

Выделение и характеристика эндонуклеазы I из *Proteus vulgaris* 84

Категория: Новые ферменты

Просмотров: 3710

Ю.П. Зернов, О.М. Хощенко, В.С. Дедков, С.Х. Дегтярев

Биотехнология, 2002, № 1, С 15-20

Фермент с молекулярной массой 33 кД был выделен и очищен более чем в 200 раз. Определены оптимальные условия действия фермента: pH 9,5, 25 мМ MgCl₂, 100 мМ NaCl. Фермент наиболее активен при 37°C. Показано, что выделенный фермент является эндонуклеазой, которая гидролизует нативную и денатурированную нагреванием ДНК и РНК до олигонуклеотидов длиной 3-5 нуклеотидных остатка с 5'-фосфатом на конце.

Эндонуклеазы - это класс ферментов, специфически гидролизующих нуклеиновые кислоты с образованием достаточно коротких олигонуклеотидов. При этом продукты гидролиза могут варьировать по длине, а также по расположению фосфомоноэфирной группы на 3'-или 5'-конце. Кроме того, активность эндонуклеаз в отношении различных субстратов (нативная и денатурированная ДНК или РНК) может сильно различаться. Встречаются эндонуклеазы, действие которых зависит от окружения фосфодиэфирной связи [1].

Цель данного исследования - очистка и изучение свойств эндонуклеазы, обнаруженной нами в штамме *Proteus vulgaris* 84, фермента, перспективного для использования в биохимических исследованиях, а также в медицинской практике в качестве противовирусного препарата.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Получение биомассы *Proteus vulgaris* 84

Биомассу бактериального штамма *P. vulgaris* 84 (ВКПМ, В-3671) выращивали при 37°C в бульоне с 1 % триптона (AGS GmbH, Германия), 0,5 % дрожжевого экстракта (той же фирмы), 0,5 % NaCl, pH 7,4. В ферментер, содержащий 20 л бульона, инокулировали 1 л ночной культуры и выращивали 7 ч при частоте вращения мешалки 200 об/мин и аэрацией воздухом с

интенсивностью 10 л/мин. Оптическая плотность при этом достигала 2 ед. при 550 нм. Клетки осаждали центрифугированием при 8000 об/мин в течение 20 мин. В результате получали 80-90 г биомассы, которую хранили при -20°C.

Выделение фермента

Полученную биомассу (10 г) ресуспендировали в буфере (10 mM трис-HCl, pH 7,6, 5 mM ЭДТА, 1 mM 2-меркаптоэтанол) и разрушали клетки с помощью ультразвукового дезинтегратора. Клеточные обломки удаляли центрифугированием при 15 000 об/мин в течение 30 мин. Грубый экстракт фракционировали гель-фильтрацией на колонке (100x2,6 см) биогеля А 0,5 т, элюируя буфером: 0,8 M NaCl, 10 mM трис-HCl, pH 7,6, 5 % глицерина, 0,1 % тритона X-100, 1 mM ЭДТА, 1 mM 2-меркаптоэтанол. Скорость элюции составляла 40 мл/ч. Фракции с эндонуклеазной активностью объединяли и диализовали против буфера, содержащего 10 mM трис-HCl, pH 7,6, 1 mM 2-меркаптоэтанол. Ионообменную хроматографию проводили на ДЭАЭ-целлюлозе (колонка 10x2 см). На колонку наносили обессоленный раствор фермента и элюировали линейным градиентом концентрации

NaCl (0-0,5 M) в буфере: 10 mM трис-HCl, pH 7,6, 1 mM ЭДТА, 1 mM 2-меркаптоэтанол. Объем градиента составлял 400 мл. Дальнейшую очистку фермента проводили хроматографией на гепарин-сефарозе. Перед нанесением на колонку фермент диализовали против 10 объемов буфера (10 mM трис-HCl, pH 7,6, 1 mM ЭДТА, 1 mM 2-меркаптоэтанол), наносили на колонку (10x1 см) гепарин-сефарозы и элюировали 200 мл градиента 0-0,4 M NaCl в буфере: 10 mM трис-HCl, pH 7,6, 1 mM ЭДТА, 1 mM 2-меркаптоэтанол. Фракции, содержащие ферментативную активность, концентрировали против буфера: 10 mM трис-HCl, pH 7,6, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM 2- меркаптоэтанол, 50% глицерина.

Активность эндонуклеазы

Активность определяли по гидролизу ДНК [2]. За 1 ед. активности принимали количество фермента, необходимое для гидролиза 1 мкг ДНК фага лямбда за 30 мин при 37°C.

Определение молекулярной массы фермента

Проводили с помощью гель-фильтрации на колонке (100x0,9 см) ультрагеля AcA 44. Для калибровки колонки применяли белки с известной молекулярной массой (бычий сывороточный альбумин (БСА), овальбумин, химотрипсिनоген, лизоцим).

При подборе оптимальных условий действия эндонуклеазы активность фермента определяли по степени гидролиза ДНК после 2 ч инкубации при 37°C [2].

Для установления pH-оптимума использовали следующие буферные системы: К-фос-фатный буфер, pH 7,0-7,6; трис-HCl буфер, pH 7,6-8,6; глицин-NaOH-буфер, pH 8,6-10,0, в конечной концентрации 10 mM.

При определении оптимума температуры реакцию проводили при 24°C, 37°C и 42°C.

Для обнаружения влияния ионов металлов и ЭДТА на активность эндонуклеазы концентрацию $MgCl_2$ варьировали от 5 до 50 мМ, NaCl - от 0 до 200 мМ, KCl использовали в концентрации 100 мМ, ЭДТА - от 1 до 10 мМ.

Действие фермента на различные субстраты определяли путем гидролиза нативной ДНК, денатурированной ДНК, высокополимерной РНК из дрожжей, суммарной РНК.

Хроматографическое разделение продуктов гидролиза ДНК

Проводили на ДЭАЭ-целлюлозе восходящим градиентом 0-0,3 М NaCl в 7 М мочеvine при pH 7,0 по методу [3]. Поглощение элюата регистрировали с помощью Uvicord S II при 260 нм с записью на самописце.

Для определения места разрыва межнуклеотидной связи эндонуклеазой гидролизат ДНК инкубировали в течение 1 ч в присутствии экзонуклеазы I *E. coli*, имеющей высокую чувствительность к свободным 3'-ОН- группам [4].

Концентрацию белка определяли по методу [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение эндонуклеазы I из грубого экстракта проводили гель-фильтрацией через колонку биогеля А 0,5 т. Фракции с эндонуклеазной активностью объединяли и диализовали. Дальнейшую очистку фермента проводили ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе. Фракции с эндонуклеазной активностью объединяли, обессоливали диализом и наносили на колонку гепарин-сефарозы. Фермент с колонки элюировали градиентом NaCl в буфере и концентрировали против буфера, содержащего 50% глицерина. Фермент хранился при -20°C в течение года без потери активности. Результаты очистки фермента представлены в таблице 1.

Объект	Суммарный белок, мг	Активность общая, ед. • 10^{-3}	Удельная активность, ед. / $мг \cdot 10^{-3}$	Выход по активности, %	Степень очистки
Грубый экстракт	948	432	0,46	100	1
Элюат с биогеля А 0,5 т	704	340	0,48	79	1,04
Элюат с ДЭАЭ-целлюлозы	56	180	3,2	42	7
Элюат с гепарин-сефарозы	0,68	66,5	98	15,4	212

Таблица 1. Выделение эндонуклеазы I из 10 г биомассы *P. vulgaris* 84

Рис. 1. Определение молекулярной массы эндонуклеазы с помощью гель-фильтрации. Точки соответствуют молекулярной массе маркеров: БСА, овальбумина, химотрипсिनогена, лизоцима. Стрелкой обозначена молекулярная масса исследуемой эндонуклеазы

Молекулярная масса эндонуклеазы I из *P. vulgaris* 84, определенная гель-фильтрацией на калиброванной колонке с ультрагелем AcA 44, составила 31-35 кД (рис. 1).

При определении зависимости активности эндонуклеазы I от pH оценивалась активность фермента в различных буферных системах в диапазоне pH от 7,0 до 10,0. С увеличением pH буфера активность фермента возрастала и достигала максимума в глицин-NaOH- буфере, pH 9,5. Дальнейшее увеличение значений pH раствора приводило к снижению активности эндонуклеазы I (рис. 2).

Рис. 2. Зависимость активности эндонуклеазы от pH использованных буферов:

D- К-фосфатный буфер;

x- трис-HCl-буфер;

• - глицин-NaOH-буфер

Фермент наиболее активен при 37°C. При 24°C и 42°C скорость ферментативного гидролиза ДНК значительно снижалась и составляла соответственно 12 и 30 % от активности при 37°C. Прогревание ферментного препарата в течение 2 мин при 95°C приводило к полной инактивации эндонуклеазы I (данные не приведены).

Поскольку для проявления эндонуклеазной активности необходимо присутствие ионов Mg^{2+} , была исследована зависимость активности фермента от концентрации Mg^{2+} . Как видно из результатов, представленных на рис. 3, зависимость активности фермента представляет собой колоколообразную кривую с достаточно широким максимумом (от 15 до 35 mM)

Рис. 3. Зависимость активности эндонуклеазы от концентрации $MgCl_2$

Влияние ионной силы на ферментативную активность оказывается выраженным довольно слабо (рис. 4). Так, изменение концентрации NaCl в реакционной смеси от 0 до 200 mM приводило к 1,5-кратному изменению активности эндонуклеазы I. Максимум ферментативной активности наблюдался в присутствии примерно 100 mM NaCl и 25 mM $MgCl_2$, незначительно сдвигаясь вправо в присутствии 10 mM $MgCl_2$. Замена ионов Na^+ на ионы K^+ не оказывала влияния на активность фермента (результаты не приведены). Присутствие ЭДТА в концентрации от 1 до 5

мМ не влияло на активность фермента, что указывает на то, что эндонуклеаза I, видимо, не является металлоферментом.

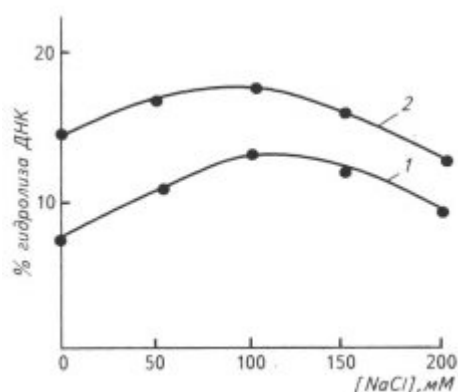


Рис. 4. Зависимость активности эндонуклеазы от концентрации NaCl: 1 — в присутствии 10 мМ $MgCl_2$; 2 — в присутствии 25 мМ $MgCl_2$

Изучение действия эндонуклеазы I на различные субстраты показало, что максимальную активность фермент проявляет в отношении нативной ДНК. Скорость гидролиза денатурированной ДНК составляла 84 % от скорости гидролиза нативной ДНК. Скорость гидролиза РНК была еще ниже и составляла 32 % для высокополимерной дрожжевой РНК и 21 % для суммарной РНК (данные не приведены).

Хроматографическое разделение продуктов исчерпывающего гидролиза ДНК проводили ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе в присутствии 7 М мочевины, которая снимает вторичные взаимодействия олигонуклеотидов с сорбентом, и разделение происходит исключительно в соответствии с количеством отрицательно заряженных фосфатных групп [3]. Из результатов, представленных на рис.5, а, видно, что основными продуктами расщепления ДНК являются три-, тетра- и пентануклеотиды, а образования мононуклеотидов практически не наблюдается. Эти результаты свидетельствуют об эндонуклеазном характере действия фермента. При разделении конечных продуктов гидролиза электрофорезом в ПААГ также обнаружено, что гидролитическое расщепление идет с образованием тетра- и пентануклеотидов (результаты не приведены).

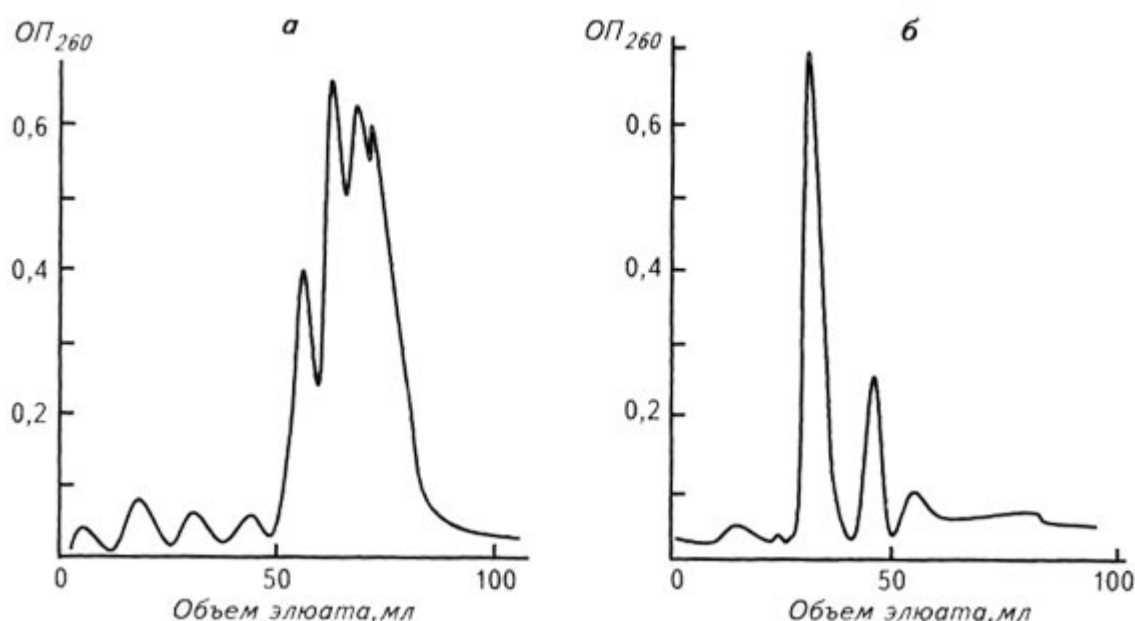


Рис. 5. Разделение ионообменной хроматографией в присутствии 7 М мочевины: а - продуктов исчерпывающего гидролиза ДНК эндонуклеазой I *P. vulgaris*; б - продуктов исчерпывающего гидролиза ДНК эндонуклеазой I *P. vulgaris*, дополнительно обработанных экзонуклеазой I *E. coli*

Для определения места разрыва межнуклеотидной связи продукты полного гидролиза ДНК эндонуклеазой I *P. vulgaris* инкубировали в присутствии экзонуклеазы I *E. coli*, имеющей высокую чувствительность к свободным 3'-ОН-группам [4]. Полученные продукты реакции разделяли ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе в присутствии 7 М мочевины. На хроматографическом профиле видно (см. рис. 5, б), что продукты реакции соответствуют моно- и динуклеотидам. Как известно [4], экзонуклеаза I гидролизует цепь ДНК, начиная с 3'-гидроксильного конца, последовательно отщепляя нуклеозид-5'-монофосфаты, пока не останется динуклеотид. Полученные результаты говорят о том, что продуктами гидролиза ДНК эндонуклеазой I из *P. vulgaris* 84 являются олигонуклеотиды с 5'-фосфатной группой на конце. Таким образом, полученные данные позволяют судить, что эндонуклеаза I, полученная из биомассы *Proteus vulgaris* штамм 84, является ферментом с молекулярной массой порядка 33 кД. Фермент гидролизует нативную и денатурированную нагреванием ДНК и РНК до олигонуклеотидов длиной 3-5 нуклеотидных остатка с 5'-фосфатом на конце. Эндонуклеаза I *P. vulgaris* проявляет оптимальную активность при pH 9,5 в присутствии 25 мМ $MgCl_2$ и 100 мМ NaCl. Фермент наиболее активен при 37° и инактивируется прогреванием. Выделенная нами эндонуклеаза I *P. Vulgaris* по основным биохимическим свойствам сходна с хорошо изученной внеклеточной эндонуклеазой из *Serratia marcescens* [6], хотя и не инактивируется, в отличие от последней, в присутствии ЭДТА. Кроме того, следует отметить, что штамм *S. Marcescens* является условно-патогенным [7], а это вызывает определенные сложности

при работе с этим продуцентом, тогда как штамм *P. vulgaris* 84 таковым не является и может более широко использоваться в микробиологическом производстве.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баскакова А.А., Безбородова СИ., Беляева М.И. и др Нуклеазы микроорганизмов. - М. : Наука, 1974 -С. 7-106.
2. Razzel, W.E. II J. Biol. Chem. - 1963. - V.238. - P.305
3. Тенер Г. Методы исследования нуклеиновых кисло -М.:Мир, 1970.-С. 85-90.
4. Дэвидсон Дж. Биохимия нуклеиновых кислот. - IV Мир, 1976.-С. 207.
5. Ehresmann, B., Imbault, P., Well, J.P. II Anal. Biochem 1973.-V. 54. -P. 454-463.
6. Матова И,А., Сенженко Л.П., Старостина В.К., Тихомирова Е.А. Некоторые свойства эндонуклеазы *Serratia marcescens*: Тезисы докл. II Всесоюзного совейния по ферментам микроорганизмов. - Минск, 1978 Ч. 1.-С. 166.
7. Медицинская микробиология/Под ред.В.И. Покровского и О.К. Поздеева. - М.: ГЭОТАР, Медицина, 1999.-С. 409.