

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 *S. natans* штамм Д-507 присутствуют две формы фермента, имеющие разную электрофоретическую подвижность: СДГ-1 с $R_f=0.10$ и СДГ-2 с $R_f=0.34$.

Молекулярные массы выделенных изоформ СДГ методом гель-фильтрации на сефадексе G-200 составили 201.1 и 199.2 кДа соответственно. Значение молекулярных масс субъединиц, определенные в ходе Na-ДДС-ПААГ-электрофореза, оказались равны 70.8, 35.0, 31.8 и 16.2 кДа соответственно (рис. 2). Следовательно, обе формы СДГ являются гетеротетрамерами. Известно, что сукцинатдегидрогеназа в различных организмах состоит из трех или четырех субъединиц с общей

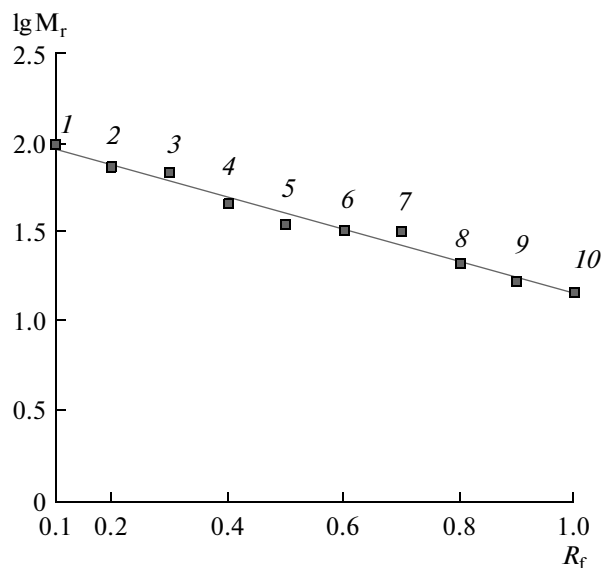


Рис. 2. Определение молекулярной массы субъединицы СДГ из *S. natans* Д-507 методом Na-ДДС-электрофореза: калибровочная кривая. 1 – целлюлаза, 2, 5, 6, 9 – СДГ, 3 – БСА, 4 – овальбумин, 7 – карбоангидраза, 8 – ингибитор трипсина, 10 – лизоцим.

молекулярной массой ферментного комплекса ~90–141 кДа [16]. По данным Бриана [17], молекулярные массы субъединиц составляют 65–79 кДа (СДГА), 25–37 кДа (СДГВ), 14–32 кДа (СДГС) и 12–17 кДа (СДГД).

Получение гомогенных препаратов СДГ позволило провести сравнение их кинетических характеристик. Определение K_m показало, что обе изоформы фермента подчиняются закону Михаэлиса–Ментен. Значение K_m для первой и второй изоформ составило 0.615 мМ и 0.531 мМ соответственно (рис. 3). Полученные результаты позволяют заключить, что выделенные и очищенные до гомогенного состояния формы обладают разным сродством к субстрату, а именно СДГ-1 обладает большим сродством к сукцинату, чем СДГ-2. Аналогичные исследования кинетических свойств на гомогенных препаратах сукцинатдегидрогена-

Очистка сукцинатдегидрогеназы из бактерий ($n=3, p<0.05$)

Стадия очистки	Объем, мл	Общая активность, Е	Общий белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки, раз
Гомогенат	4	5.67	21.36	0.27	100	1
Супернатант	3.4	2.45	14.60	0.17	43.21	0.63
Фракционирование сульфатом аммония	3.5	5.01	10.80	0.46	88.36	1.70
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	2	5.06	10.03	0.50	89.24	1.85
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	1	2	0.88	0.04	22	81.48
	2	2	0.59	0.04	14.75	10.41

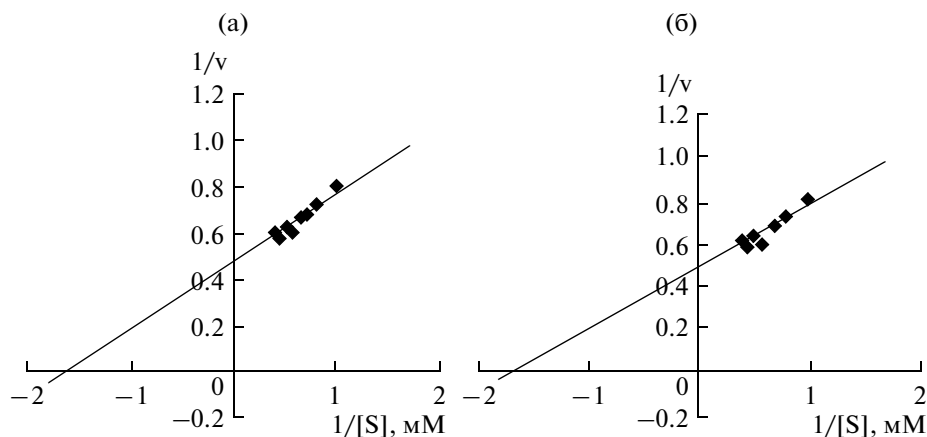


Рис. 3. Определение значений K_M по сукцинату для СДГ из *S. natans* Д-507: а – первая изоформа, б – вторая изоформа.

зы из различных организмов показали, что фермент также подчиняется кинетике Михаэлиса–Ментен, но значения K_M варьируют, так K_M СДГ из *Sulfolobus acidocaldarius* составляет 1.42 мМ [18], а из *Rhodothermus marinus* – 0.165 мМ [19].

Вторым важным фактором, влияющим на активность ферментов, является значение рН. Разные ферменты максимально активны при неодинаковых величинах рН; при рН выше и ниже оптимальных значений их активность снижается. Из данных, приведенных на рис. 4, видно, что значение оптимума рН изоформы СДГ-1 и СДГ-2 находится в пределах, близких к нейтральной среде – 7.2, т.е. совпадает с физиологической величиной рН живой клетки *S. natans* [20].

Полученные нами результаты коррелируют с данными литературы. Известно, что рН оптимум для СДГ из различных организмов находится в диапазоне 7.0–7.5 [9].

Фермент СДГ – крайне лабилен [2], поэтому одним из факторов, влияющих на стабильность данного фермента, является температура. В ходе экспериментов показано, что через 25 ч инкубирования при комнатной температуре исследуемый фермент был полностью инактивирован, при 4°C также наблюдалось значительное (83.8%) снижение активности СДГ. Хранение сукцинатдегидрогеназы при –20 и –70°C мало влияло на ее функционирование (потеря активности составила 10.7%).

Было изучено действие различных солей на активность сукцинатдегидрогеназы, что также может играть важную роль в регуляции активности данного фермента. Для СДГ активирующими агентами считаются изоцитрат, ионы K^+ , Ca^{2+} , SO_4^{2-} , Br^- , Cl^- . Степень активации анионами растворимой СДГ уменьшается в ряду Cl^- , SO_4^{2-} , Br^- , CH_3COO^- [9].

Так, из данных, представленных на рис. 5, следует, что активатором работы СДГ, выделенной из бактерии *S. natans*, является KCl . В присутствии этой соли в среде активность фермента возросла в 2 раза относительно контрольного уровня. Такие соли, как $NaCl$, NH_4Cl , K_2SO_4 , Na_2SO_4 , $Mg(CH_3COO)_2$ не вызвали значительного изменения в функционировании СДГ. Анализ действия различных солей на каталитическую активность СДГ позволяет говорить о том, что активирующее действие на фермент проявляет ион Cl^- , поскольку он входит в состав всех солей, присутствующих в среде где происходила интенсификация работы фермента. Увеличение активности сукцинатдегидрогеназы в присутствии ионов Cl^- можно объяснить специфической химической модификацией белковой молекулы фермента [21]. Катионы Zn^{2+} и Mn^{2+} инактивировали фермент.

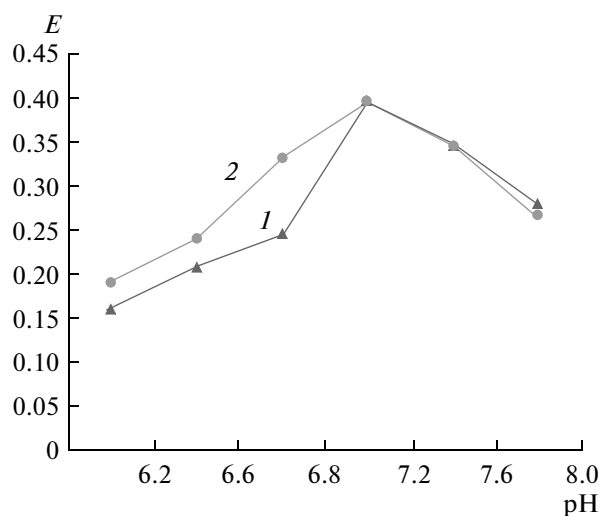


Рис. 4. Зависимость скорости реакции от рН среды для СДГ. 1 – СДГ-1, 2 – СДГ-2.

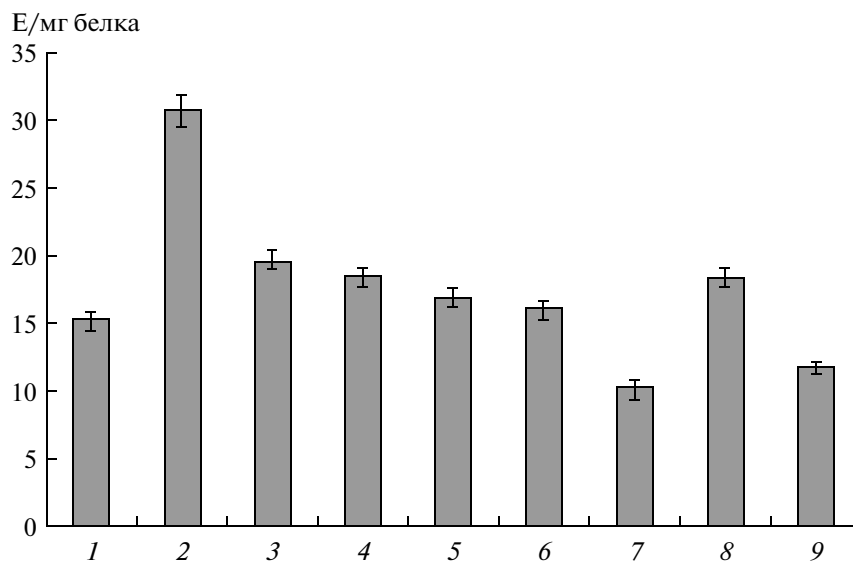


Рис. 5. Влияние солей на активность очищенной СДГ (Е). 1 – активность гомогенного препарата СДГ, 2 – KCl, 3 – NaCl, 4 – NH₄Cl, 5 – K₂SO₄, 6 – Na₂SO₄, 7 – Zn(CH₃COO)₂, 8 – Mg(CH₃COO)₂, 9 – Mn(CH₃COO)₂.

Таким образом, с помощью разработанной нами многостадийной очистки получены гомогенные препараты изоформ СДГ из бактерий *S. natans*. Можно предположить, что выделенные формы фермента входят в состав разных мультиферментных комплексов, обеспечивающих функционирование цикла трикарбоновых кислот и глюконеогенеза, в утилизации сукцината, образующегося как конечный продукт глиоксилатного цикла.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пине́йру де Корвалью М.А.А., Землянухин А.А., Епринцев А.Т. Малатдегидрогеназа высших растений. Воронеж: ВГУ, 1991. 216 с.
2. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Селиванова Н.В., Анвар Ахмад Дж., Попов В.Н. // Изв. РАН. Сер. биол. 2010. № 3. С. 268–276.
3. Землянухин А.А., Землянухин Л.А. Метаболизм органических кислот растений. Воронеж: изд-во Воронеж. ун-та, 1995. 152 с.
4. Епринцев А.Т., Фалалеева М.И., Грабович М.Ю., Парфенова Н.В., Каширская Н.Н., Дубинина Г.А. // Микробиология. 2004. Т. 73. № 4. С. 437–442.
5. Siering P.L., Ghiorse W.C. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1996. V. 46. № 1. P. 173–182.
6. Takeda M., Iohara K., Shinmaru S., Suzuki I., Koizumi J.-I. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 11. P. 4998–5004.
7. Епринцев А.Т., Фалалеева М.И., Арабцева М.А., Лавриченко И.А., Парфенова И.В., Гречкина М.В., Абуд Ф.С. // Изв. РАН. Сер. биол. 2011. № 4. С. 397–402.
8. Виноградов А.Д. // Биохимия. 1986. Т. 51. №12. С. 1944–1973.
9. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Федорин Д.Н. Сукциналдегидрогеназа высших растений // Воронеж: Центр. черн. книжное изд-во, 2010. 184 с.
10. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Шевченко М.Ю. Глиоксилатный цикл: универсальный механизм адаптации? М.: ИКЦ “Академкнига”, 2007. 228 с.
11. Попов В.Н., Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Леонова Ю.А. // J. Stress Physiol. Biochem. 2005. V. 1. № 1. P. 30–36.
12. Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул. М.: Мир, 1983. 297 с.
13. Laemmly U.K. // Nature. 1970. V. 77. № 4. P. 680–683.
14. Davis B.J. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1994. V. 121. P. 404–427.
15. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Селиванова Н.В., Ву Т.Л., Махмуд А.С., Попов В.Н. // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 3. С. 332–340.
16. Suraveratun N., Krungkrai S.R., Leangaramgul P., Prapunwattana P., Krungkrai J. // Mol. Biochem. Parasitol. 2000. V. 105. № 2. P. 215–22.
17. Brian A. Crowe, P. Owen // J. Bacteriol. 1983. V. 153. № 3. P. 1493.
18. Moll R., Schafer G. // Eur. J. Biochem. 1991. V. 201. № 3. P. 593–600.
19. Fernandes A.S., Konstantinov A.A., Teixeira M., Pereira M.M. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 330. № 2. P. 565–70.
20. Pellegrin I V., Juretschko S., Wagner M., Cottenceau G. // Appl. Microbiol. 1999. V. 65. № 1. P. 156–162.
21. Pas-Panja K., Jonnalagadda V.S., Jonnalagadda S. // Indian J. Biochem. Biophys. 1998. V. 35. № 5. P. 255–259.

Obtaining Homogenous Preparations of Succinate Dehydrogenase Isoforms from the D-507 Strain of *Sphaerotilus natans*

A. T. Eprintsev, T. L. Wu, N. V. Selivanova, and A. Khasan Khamad

Voronezh State University, Voronezh, 394006 Russia

e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Received January 26, 2012

Abstract—Enzymatic preparations of two isoforms of succinate dehydrogenase (SDG) with specific activity of 22.00 E/mg of protein were obtained from the colorless sulfur bacterium *Sphaerotilus natans* D-507 cultured organotrophically. Both SDG forms were shown to be heteromers with subunit molecular masses of 70.8, 35.0, 31.8, and 16.2 kDa. The K_m values for the first and the second forms of SDG were evaluated as 0.615 and 0.531 mM, respectively, with an optimal pH value of 7.2. It was found that the Cl^- ion has an activating effect on the SDG activity that can be explained by the specific chemical modification of the enzyme molecule. The results suggest that the isolated enzyme forms are included in different multienzyme complexes, which provide the functioning of the tricarboxylic acid cycle, and SDG preparations can be used for the investigation of other enzyme systems or in vitro modeling of supramolecular cellular structures.