

**ЧАСТИЧНАЯ ОЧИСТКА НАДФ-ЗАВИСИМОЙ  
ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПЛОДОВ ЯБЛОНИ**

**С.Н.ОМАРОВА, А.А.КУЛИЕВ**  
*Бакинский Государственный Университет*

*Произведена частичная очистка НАДФ-изоцитратдегидрогеназы (НАДФ-ИДГ) из субэпидермальной ткани яблок. При очистке были использованы методы высаливания сульфатом аммония и колоночной хроматографии на ДЕАЭ-целлюлозе. Выявлено 2 пика активности НАДФ-ИДГ, соответствующие, как предполагается, цитозольной и хлоропластной изоформам. Достигнута очистка ферментного препарата в 13 и 11 раз, соответственно, для каждой изоформы.*

**ВВЕДЕНИЕ**

НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа (изоцитрат:НАДФ<sup>+</sup>- оксидоредуктаза [декарбоксилирующая] – НАДФ-ИДГ, КФ 1.1.1.42) катализирует окислительное декарбоксилирование изолимонной кислоты в 2-оксоглутаровую кислоту. НАДФ-ИДГ изучена во многих прокариотических и эукариотических организмах. Произведена очистка фермента до гомогенного состояния из бактерий [1], цианобактерий [2], грибов [3] и млекопитающих [4]. Однако на данный момент имеется ограниченное число данных относительно очистки, структуры, свойств и механизмов регуляции НАДФ-ИДГ высших растений.

Активность НАДФ-ИДГ в растительных компартментах распределена неравномерно. Известно, что приблизительно 90% ее ферментативной активности сосредоточено в цитозоле, 10 % в хлоропластах, 1 % находится в пероксисомах, и в следовых количествах обнаружено в митохондриях [5, 6, 7, 8, 9, 10]. Эти наблюдения укрепляют идею о том, что цитозоль является главным местом образования 2-оксоглутарата. Из высших растений была очищена до гомогенности только цитозольная изоформа НАДФ-ИДГ. Сообщается, что цитозольные (ИДГ 1) и хлоропластные изоформы (ИДГ 2) НАДФ-ИДГ из листьев гороха при хроматографии на ДЕАЭ-целлюлозе проявляли различные профили элюции. Так, в отличие от цитозольного фермента, элюировавшего при ионной силе КСl, равной 60 мМ, хлоропластный фермент элюировал при – 120 мМ. В случае очистки НАДФ-ИДГ из табака обе его изоформы выявлялись при одинаковой ионной силе [11].

Функция НАДФ-ИДГ в клетках эукариотических организмов еще не полностью раскрыта, данные же прямо свидетельствующие о возможной функции цитозольного фермента в растениях, все еще отсутствуют. Возможно, фермент функционирует в качестве одного из основных поставщиков НАДФН для биосинтетических реакций, особенно в условиях ограниченного функционирования

пентозофосфатного пути, и способствует обеспечению клетки НАДН посредством трансгидрогеназной реакции [12, 13].

Установлено также, что фермент снабжает клетку углеродными скелетами, а именно 2-оксоглутаратом, необходимым для ассимиляции аммиака, что может иметь важное значение как в биосинтезе и экспорте аминокислот, так и в детоксификации аммиака [14]. Известно, что аналогичный фермент цикла Кребса – НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа (1.1.1.41), ответственен за снабжение 2-оксоглутаратом для биосинтеза аминокислот [15]. Однако, предполагается, что НАДФ-ИДГ является именно альтернативным путем поставки 2-оксоглутарата, особенно в условиях, когда требуются большие количества кетокислоты [16]. Эта гипотеза основывается на следующих открытиях: а) растительные органы проявляют очень низкую НАД-ИДГ активность; б) НАДФ-ИДГ имеет большее сродство к субстратам; в) цитозольная аконитаза представлена в растениях и может продуцировать изоцитрат вне митохондрий.

Таким образом, НАДФ-ИДГ, локализованная в цитозоле, играет немаловажную роль в обмене веществ в растительном организме. К сожалению, данные относительно очистки, внутриклеточного распределения, свойств и биохимической роли этого фермента в сочных плодах, в частности яблоках, отсутствуют вовсе. Учитывая это, мы задались целью произвести очистку ферментного препарата НАДФ-ИДГ из субэпидермальных тканей плодов яблони.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили плоды яблони (*Malus domestica* Borkh.) сорта Ренет Симиренко. До использования плоды хранили в холодной камере при +4°C. Приготовление ферментного препарата НАДФ-ИДГ осуществляли следующим образом. Из 5 плодов вырезали дольки, очищали с них кожуру и из паренхимной ткани толщиной 2 мм брали среднюю пробу. Нарезали на маленькие кусочки в фарфоровой ступке, предварительно погруженной в ледяную баню. Гомогенизацию проводили в среде, состоящей из: 30 мМ трис-НСl буфер (рН 9.0), 2 мМ ЭДТА, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 14 мМ 2-меркаптоэтанол, 5% поливинилпирролидон, 1% полиэтиленгликоль. Соотношение ткани к экстрагирующему раствору было 1:4. Полученную гомогенную суспензию пропускали через двойной слой капроновой ткани в химический стаканчик, предварительно погруженный в ледяную баню. Фильтрат центрифугировали в течение 15 мин при 17 000g. Полученную надосадочную жидкость использовали в качестве неочищенного ферментного препарата НАДФ-ИДГ.

Частично очищенный ферментный препарат получали путем высаливания сульфатом аммония различной степени насыщенности, а также путем аффинной хроматографии. Приготовление раствора аммония, сульфата различной степени насыщенности осуществляли согласно таблице 1. Осадок, полученный после высаливания сульфатом аммония растворяли в 1 объеме буфера А (10 мМ фосфат калия, рН 8,2, 5% глицерол, 14 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>) и диализировали 1 л буфера А в течение ночи при 4°C. Обессоленный препарат пропускали через ДЕАЭ-целлюлозную колонку (1,8 x 15 см) предварительно уравновешенную буфером А и промытую до избавления от белков. 500 мл-ый линейный градиент KCl с концентрацией от 0 до 0,4 М в буфере А использовался для

элюции активности НАДФ-ИДГ. Фракции, содержавшие 2 пика активности НАДФ-ИДГ, собирались отдельно и диализировали всю ночь буфером А.

Таблица 1

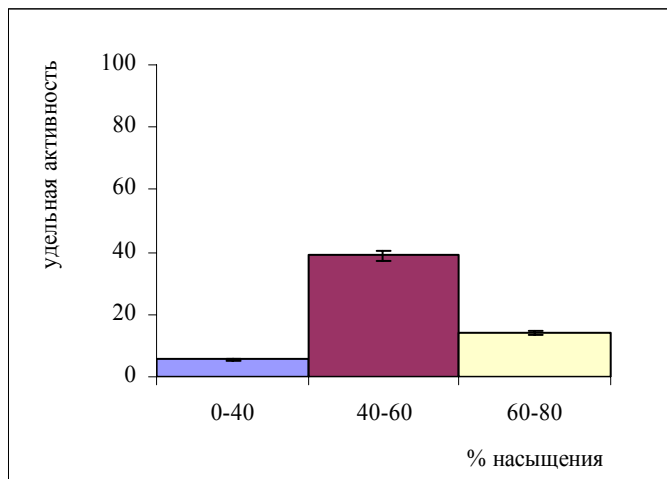
**Приготовление раствора аммония  
сульфата различной степени насыщенности**

	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75
0	114	144	176	209	243	277	313	351	390	430	472	516
20		29	59	91	123	155	189	225	262	300	340	382
25			30	61	93	125	158	193	230	267	307	348
30				30	62	94	127	162	198	235	273	314
35					31	63	94	129	164	200	238	278
40						31	63	97	132	168	205	245
45							32	65	99	134	171	210
50								33	66	101	137	176
55									33	67	103	141
60										34	69	105
65											34	70
70												35

Активность фермента определяли спектрофотометрически, по приросту поглощения при длине волны 340 нм, которая соответствует максимуму поглощения восстановленных форм НАДФ и НАД. Инкубационная смесь для определения активности состояла из 30 мМ трис-НСl буфера (рН 8.2), 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 12 мкМ изоцитрата, 10 мкМ НАДФ. Общий объем инкубационной среды – 3 мл, из которого 0.3 мл – ферментный препарат. Контрольная кювета не содержала субстрат. Реакция начиналась с внесения ферментного препарата, а измерение начиналось спустя 20 мин после начала реакции при +20<sup>0</sup>С. Активность фермента выражали в нмоль НАДФН·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup>белка. Белок определяли по методу Бредфорда [17] в супернатанте.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Несмотря на то, что НАДФ-ИДГ существует в высших растениях в виде различных изоэнзимов локализованных в цитозоле, хлоропластах и митохондриях, большая часть ферментативной активности в экстрактах растений сосредоточена в виде цитозольного изоэнзима (около 90%) [11; 18]. С целью выявления тех белковых фракций НАДФ-ИДГ, образующихся в результате высаливания, которые характеризовались наиболее высокой ферментативной активностью, определяли удельную активность НАДФ-ИДГ в осадочных фракциях 20, 40, 60, 80 %-ного насыщения сульфатом аммония после высаливания исходного супернатанта. Результаты проведенного высаливания представлены на рисунке 1.



**Рис. 1.** Удельная активность ( $\Delta E_{340}$  нМ/мин·мг белка) НАДФ-ИДГ из субэпидермальной ткани плодов яблони, выделенной в условиях высаливания сульфатом аммония.

Как видно, наиболее высокая удельная активность данного фермента проявляется во фракциях белков, полученных при 40–60 %-ного насыщения сульфатом аммония. При меньшем и большем насыщении активность была мизерной.

На последующей стадии очистки - хроматографии на ДЕАЭ-целлюлозной колонке было выявлено два пика активности, из которых второй проявлял около 9 % общей активности НАДФ-ИДГ. Для сравнения следует отметить, что при очистке НАДФ-ИДГ табака путем хроматографии второй пик активности составил почти 20 % [11]. Для выявления второго пика активности необходимо использовать концентрированный хлоропластный экстракт. Соответствующие общие активности каждого пика были использованы для вычисления относительного распределения каждой изоформы к общей активности как в неочищенном препарате, так и во фракциях, осажденных сульфатом аммония.

Как видно из таблицы 2, ферментный препарат, частично очищенный посредством хроматографического метода, имел общую активность равную 540 нМ/мин, а удельная активность была равна 78 нМ/мин·мг белка. Таким образом, в результате проведенных процедур была достигнута 13-кратная очистка неочищенного супернатанта фракции 17 000g. Следует отметить, что по мере очистки ферментного препарата наблюдалось уменьшение количества белка. Далее полученную суспензию диализировали против 100-кратного объема того же раствора (без  $MgCl_2$  и ПВП) в течение 24 ч. при  $+2^{\circ}C$ .

Таблица 2

**Частичная очистка препарата  
НАДФ-ИДГ из субэпидермальной ткани яблок**

Этапы	Общая активность, нМ/мин	Количество белка, мг	Удельная активность, нМ/мин·мг белка	Степень очистки, раз
<b>НАДФ-ИДГ 1</b>				
Неочищенный экстракт	770	128	6	1
Высаливание 40-60 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	565	15	38	7
ДЭАЭ-целлюлоза	540	7	78	13
<b>НАДФ-ИДГ 2</b>				
Неочищенный экстракт	69	77	0,9	1
Высаливание 40-60 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	72	9	8	9
ДЭАЭ-целлюлоза	70	7	10	11

В дальнейшем все кинетические эксперименты были осуществлены с частично очищенным ферментным препаратом.

Данные, полученные в результате проведенной очистки ферментного препарата НАДФ-ИДГ в вышеописанной последовательности, в целом согласуются с данными для этого же фермента, очищенного с применением данной методики из других растительных объектов. Так, НАДФ-ИДГ из клеток табака была очищена в 19 раз, из корней гороха – в 14 раза, а из проростков сосны – в 42,3 раза [8, 19, 11].

Таким образом, проведенные исследования позволили осуществить частичную очистку НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы яблок, что имеет немаловажное значение для дальнейшего исследования физико-химических свойств этого фермента.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Fukunaga N., Imagawa S., Sahara T., Ishii A., Suzuki M. // *J. Biochem.*, 1992, vol.112, p.849-855.
2. Muro-Pastor M., Florencio F. // *Eur. J. Biochem.*, 1992, v.203, p.99-105.
3. Yoon J.J., Hattori T. and Shimada M. // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2003, vol. 67., no. 1, p.114-120.
4. Huang Y.Ch., Colman R.F. // *J. Biol. Chem.*, 2005, vol.280, issue 34, p. 30349-30353.
5. Palma J.M., Jimenez A., Sandalio L.M., Corpas F.J., Lundqvist M., Gomez M., Sevilla F. and del Rio L.A. // *J. Exp. Bot.*, 2006, vol. 57, no. 8, pp. 1747–1758.
6. Canino S., Nieri B., Pistelli L., Alpi A., De Bellis L. // *Physiol. Plant.*, 1996, vol. 98, No 1, pp. 13–19.
7. Chen R. // *Planta*, 1998, vol. 207, pp. 280-285.
8. Palomo J., Gallardo F., Suarez M.F., and Canovas F.M. // *Plant Physiol.*, 1998, vol. 118, pp. 617–626.
9. Corpas F.J., Barroso J.B., Sandalio L.M., Palma J.M., Lupianez J.A., and del Rio L.A. // *Plant Physiol.*, 1999, vol. 121, pp. 921–928.
10. Popova T.N., Appenroth K.J. // *J. Plant Physiol.*, 2002, vol. 159, pp. 239-244.

11. Galvez S., Bismuth E., Sarda C., Gadal P. // *Plant Physiol.*, 1994, v.105, p.593-600.
12. Galvez S., Gadal P. // *Plant science*, 1995, vol. 105, no. 1, pp. 1-14.
13. Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Gumez-Rodríguez M.V., Chaki M., Pedrajas J.R., Fernández-Ocaso A., Del Río L.A., Barroso J.B. // *Plant, Cell & Environment*, 2006, vol. 29, no 7, pp. 1449–1459.
14. Hodges M. // *J. Exp. Bot.*, 2002, vol. 53, no. 370, pp. 905–916.
15. Chen R. // *Planta*, 1998, vol. 207, pp. 280-285.
16. Galvez S., Gadal P. // *Plant science*, 1995, vol. 105, no. 1, pp. 1-14.
17. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.*, 1976, vol.72, p. 248-254.
18. Gallardo F., Galvez S., Gadal P., Canovas F. // *Planta*, 1995, vol.196, p.148-154.
19. Chen R., Le Marechal P., Vidal J., Jacquot J-P., Gadal P. // *J.Biochem.*, 1988, vol.175, p.565-572.

**ALMA MEYVƏLƏRİNDƏN NADF-ASILI  
İZOSİTRATDEHİDROGENAZASININ QİSMƏN TƏMİZLƏNMƏSİ**

**S.N.ÖMƏROVA, A.A.QULİYEV**

**XÜLASƏ**

Alma meyvələrinin subepidermal toxumasından NADF-asılı izositratdehidrogenazanın (NADF-İDG) qismən təmizlənməsi həyata keçirilmişdir. Təmizlənmə zamanı ammonium sulfatla və DEAE-sellüloza ilə sütün xromatoqrafiyası üsullarından istifadə edilmişdir. Fərz olunduğu kimi, müvafiq olaraq sitozol və xloroplast izoformalara məxsus olan 2 NADF-İDG fəallıq piki aşkar edilmişdir. Ferment preparatının hər izoformasının müvafiq olaraq 13 və 11 dəfə təmizlənməsinə nail olunub.

**PARTIAL PURIFICATION OF NADP-ISOCITRATE  
DEHYDROGENASE OF APPLE FRUITS**

**S.N.OMAROVA, A.A.GULİYEV**

**SUMMARY**

NADP-isocitrate dehydrogenase (NADP-IDH) from subepidermal tissue of apple fruits has been partial purified. With purpose of purification were used ammonium sulfate fractionation and chromatography on DEAE-cellulose methods. Two clearly separated peaks of NADP-IDH activity corresponds to cytosolic and chloroplast isoenzymes have been revealed. The enzyme was purified 13 and 11-fold corresponds to each isoenzymes.