

Термолabileльная щелочная фосфатаза из психрофильного микроорганизма *Alteromonas undina* P2

Категория: Новые ферменты

Просмотров: 6071

Ю.П. Зернов, В.С. Дедков, Ю.А. Антонова, Н.А. Михненкова, С.Х. Дегтярев

Биотехнология, 2005, № 2, с. 38-43

*Из природных изолятов нами был выделен продуцент термолabileльной щелочной фосфатазы, идентифицированной как вид бактерии *Alteromonas undina* P2. Описан способ очистки фермента. Определены оптимальные условия действия щелочной фосфатазы: 0.1 М глицин-NaOH pH 9.5, 10 мМ MgCl₂ и 0.1 мМ ZnCl₂. Фермент наиболее активен при 30°C. При 6°C уровень активности щелочной фосфатазы превышает 50% от максимальной. Прогревание ферментного препарата в течение 20 мин при 65° приводит к полной необратимой инактивации фосфатазы.*

Щелочные фосфатазы (ЕС 3.1.3.1) широко распространены в природе. Эти ферменты широкого субстратного спектра действия осуществляют каталитическое удаление фосфатной группы как со многих небольших органических молекул, так и с больших биомолекул, таких как ДНК и белки [1]. Щелочные фосфатазы обычно используются в молекулярной биологии и при проведении медицинских биохимических анализов. В молекулярной биологии фосфатазы применяются для удаления концевых фосфатных групп с молекул нуклеиновых кислот [2]. Наиболее существенными свойствами фосфатаз, для этих целей, являются высокая каталитическая активность и термолabileльность ферментов, последнее позволяет легко инактивировать фосфатазную активность термической денатурацией без использования достаточно сложных процедур экстракции и осаждения [3].

Известно [4,5], что адаптация микроорганизмов к холодным условиям существования (так называемые психрофильные микроорганизмы) приводит к увеличению рыхлости и подвижности третичной структуры ферментов психрофилов, а это, в свою очередь, сказывается на термостабильности этих ферментов. В результате ферменты психрофилов оказываются зачастую гораздо более термолabileльными, по сравнению с аналогичными ферментами мезофилов.

Целью данного исследования был поиск продуцента термолabileльной щелочной фосфатазы. Поиск осуществлялся среди глубинных микроорганизмов в Авачинском заливе в районе острова Старичков.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Морфологические и физиолого-биохимические свойства штамма изучали с использованием методик [6]. Определение штамма до вида проводили по определителю [7].

Для получения колоний, 50 мкл пробы морской воды растирали по поверхности питательного агара, дополненного солями, содержащимися в морской воде (г/л): агар (Copenhagen Pectin A/S, Дания) – 15; триптон (Organotechnie, Франция) - 10; дрожжевой экстракт (той же фирмы) – 5; тиамин - 0.01; NaCl - 27.5; $MgCl_2$ – 5; $MgSO_4$ – 2; $CaCl_2$ - 0.5; KCl – 1; $FeSO_4$ - 0.001; pH 7.2 - 7.7 [6]. После 2-х суток инкубации при 4°C выросло около 200 колоний, которые рассеивали по 16 колоний на чашку, выращивали 20 ч при 24°C и использовали для определения фосфатаз и их термолабильности. Для этого 0.2-1 мг клеток с агара лизировали в 100 мкл 10 mM трис-HCl (pH 7.7) с 0.2 мг/мл лизоцимом (Serva, Германия).

Для изучения влияния температуры на скорость роста *A. undina* P2, питательный бульон дополняли солями морской воды и засеивали ночной бульонной культурой (выращенной со встряхиванием при 25°C). Засеянный бульон распределяли по 200 мл в 4-е качалочные колбы объемом по 700 мл и встряхивали при 150 об/мин при 13°C, 25°C, 30°C и 37°C. Через определенные интервалы времени стерильно отбирали пробы культуры и измеряли оптическую плотность при 550 нм.

Биомассу *A. undina* P2 выращивали при 28°C (в 20 л бульона с солями морской воды) в ферментёре (New Brunswick Scientific, США) при перемешивании 200 об/мин и аэрации 14 л/мин до оптической плотности 8 ед. при 550 нм. Время выращивания обычно составляло 8 ч. Клетки осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 8000 об/мин на J-21 (Beckman, США) в роторе JA 10 при 4°C. В результате получали около 170 г биомассы, которую хранили при -20°C. Выделение щелочной фосфатазы проводили при 4°C. 20 г полученной биомассы ресуспендировали в 80 мл буфера (20 mM трис-HCl, pH 7.6, 0.1 mM $ZnCl_2$, 0.05% лизоцим и 0.1% тритон X-100), выдерживали в течение 1 ч и разрушали клетки с помощью ультразвукового дезинтегратора. Клеточный дебрис фракционировали, добавляя н-бутанол до 20% концентрации, выдерживали 30 мин и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 40 мин. Водную фазу, содержащую фермент, диализовали против 2 л буфера: 20 mM трис-HCl, pH 7.6, 0.1 mM $ZnCl_2$ и пропускали через колонку (10x2 см) с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной 20 mM трис-HCl, pH 7.6, 0.1 mM $ZnCl_2$. Колонку промывали линейным градиентом концентрации NaCl (0-0.5 M) в том же буфере. Полученный фермент фракционировали гель-фильтрацией на колонке (100x1.6 см) с ультрагелем AcA 44, элюируя буфером: 0.8 M NaCl, 20 mM трис-HCl, pH 7.6, 0.1 mM $ZnCl_2$ и 0.1% тритон X-100. Фракции с фосфатазной активностью объединяли и концентрировали диализом против буфера, содержащего 20 mM трис-HCl, pH 7.6, 0.1 mM $ZnCl_2$, 50% глицерин. Фермент хранили при -20°C.

Активность щелочной фосфатазы определяли по гидролизу 6 mM p-нитрофенилфосфата при 30°C в 0.1 M глицин-NaOH-буфере, pH 9.5, содержащем 10 mM $MgCl_2$ и 0.1 mM $ZnCl_2$ в объеме 0.5 мл. После 15 мин инкубирования, реакцию останавливали добавлением 0.5 мл 2 M NaOH. Доводили объем пробы до 3 мл и измеряли оптическую плотность при 405 нм ($\epsilon_{405} = 18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ см}^{-1}$). За 1 ед. активности принимали количество фермента, необходимое для гидролиза 1 мкмоль p-нитрофенилфосфата за 1 мин [8].

Для установления pH-оптимума активности фермента использовали следующие буферные системы: трис-HCl буфер (pH 7.6-9.0), глицин-NaOH буфер pH 9.0-10.5) в конечной концентрации 0.02-0.2 М.

Для определения примесных эндонуклеаз 5-10 ед. акт. фосфатазы инкубировали с 1 мкг ДНК фага лямбда в течение 1 ч при 30°C в буфере идентичном тому, который использовали для определения активности фермента. Объем реакционной смеси составлял 50 мкл. Отсутствие деградации фаговой ДНК контролировали с помощью гель-электрофореза в 1% агарозе.

Тестирование примесных экзонуклеаз проводили инкубированием 5-10 ед. акт. фосфатазы с 1 мкг фрагментов рестрикции ДНК фага лямбда эндонуклеазой Bme18 I в течение 1 ч при 30°C в буфере оптимальном для проявления активности фосфатазы. Объем реакционной смеси составлял 50 мкл. Отсутствие сдвига и размывания полос ДНК контролировали гель-электрофорезом в 1.4% агарозе.

При определении оптимума температуры реакцию проводили при 6, 23, 37, 45 и 55°C.

Для исследования термолабильности щелочной фосфатазы проводили инкубирование фермента в реакционной смеси в отсутствии субстрата в течение 20 мин при 6, 23, 37, 45, 55, 65°C. После чего температуру реакционных смесей доводили до 30°C, добавляли р-нитрофенилфосфат до 6 мМ концентрации и определяли остаточную ферментативную активность.

Для обнаружения влияния ионов металлов на активность фосфатазы варьировали концентрацию $MgCl_2$ от 0 до 40 мМ, $ZnCl_2$ от 0 до 10 мМ, NaCl от 0 до 200 мМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В поисках продуцента термолабильной щелочной фосфатазы было проанализировано около 200 колоний микроорганизмов, полученных нами из природных изолятов морской воды с глубины порядка 10 метров. Отбор проб осуществлялся в Авачинском заливе в районе острова Старичков, где температура в течение всего года не превышает + 10°C, т.е. существуют условия для обитания психрофильных микроорганизмов. В ходе исследований было выявлено три колонии, продуцирующие термолабильную щелочную фосфатазу. Дальнейшее изучение этих колоний показало, что по продуктивности щелочной фосфатазы, а также по морфологическим и физиолого-биохимическим свойствам они оказались идентичными. Поэтому в последующем вся работа была проведена с использованием биомассы, полученной из одной из колоний.

Штамм-продуцент термолабильной фосфатазы имеет следующие характеристики. Клетки - подвижные палочки размером 0.7x(1-1.5) мкм, граммотрицательные, спор не образуют. Штамм - аэробный, каталазо- и оксидазоположительный, не восстанавливает нитрат в нитрит. Кислоту образует (слабо) из глюкозы, лактозы, галактозы, глицерина и маннита, но не из арабинозы, сахарозы, мальтозы, рамнозы, маннозы, ксилозы, сорбита, инозита, этанола и ацетата. Для роста как в бульоне, так и на питательном агаре были необходимы соли морской воды [6]. Добавление только 5 г/л NaCl и 1 г/л $MgCl_2$ было недостаточно для роста колоний. Колонии на питательном агаре вырастали за 2 суток при 24°C и были круглые, 2-4 мм в диаметре, слабо конически-выпуклые, гладкие, блестящие, серовато-белые с прозрачными краями. Штамм идентифицировали по определителю [7] как вид бактерии *Alteromonas undina* P2.

Влияние температуры на скорость роста *A. undina* P2 изучали в бульоне при 13°C, 25°C, 30°C и

37°C. На рис. 1 видно, что культура не росла при 37°C, тогда как при более низких температурах плотность культуры достигала примерно 10 оп. ед. после 24 ч роста. Скорость роста при 13°C, 25°C и 30°C, была примерно одинаковой. Хотя в первые 4 часа культура быстрее росла при 30°C, но к 8 часам максимум оптической плотности был при 13°C. Вероятно, с увеличением плотности клеток начала сказываться недостаточная растворимость кислорода при повышении температуры. Кривая роста при 13°C наиболее соответствовала логарифмической, что свидетельствовало об оптимальности условий культивирования. Отсутствие роста при 37°C и активный рост при 13°C указывает на температуру экологической ниши культуры в океане. Штамм *A. undina* P2 явно психрофильный. С биохимической точки зрения можно ожидать, что его ферменты также имеют пониженный температурный оптимум и термолабильны.

Рис. 1. Выращивание *Alteromonas undina* P2 при различных температурах

Щелочную фосфатазу выделяли из клеточного экстракта обработкой 20% н-бутанолом с последующей хроматографической очисткой колоночной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе и гель-фильтрацией на колонке с ультрагелем AcA 44. Из 20 г биомассы при выходе 12% получали 8 тыс. ед. акт. щелочной фосфатазы с активностью 1 ед/мкл.

Препараты фермента не проявляли эндо- и экзонуклеазную активность, о чем свидетельствовало отсутствие деградации фаговой ДНК после инкубирования с фосфатазой. Так же не наблюдалось сдвига и размывания фрагментов рестрикции ДНК фага лямбда эндонуклеазой Bme18 I после выдерживания в присутствии фосфатазы. Это указывает на функциональную чистоту препаратов фермента и принципиальную возможность использования для дефосфорилирования ДНК.

Активность щелочной фосфатазы определяли по гидролизу p-нитрофенилфосфата. При определении зависимости активности фосфатазы от pH оценивалась ферментативная активность в различных буферных системах в диапазоне pH от 7.6 до 10.5. Фермент проявлял себя как типичная щелочная фосфатаза. С увеличением pH буфера активность фермента

возрастала и достигала максимума в глицин-NaOH буфере при pH 9.5. Дальнейшее увеличение значений pH реакционной смеси приводило к некоторому снижению активности фосфатазы (рис.2). Понижение концентрации глицин-NaOH буфера с 0.1 М до 0.02 М приводило примерно к 50% процентному снижению скорости фосфатазной реакции. Это, видимо, обусловлено недостаточной емкостью буфера, поскольку увеличение ионной силы раствора за счет добавления NaCl до 0.2 М концентрации не оказывало существенного влияния. Варьирование концентрации NaCl от 0 до 0.2 М в 0.1 М глицин-NaOH буфере также оказывалось несущественным для фосфатазной активности, поскольку активность фермента изменялась не более, чем на 10%.

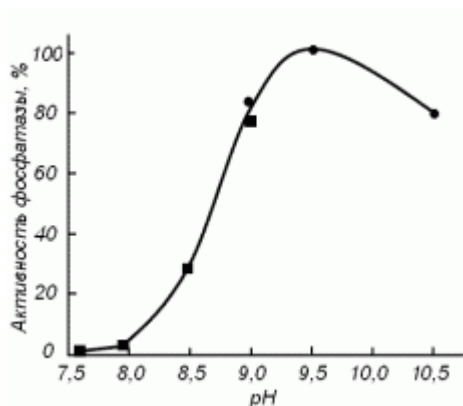


Рис. 2. Зависимость активности фосфатазы от pH.:

- - трис-HCl буфер;
- - глицин-NaOH буфер

Для проявления фосфатазной активности необходимо присутствие ионов Mg^{2+} и Zn^{2+} , поэтому была исследована зависимость активности фермента от концентрации этих ионов. В отсутствие в реакционной смеси ионов Mg^{2+} активность щелочной фосфатазы не обнаруживается, что указывает на абсолютную необходимость двухвалентных катионов Mg^{2+} для протекания ферментативной реакции. Оптимальная концентрация Mg^{2+} зависит от концентрации субстрата и, для достижения максимальной скорости, должна превышать последнюю. Так при проведении реакции с 6 мМ р-нитрофенилфосфатом максимальная скорость реакции достигалась уже при 10 мМ концентрации Mg^{2+} и практически не изменялась до 40 мМ концентрации. Отсутствие в реакционной смеси ионов Zn^{2+} оказывалось не столь драматичным и скорость реакции составляла порядка 60% от максимальной. Добавление Zn^{2+} в 0,01 мМ концентрации позволяло достичь максимальной скорости реакции и последняя оставалась постоянной вплоть до 1 мМ концентрации. Однако следует отметить, что 10 мМ концентрация Zn^{2+} приводила к полной инактивации щелочной фосфатазы.

Сильное ингибирующее действие на фосфатазную активность оказывало присутствие неорганического фосфата. Так в 10 мМ концентрации неорганический фосфат приводил к ингибированию ферментативной реакции более чем на 70%, а 30 мМ концентрация фосфата практически полностью ингибировала фермент. Увеличение концентрации Mg^{2+} до 40 мМ, а Zn^{2+} до 1 мМ не уменьшали ингибирующего действия фосфата. Ингибирующее действие неорганического фосфата, видимо, обусловлено несколькими причинами. Во-первых, неорганический фосфат является продуктом реакции дефосфорилирования и может выступать в качестве конкурентного ингибитора фермента. Во-вторых, фосфат, связывая катионы Mg^{2+} , может ингибировать ферментативную активность из-за того, что мешает образованию субстрат-ферментного комплекса, который, как известно [1], осуществляется через магниевые мостики. И в-третьих, ионы Mg^{2+} и Zn^{2+} , видимо, выводятся неорганическим фосфатом из реакционной смеси в виде водонерастворимых солей, о чем свидетельствовало помутнение реакционной смеси и образование осадка.

Поскольку, как отмечалось ранее, щелочная фосфатаза обнаружена нами в психрофильном микроорганизме, было интересно определить зависимость активности фермента от температуры. Как видно из результатов, представленных на рис. 3, максимальная активность щелочной фосфатазы *A. undina* P2 наблюдалась при 30°C и резко убывала с увеличением температуры. Так при 55°C активность фермента составляла только 9% от максимальной. Вместе с тем, понижение температуры не оказывало такого влияния и при 6°C уровень активности превышал 50% от максимальной, что характерно для ферментов психрофилов [4]. Для сравнения на этом же рисунке представлена зависимость активности коммерческого препарата щелочной фосфатазы из кишечника теленка. Видно, что температурный оптимум для этой фосфатазы находится в районе 37°C и активность мало меняется при увеличении температуры до 55°C. Уменьшение температуры реакционной смеси до 6°C выражается в 5-ти кратном падении ферментативной активности.

Рис. 3. Зависимость активности фосфатаз от температуры

- - фосфатазы *A. undina* P2
- - фосфатаза из кишечника теленка

Инкубирование щелочной фосфатазы *A. undina* P2 в реакционной смеси в отсутствии субстрата в течение 20 мин при различных температурах, представленное на рис. 4, демонстрирует высокую термолабильность фермента. Видно, что в интервале 30-40°C происходит резкая инактивация фермента.

Прогревание ферментного препарата щелочной фосфатазы *A. undina* P2 в течение 20 мин при 65°C (как в отсутствии субстрата, так и в его присутствии) приводило к полной необратимой инактивации фосфатазы. Для сравнения представлена зависимость термостабильности фосфатазы из кишечника телят. Видно, что только при 65°C наблюдается некоторая инактивация фермента.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 4. Термостабильность фосфатаз при различных температурах:

- - фосфатазы *A. undina* P2
- - фосфатаза из кишечника телят

Таким образом, из полученных данных следует, что щелочная фосфатаза, выделенная из морского психрофильного микроорганизма *Alteromonas undina* P2, является термолабильным ферментом и может быть использована в молекулярной биологии для удаления концевых фосфатных групп с молекул нуклеиновых кислот.

Выражаем благодарность Н. Санамян за техническое содействие в отборе глубинных проб микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. McComb, R.B., et al. Alkaline phosphatase. New York: Plenum Press, 1979.
2. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
3. Kobori, H., et al. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1984. - V. 81. - P. 6691-6695.
4. Feller, G., et al. //Comp. Biochem. Physiol. - 1997. - V. 118A. - P. 495-499.
5. Cavicchioli, R., et al. //Current Opinion in Biotechnology - 2002. - V. 13. - P. 253-261.
6. Методы общей бактериологии. / Под. ред. Ф. Герхардта и др.: В 3 томах: Пер. с англ. под ред. чл. корр. АН СССР Е. Н. Кондратьевой и проф. Л. В. Калакуцкого, - М., 1984.

7. Определитель бактерий Берджи. / Под ред. Хоулта Дж. и др.: 9-е издание в 2-х томах: Пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина, - М., 1997.
8. Olsen, R.L., et al. // Comp. Biochem. Physiol. - 1991. - V. 99B. - P. 755-761.