

ОЧИСТКА ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ЛИСТЬЕВ КУКУРУЗЫ И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

ПОДГОТОВИЛ СТУДЕНТ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО
ФАКУЛЬТЕТА КАФЕДРЫ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ КЛЕТКИ 3
КУРСА ДЕДОВ Я.И.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глутаматдегидрогеназа, как правило, катализирует обратимую реакцию восстановительного аминирования 2-оксоглутарата (2-ОГ) до глутамата с использованием НАД(Ф) в качестве кофермента, или окислительное дезаминирование глутамата (рис. 1)

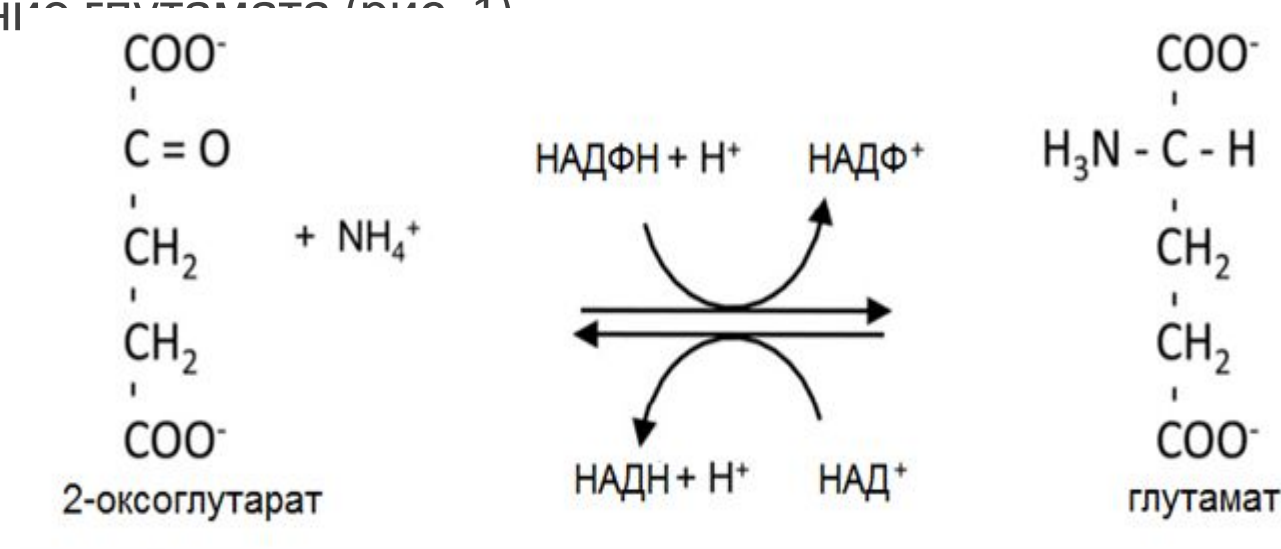


Рис.1 Реакция, катализируемая глутаматдегидрогеназой

Коферментная специфичность

Согласно коферментной специфичности, существуют три основных типа ГДГ:

НАД-зависимая (КФ 1.4.1.2)

НАДФ-зависимая (КФ 1.4.1.4)

Двойная кофермент-специфическая ГДГ, которая может использовать два кофермента сразу (КФ 1.4.1.3)

Локализация в растениях

Изоферменты ГДГ в растениях могут встречаться в корнях (GDH-2), в семядолях (GDH-1), а также в побегах (оба изофермента). Сходные тканеспецифические изоферментные структуры ГДГ были найдены в *Pisum Sativum* (зеленый горошек), *Ricinus communis* (клещевина), и *Lupin Albus* (белый люпин).

Некоторые физико-химические характеристики

Ph-оптимум фермента различается у различных организмов, а также в зависимости от катализируемой реакции.

Так у *Peptococcus aerogenes* он составляет 8.8-8.9. Температурный оптимум составляет 50-55°C. После очистки ГДГ из бактерии *Bacteroides fragilis* наибольшая активность была отмечена при Ph 8.0 [2 ФАЙЛ].

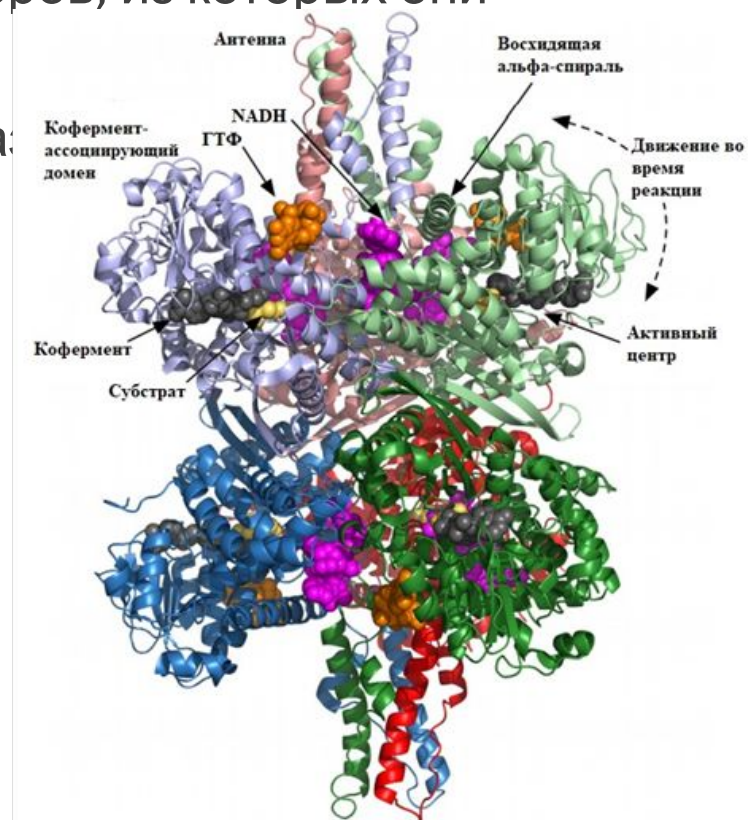
Глутаматдегидрогеназа может ингибироваться у различных организмов различными веществами, такими как АТФ, ЦМФ, H_2O_2 , а также некоторыми ионами металлов.

Растительные ГДГ активируются ионами Ca^{2+} , а также другими двухвалентными ионами металлов.

Структура фермента

Большинство глутаматдегидрогеназ, которые были обнаружены до сих пор – олигомерные ферменты, но они различаются по числу мономеров, из которых они состоят.

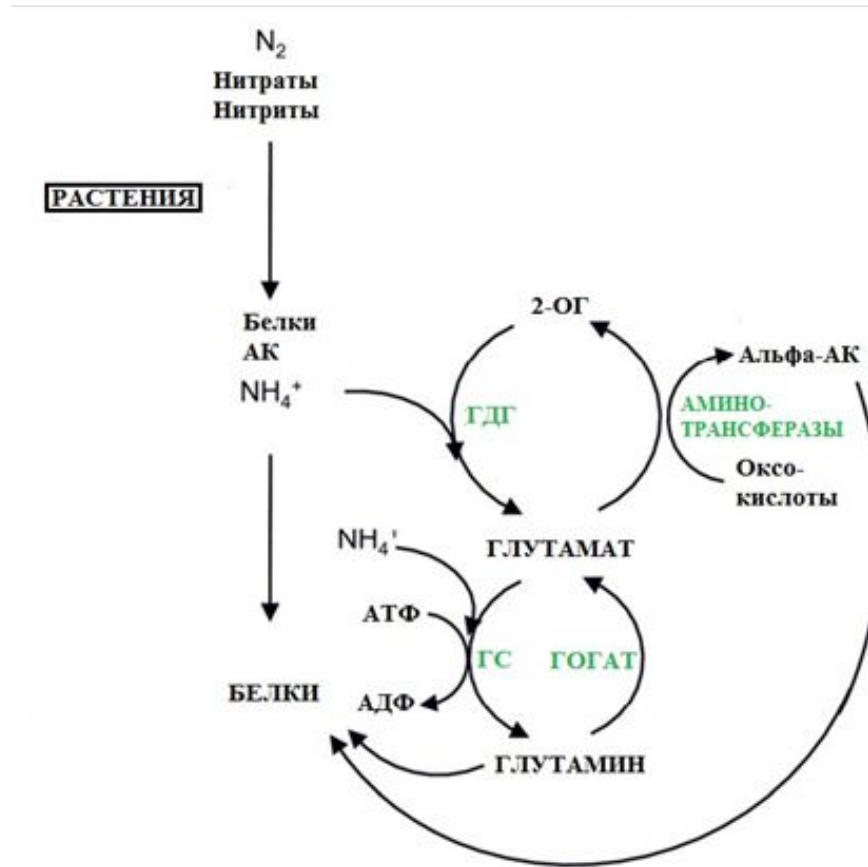
Далее представлена структура животной глутаматдегидрогеназы:



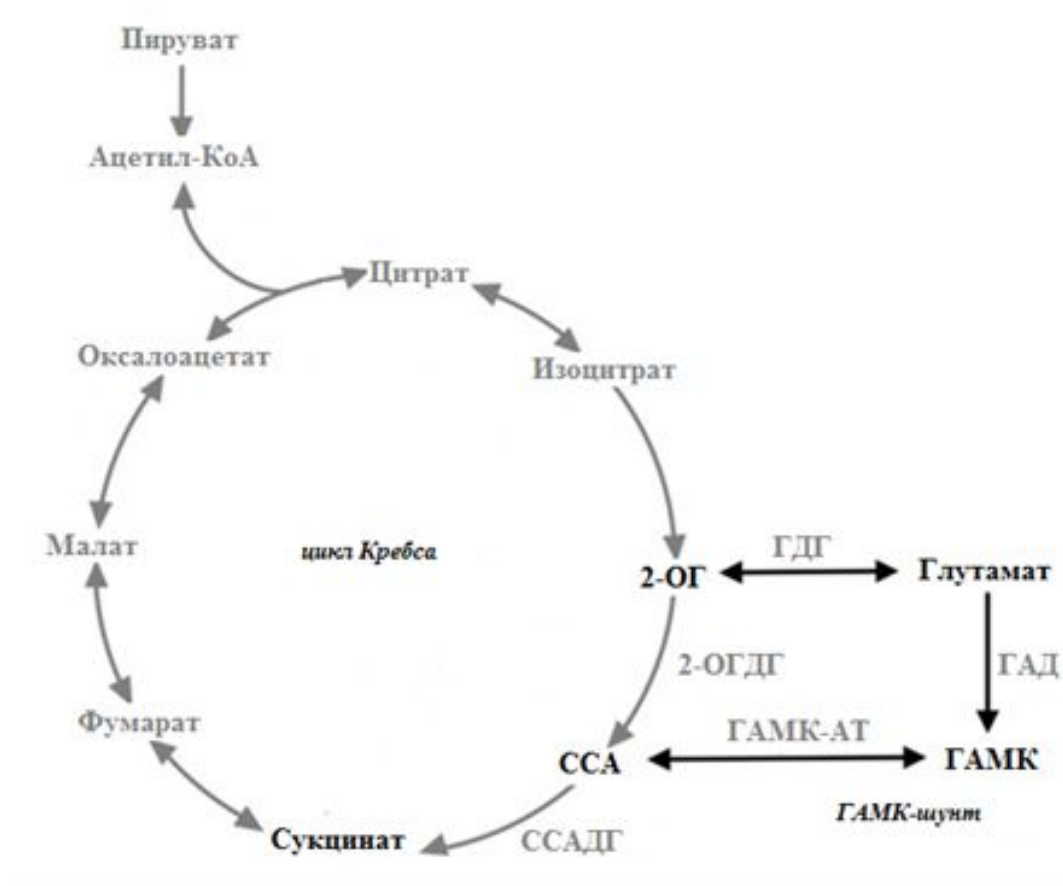
Роль в обмене азота

Неорганический азот усваивается в виде аммония, который включен в качестве аминогруппы в глутамат или амидогруппы в глутамине. Эти аминокислоты, в свою очередь, выступают в качестве доноров аминогрупп для синтеза большинства азотсодержащих соединений в клетке. В частности, аминогруппа глутамата используется в синтезе пуринов, пиримидинов, аминсахаров, гистидина, триптофана, аспарагина, НАД⁺. Поэтому глутамат является ключевым элементом потока азота, поскольку он играет роль донора и акцептора азота.

Схема ассимиляции молекулярного азота



ГАМК-шунт



Гены ГДГ

Известно, что активный белок глутаматдегидрогеназы чаще всего представляет собой гексамер, состоящий из шести субъединиц трёх типов: α , β , γ , которые кодируются генами *gdh1*, *gdh2*, *gdh3*, соответственно.

Анализ генетической базы данных GeneBank показал, что, помимо гена *gdh1*, в геноме кукурузы присутствует еще один ген *gdh2* (*loc100193614* – локализованный в 10 хромосоме). Кроме того, имеются сведения о гене, кодирующем дегидрогеназу аминокислот (или Глутамат/Лейцин/Фенилаланин/Валин-дегидрогеназу), расположенном в *loc100502380* третьей хромосомы.

В геноме арабидопсиаса также обнаружено 3 гена: *gdh1* и *gdh2*, локализованные в 5 хромосоме и *gdh3*, находящийся в 3 хромосоме. Ген *gdh1* кодирует α -субъединицу (43 кДа) глутаматдегидрогеназы с предположительно митохондриально-транзитным полипептидом и НАД(Н)- и α -кетоглутарат-связывающими доменами. Митохондриальная локализация подтверждена субклеточным фракционированием. Данный белок сочетается в нескольких соотношениях с GDH2-белком (β -ГДГ) в виде семи изоферментов. Катализирует расщепление остатков глицина. Может быть вовлечен в ассимиляцию аммиака в условиях избытка неорганического азота.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬ НАЯ ЧАСТЬ

Цель и задачи

Целью курсовой работы было получение высокоочищенных препаратов глутаматдегидрогеназы из листьев кукурузы и изучение их каталитических характеристик.

В соответствии целью были поставлены следующие задачи:

1. Разработать схему очистки глутаматдегидрогеназы из листьев кукурузы.
2. Исследовать влияние pH на активность глутаматдегидрогеназы и выявить оптимум pH работы данного фермента.
3. Установить значение константы Михаэлиса для прямой реакции.

Методы исследования

Определение активности ГДГ

Активность глутаматдегидрогеназы определяли спектрофотометрическим методом путем измерения оптической плотности раствора, содержащего 2,5мМ 2-оксоглутарата, 0,2 мМ НАДН, 50 мМ хлорида аммония, 100 мМ Tris-HCl буфер pH 8.0. Выделенную фракцию добавляли в опытный раствор и измеряли оптическую плотность раствора при 340 нм в течение 2 минут. Температура окружающей среды составляла 25°C. Расчет активности глутаматдегидрогеназы проводился по падению оптической плотности среды фотометрирования по формуле:

$$E = (\Delta D \cdot k \cdot V_{\text{общ}}) / (V_{\text{внес}} \cdot t)$$

Где, ΔD – изменение оптической плотности при длине волны 340 нм, k – коэффициент молярной экстинкции, $V_{\text{общ}}$ – общий объем ферментной вытяжки (мкл), $V_{\text{вн}}$ – объем внесения (мкл), t – время (мин).

Определение количества белка по методу Лоури

Общее количество белка определяли по методу Lowry с совт. Оптическую плотность растворов определяли на спектрофотометре при 750 нм. Содержание белка рассчитывали по формуле:

$$Б = E * K * V_{общ} / V_{внес} ,$$

Где, E – оптическая плотность; K – пересчетный коэффициент; $V_{общ}$ – общий объем раствора, мл; $V_{внес}$ – объем взятой на белок пробы, мл

Удельная активность выражается в ферментативных единицах на мг белка:

$$Уд.акт = ФЕ/Б.$$

Очистка глутаматдегидрогеназы из зеленых листьев кукурузы

Очистку фермента осуществляли в несколько стадий при температуре 0-4°C.

1. Гомогенизация. Навеску растительного материала (1г) гомогенизировали в соотношении 1:10 со средой выделения следующего состава: 50 мМ Трис-HCl буфер, (pH 7.5), содержащий 1 мМ ЭДТА, 3 мМ ДТТ, 0,05% Тритон X-100.
2. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 5 мин. при 3000g.
3. Фракционирование сульфатом аммония с последующей гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25. К супернатанту добавляли кристаллический сульфат аммония от 0 до 35% насыщения. Центрифугировали 20 мин. при 11 000 об/мин. Супернатант вновь фракционировали до 70% насыщения сульфатом аммония и вновь центрифугировали 20 мин. при 11000 об/мин. Осадок ресуспендировали в 1-2 мл 50 мМ Tris-HCl буфера (pH 7,8).

Полученный ферментативный препарат наносили на колонку, заполненную сефадексом G-25 для освобождения от низкомолекулярных примесей. Элюцию осуществляли 50 mM Tris-HCl буфером (pH 8.0), со скоростью 15-20мл в час.

4. Ионообменная хроматография. Фермент наносили на колонку с ДЭАЭ-Sephacel, предварительно уравновешенную 50 mM Tris-HCl буфером (pH 8.0). При нанесении препарата на колонку фермент связывался с носителем. Поскольку фермент заряжен отрицательно, а колонка положительно, между ними возникает электростатическое взаимодействие. Чем сильнее заряжен белок, тем сильнее его взаимодействие с сорбентом. Разделение белков происходит путем десорбции их с носителя раствором, ионной силы которого достаточно для разрыва электростатических связей фермента и сорбента. Фермент десорбировали с колонки градиентом концентрации NaCl в среде элюирования. Наиболее оптимальным для десорбции фермента был линейный градиент концентрации NaCl от 0,15 до 0,3 M. Активность фермента обнаруживалась под действием ионной силы раствора, содержащего 0,27 M NaCl в среде элюирования, достаточной для отрыва глутаматдегидрогеназы от ДЭАЭ-Sephacel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Очистка ГДГ из зеленых листьев кукурузы

Первой стадией очистки было получение гомогената. Общая активность в гомогенате составила 66,7 ед., а удельная активность - 1,37 Е/мг белка.

После следовало фракционирование сульфатом аммония в пределах 70-80% насыщения. Для обессоливания ферментативного препарата использовали сефадекс G-25. Общая активность составила 57,8 ед., тогда как удельная активность была 18,6 ед./мг белка. Степень очистки на данной стадии соответствовала 13,6 с выходом 86,6%

Таблица 1. Очистка ГДГ

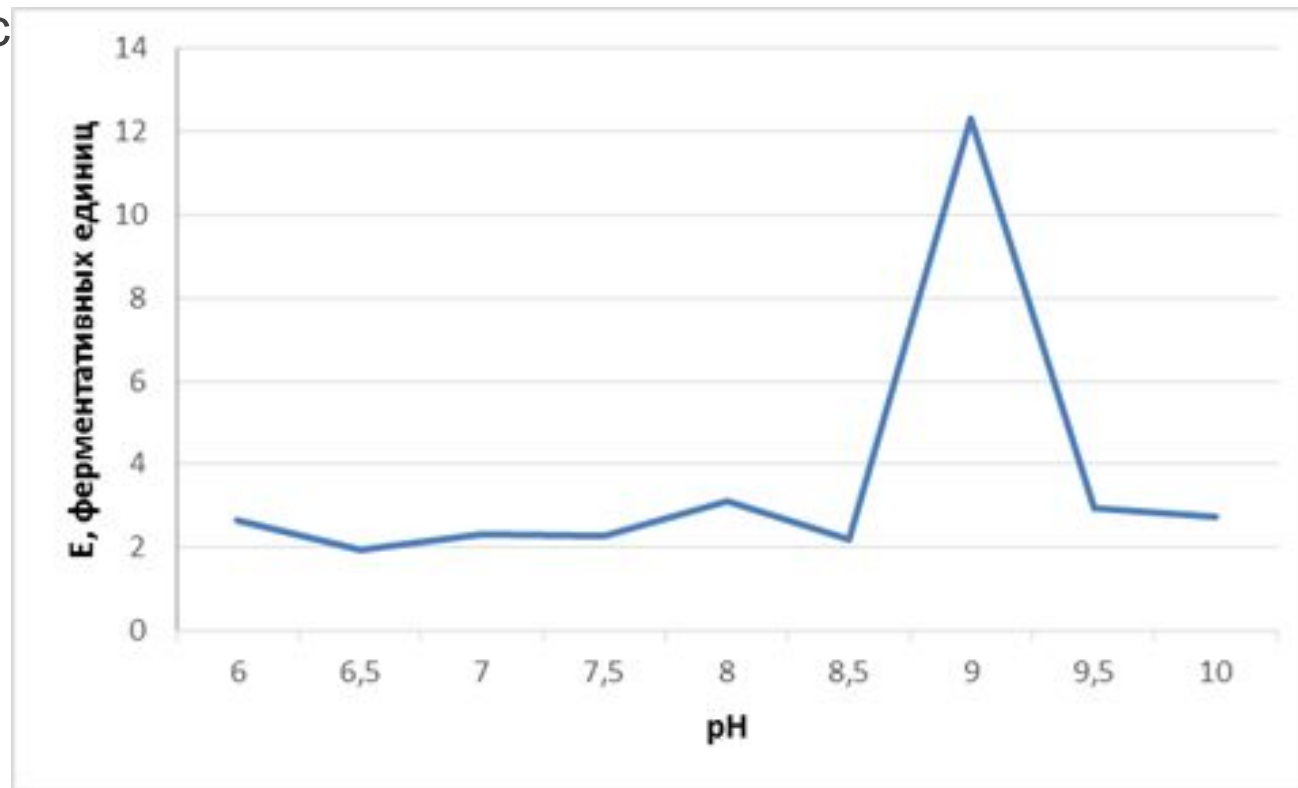
Стадия	Объем, мл	Количество белка, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	10	48,5	66,7	1,37	100	1
Фракционирование сульфатом аммония 70% насыщения	1,5	3,5	62,3	17,8	93,4	12,99
Гель-фильтрация через сефадекс G-25	57,8	3,1	57,8	18,6	86,6	13,6
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-фрактогеле	2	0,012	3,3	275	4,9	200,7

В качестве определяющей стадии очистки осуществляли ионообменную хроматографию. Элюцию фермента в колонки осуществляли линейным градиентом хлорида натрия от 150 до 300 мМ. После стадии ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-Sephacel был обнаружен пик активности глутаматдегидрогеназы из листьев кукурузы. Глутаматдегидрогеназа была очищена в 200,7 раз с выходом 4,9 %. Удельная активность ферментативного препарата составила 275 Е/мг белка.

Определение кинетических характеристик

Определение оптимума pH

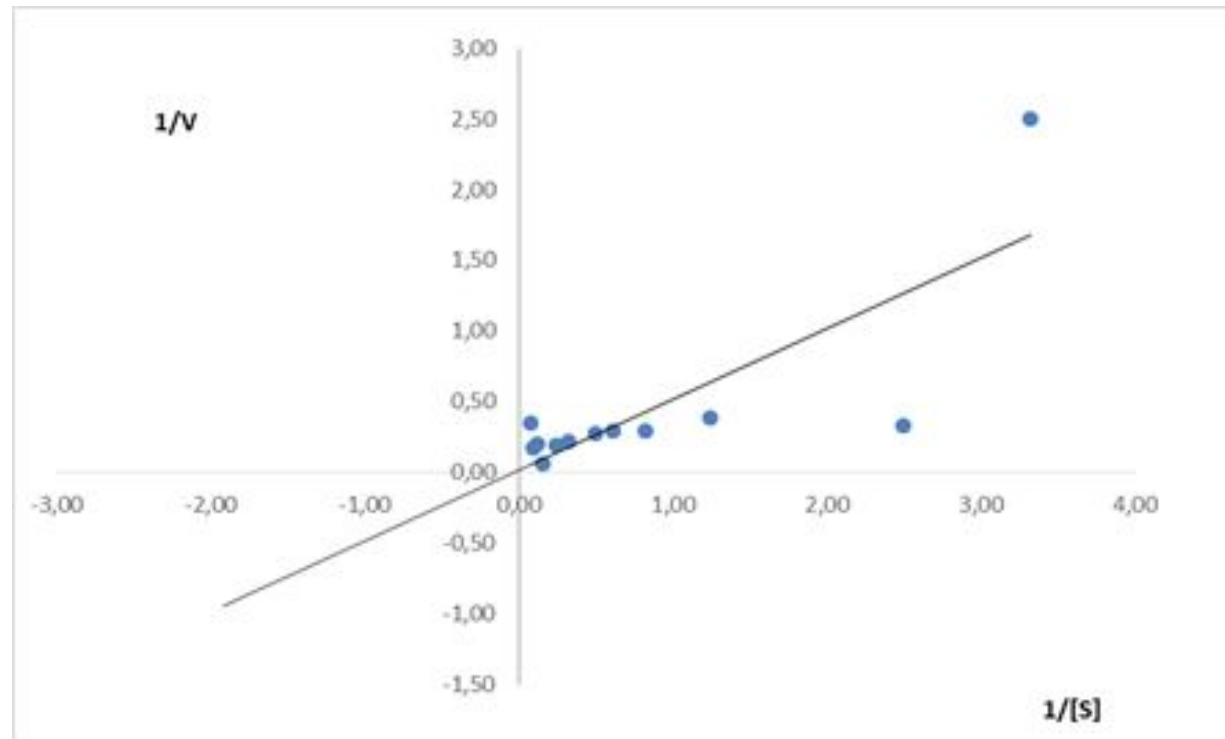
Зависимость активности полученного препарата ГДГ от значения pH для реакции окисления 2- окс



Определение константы Михаэлиса

Определение K_m полученного ферментного препарата по 2-оксоглутарату

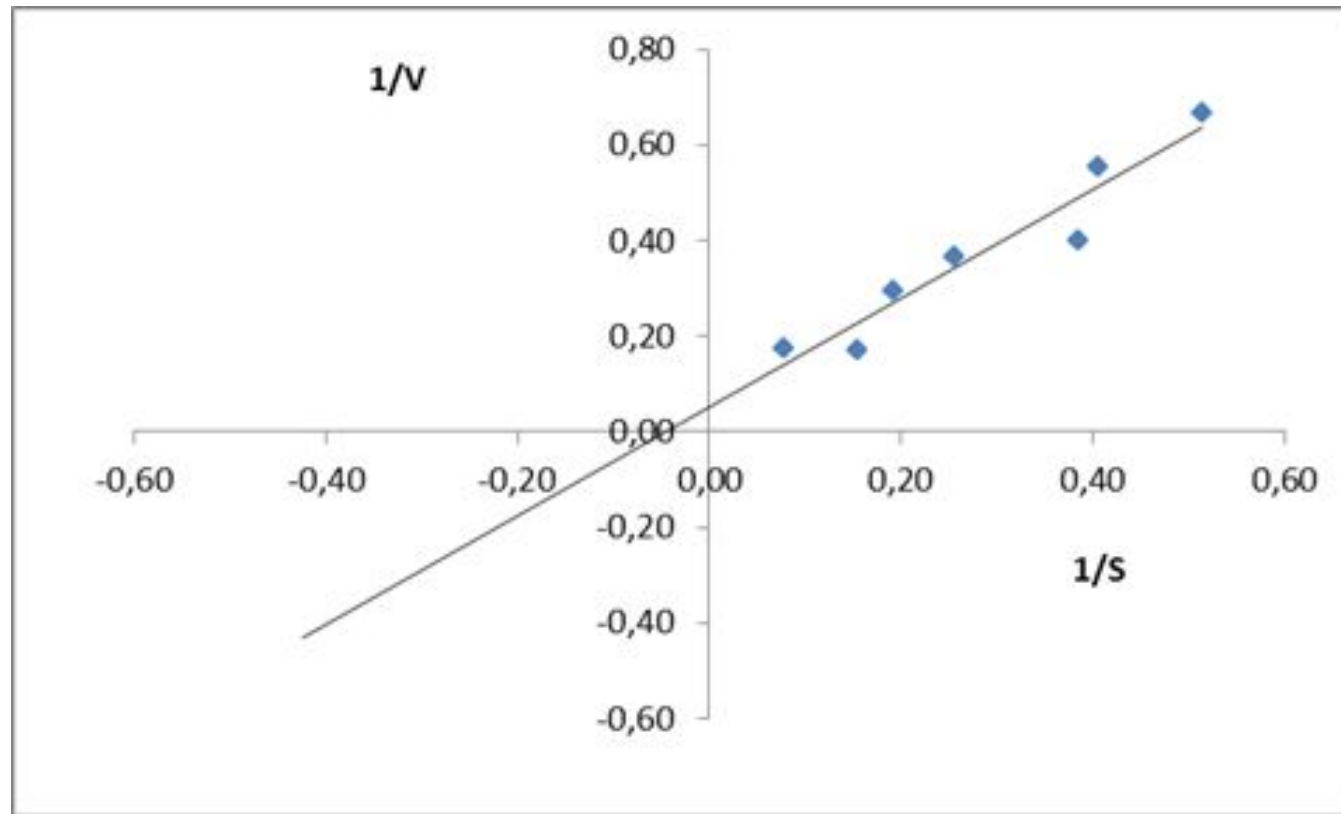
$K_m = 28,57 \text{ мМ}$



Определение константы Михаэлиса

Определение K_m полученного ферментного препарата по НАДН

$K_m = 22,075 \text{ мМ}$



ВЫВОДЫ

1. С помощью четырехстадийной схемы очистки получен высокоочищенный препарат глутаматдегидрогеназы из листьев кукурузы с удельной активностью 275 Е/мг белка, степенью очистки 200,7 раз и выходом 4,9%.
2. Оптимум pH для фермента приближен к значению pH 9.
3. Величина константы Михаэлиса по отношению к 2-оксоглутарату составила 28,57 мМ, а по отношению к НАДН 22,075 мМ.

Спасибо за
внимание!
